



HAL
open science

Les effets de la thrombine sur l'épithélium colique humain, grâce aux organoïdes (modèle ex vivo, 3D)

Morgane Sébert

► To cite this version:

Morgane Sébert. Les effets de la thrombine sur l'épithélium colique humain, grâce aux organoïdes (modèle ex vivo, 3D). Hépatologie et Gastroentérologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30006 . tel-02022720

HAL Id: tel-02022720

<https://theses.hal.science/tel-02022720>

Submitted on 18 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.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : *l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)*

Présentée et soutenue le 19 janvier 2018 par :

Morgane Sébert

Les effets de la Thrombine sur l'épithélium colique humain, grâce aux organoïdes (modèle ex vivo, 3D)

JURY

Thierry Levade, PU-PH, INSERM U1037, Toulouse

Stéphanie Bornes, MCU, IUT UMRF 0545, Clermont-Ferrand

Alain Couvineau, DR, INSERM UMR 1149, Paris

Isabelle Gross, CR, INSERM U1113, Strasbourg

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Rapporteur

Ecole doctorale et spécialité :

BSB : Physiopathologies

Unité de Recherche :

Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD) – U1220 – INSERM

Directeurs de thèse :

Dr. Nathalie Vergnolle et Dr. Audrey Ferrand

Remerciements

Ces lignes sont les premières de ce manuscrit et pourtant, ce sont les dernières à avoir été écrites et les plus difficiles à transposer ! Ce manuscrit est l'aboutissement d'une expérience de vie de trois années inoubliables et fort enrichissantes.

Je me suis naturellement tournée vers la biologie puis la physiopathologie dans le but de nourrir ma curiosité pour le monde qui m'entourait, être utile à la communauté et faire avancer les connaissances pour un monde meilleur ! Ce manuscrit est le reflet de ces aspirations et j'ose espérer que ces travaux de thèse ouvriront la voie à de nouvelles connaissances majeures. De cette expérience singulière j'en ressors grandie, plus passionnée, plus motivée encore, plus vivante et aimant d'autant plus les gens. Cela m'est aujourd'hui certain, ce n'est pas le but qui compte réellement, mais le chemin pour y parvenir et les itinéraires bis sont plus enrichissants que la ligne droite (surtout sans Saturno contro !). Je tiens donc à remercier du plus profond de mon âme, toutes ces personnes qui ont croisé et dessiné ma route, sans qui ces travaux de thèse n'auraient pu voir le jour et sans qui je ne serai pas la même personne aujourd'hui ! **MERCI !!!**

À **Thierry Levade**, votre soutien et votre bienveillance ont été d'une aide précieuse et vous m'honorez de votre présence dans ce jury. Veuillez trouver dans ce manuscrit toute ma reconnaissance.

À **Stéphanie Bornes**, je vous remercie d'avoir accepté, au premier coup de téléphone, de juger ces travaux de thèse. Votre point de vue extérieur me permet de prendre de la distance sur ces résultats.

À **Alain Couvineau**, merci d'avoir accepté à la dernière minute et sans hésitation de faire partie de ce jury et d'avoir eu un regard très positif sur ces travaux, qui a rallumé la flamme dans le mien (qui s'éteint éteinte à avoir trop la tête dans le guidon).

À **Isabelle Gross**, merci d'avoir méticuleusement jugé et annoté ces travaux. Vos remarques m'ont été très utiles pour discuter d'autant plus ces résultats.

À **Nathalie**, merci de m'avoir accueillie dans ton équipe et ce nouvel institut, de m'avoir donné l'opportunité de maîtriser un modèle original et une technique innovante. L'imagerie me plaisait déjà beaucoup avant, maintenant elle me fascine !

À **Audrey**, ton humanité reste intacte dans ce monde qui devient individualiste et ça fait du bien. Merci de m'avoir fait confiance dans tout ce que j'ai entrepris et d'avoir boosté mon autonomie en indépendance.

À **ce sourire rayonnant**, croisé chaque matin et à chaque passage devant ton bureau,

À **vous** qui nous facilitez grandement la vie quotidienne et qui êtes les piliers de ces instituts, hommes et femmes de l'ombre, je vous adresse toute la reconnaissance que vous méritez !

Depuis des années, mon leitmotiv est '*le tout ou rien*' et a été très prononcé durant ces 3 ans : go go go ! Chaque jour et chaque seconde, j'ai donné le meilleur de moi-même. J'ai passé tellement de temps au labo, que j'en connais désormais tous les secrets : avis aux amateurs et surtout à **toi 'successeur'**, courage !

-Pour atteindre le self en évitant le déluge, passez par les sous-sols du PPR (jusqu'au bout), vous arriverez juste à côté !

-Si l'ascenseur se bloque entre 2 étages : sauter une fois, rappuyer sur un bouton et il redémarrera,

-La douche ayant le plus de débit est celle des hommes au bâtiment F,

-Les serveurs ralentissent vers 21h30 et deviennent inaccessibles après 23h à cause du back-up (heureusement pour moi !),
-et sur l'apotome, il faut d'abord appuyer sur 'dsRed' pour activer le 'FITC' !

Pour revenir à l'imagerie, seule technique que j'ai usé durant ces 3 ans, je pense être devenue un petit Jedi des 'Tips & tricks' des systèmes optiques du labo ! **À vous** qui m'avez initiée aux systèmes HCS, votre patience et votre passion m'ont donné le goût d'en apprendre davantage, surtout quand les organoïdes se confondaient en images de test de Rorschach !

Je regrette de ne pas avoir passé plus de temps **à tes côtés**, à manger des chocolats et des pistaches toute la soirée, en créant, bidouillant et peaufinant ces programmes d'analyse. Ton enseignement, ton soutien et tes encouragements m'ont enrichie, merci ! Je commence à comprendre cette fameuse phrase : *'la mer est pleine de poissons'*. J'ose espérer que ce que nous avons créé et initié apportera bientôt ses fruits dans l'approche thérapeutique. Courage **à toi** qui reprend ces travaux, ta détermination et ton intégrité ne failliront pas, j'en suis sûre !

Grâce **à vous** également, qui m'avez formée et conseillée, merci ! Vous êtes plus que des supports techniques, vous êtes à l'écoute et d'un soutien qui fait chaud au cœur. Je suis ravie de vous avoir suivi dans des séminaires de prestige, dans une ambiance familiale ou internationale & d'avoir partagé tous ces moments perso ! Dans ces séminaires d'ailleurs, j'y ai rencontré des personnes intelligentes et humbles (qui ne courent pas les rues). **Ces physiciens** au grand cœur, avec qui j'ai pu débattre des heures et des nuits entières, sur la normalité, la conception du comportement inné vs sociétal et de ces fameux biais de la pensée ... Ce sont des personnes telles que vous qui stimulent ma curiosité, merci !

Je me souviens encore de ce que **tu** me disais : *'On ne vieillit pas, on grandit'*, effectivement tout est relatif ! **À toi** qui a provoqué ce déclic en moi, en me demandant de respirer et de m'écouter, alors que je n'arrivais pas à rester sans rien faire. Vivre l'instant présent, ressentir les émotions et les accepter pour être en harmonie ... **À ce père spirituel** pour m'avoir aidé à rester à l'écoute durant ces derniers mois et à toutes ces conversations diverses que nous avons le soir. Tu es un exemple de sérénité et d'engagement, j'aimerais pouvoir te ressembler plus tard ! J'ai d'ailleurs commencé ce cheminement, en faisant des choix parfois difficiles, mais primordiaux, mais le chemin est long et je continuerai à trouver les clins d'œil dans mon quotidien. Comme ces moments de 'craquage total', que **toi seul** devais supporter après avoir manipulé 4 résections en une journée... Et cette chanson 'Ah ce qu'on est bien quand on est dans son bain', que tu fredonneras quand je m'en irais. Merci de m'avoir soutenue, échangé toute cette bouffe, de m'avoir raconté tous ces potins, de m'avoir fait rire par ta spontanéité, ... Pour tout ce que tu incarnes, c'est sûr nous resterons 'copines' !

À vous qui m'avez apporté scientifiquement et humainement, merci pour votre soutien, votre bienveillance et votre investissement à commenter mes présentations et à corriger ce manuscrit !

Quand on me demande ce qui compte le plus dans la vie, je réponds toujours : *la famille, la musique, le sport et la nourriture* ! **À toute cette bouffe** que j'ai engloutie par passion, gourmandise, curiosité, ennui, démotivation ou besoin ... Je resterai un ventre sur pattes quoi qu'il en soit, même s'il faut manger et terminer un gâteau à la framboise congelé. Il nous aura valu un bon fou-rire celui-là. **À vous** qui avez été des sœurs de microscopie, d'analyse et de bonbeks, merci d'avoir communiqué votre enthousiasme, vos doutes et vos minouchas. Toutes ces heures passées en votre compagnie vont me manquer. **À toi et la pièce rapportée** que j'ai appris à connaître tardivement, vous inspirez la beauté de l'Humanité : simplicité et générosité à foison ! J'ai été honorée de partager ce moment si spécial à vos côtés et ce très beau voyage. J'espère que notre amitié grandira.

À toutes ces bonbeks et chocolats que **tu** me rackettais, ton impulsivité et ta spontanéité m'ont tellement fait rire. J'espère que tu trouveras une autre âme charitable avec qui discuté et raconté ces histoires du net délirantes, entre 2 manip'. Pour avoir partagé ces moments loufoques à trois, ri à vos blagues cruelles et pour avoir décompressé en votre compagnie, merci ! **Tu** as fait le bon choix en te posant ces questions et je sais que tu trouveras vite ta voie ! Je vous souhaite le meilleur à tous les deux.

À toutes ces tartes aux poireaux que **tu** m'as cuisinée pendant mes lessives, ce coup de tête à Saint Jean de Luz et toutes ces discussions sérieuses, enflammées et utopiques que nous avons en courant ! Tu es devenue une amie rare, merci d'être là !

À vous qui voulez que je mange épicé, que je continue à manger local ou au contraire que je mange salé, gras et chimique et que je me mette au houblon, merci pour tous ces moments partagés, intenses, joyeux, délirants et haut en couleur ! Pour votre présence, soutien, surnoms tordus, color run partagée et vos réparties cinglantes, vous faites la différence et ça fait chaud au cœur ! Mention spéciale **à toi** qui, un soir t'es noyé dans tes pensées et nous a fait vivre un moment particulier : Tu es aussi beau à l'intérieur qu'à l'extérieur, aies confiance en toi, tu mérites ce que tu possèdes aujourd'hui !

Sur ma route, j'ai également rencontré des personnes atypiques, qui m'ont permis de prendre du recul sur cette thèse ... **À ces covoitureurs** qui m'ont raconté leur vie, pas toujours idyllique, et qui m'ont fait d'autant plus prendre conscience que la mienne est vraiment pas mal !

À toi, pour ces plats partagés le soir en secret, ces sorties et ces soirées toujours mémorables et surtout pour tes blagues uniques qui vont me manquer au quotidien, merci ! Tu as bientôt fini, courage !

Il suffisait de rentrer dans ce bureau international, pour comprendre à quel point nous étions liés dans cette aventure : des joies, des rires, des cris et des déceptions ... Nous avons avancé ensemble et vous m'avez fait grandir, merci ! **À toi** qui me fait confiance et qui me connais, à ces soirées 'so suuuper coool' et tout le reste, tiens le coup, c'est bientôt fini et tu apprécieras de nouveau ta vie, j'en suis sûre ! Quant **à toi** qui me pousse à devenir une meilleure personne chaque jour, merci pour tous tes conseils et ta bienveillance. Vos mots inventés ou vos expressions mal tournées me manqueront ! *Trainees Forever, à consommer de préférence avant le ...*

Pour avoir rythmé mes dimanches 'en famille', merci **à ces voisins** en or, qui prouvent que la bonté existe juste en face de nous ! À toutes ces soupes, tartes, galettes et couscous qui n'ont pas eu le temps de moisir et qui ont comblé ce ventre sur pattes ! Vous m'avez soutenue à chaque moment, je vous souhaite le meilleur pour l'avenir !

Nous ne sommes rien sans nos proches. Alors **à cette famille** que j'ai choisie et qui chaque été depuis 7 ans, me ramène à la réalité et aux vraies valeurs humaines. **À vous** tous qui m'avez fait confiance pour vous faire vivre des vacances de rêve, des soirées inoubliables et ces moments de partage. Nous sommes présents pour vous apporter réconfort et douceur et pourtant, c'est vous qui nous donné tant en un simple regard, sourire ou en nous disant merci ! Cette proximité et cette intensité que nous vivons en si peu de temps, décuplent nos émotions et cette année particulièrement **vous** m'avez tant donné et m'avez permis de me ressourcer. Je ne peux plus compter mes étés sans vous, sans votre bonté, vos délires et votre sourire ! *Trop de sentiments !* Je crois d'ailleurs que le coup de foudre amical existe, mention spéciale **à mes chéris d'amours**, que j'arrive finalement à faire chialer ! À nos batailles de sucre, de café, de farine ou d'herbe, qui émerveillent ma folie et nous rapprochent tant. Cœur, cœur, love, love !

Mon répertoire musical, bien trop industriel ou zen, s'est étoffé et continuera d'ambiancer nos soirées, grâce à **vous deux**. Vous avez été des piliers dans cette aventure commune et pour tout ce que nous avons partagé et que nous continuerons à vivre, je vous en serai à jamais reconnaissante ! J'ai tellement eu de plaisir à vous côtoyer chaque jour et à entretenir cette relation familiale. Au-delà d'une simple étude, j'aurai tellement aimé vous avoir comme directeurs de thèse, au vu de votre savoir, de votre humilité, de votre pédagogie et ô combien vous croyez en moi ! Merci pour tout ! **À cette pièce rapportée**, tu as été si présente, réconfortante et tu m'as boostée pour continuer de donner le meilleur de moi-même. Tu es une si belle personne. Merci d'être présente !

À ces amis rares et véritables, avec qui j'ai grandi, dansé, ri, crié et pleuré, ... vous êtes de vraies pépites !

À toi qui m'as enrôlée dans cette famille 'trop de sentiments', qui m'a poussée à prendre confiance en moi et à accepter ma folie, merci d'être présent malgré la distance ! Je sais que je pourrais toujours compter sur toi et inversement !

À toi ma biatch préférée, ton assurance et ta beauté me fascinent. À chaque fois que nous sommes ensemble, tu me fais sentir libre et c'est ça qu'est bon ! Je n'ai qu'une chose à te dire : Crois en toi, relaxe et tout ira parfaitement !

À toi qui me suis dans mes délires, qui m'emportes dans les tiens, avec une telle insouciance ... Ta force et ta douceur font de toi une personne remarquable, qui certes, préférerais rester ..., merci pour tous ces moments !

À cette mangeuse de bananes ... Nos séances d'athlétisme vendant du rêve, nos fous-rires après une remarque pertinente et tes danses en sac poubelle me manquent tant ... Bob Marley résonne toujours en moi ! À notre amitié !

À toi l'acolyte, qui ne semble être que le second, tu existes à part entière ! Je t'ai vu évoluer et devenir l'Homme que tu es aujourd'hui : admirable, loyal et sincère. J'apprécie toujours autant tes compliments '*moche & grasse*' et tes phrases mythiques '*ça ne coûte pas cher, c'est lui qui ...*'. Tu es exceptionnel et je suis fière d'avoir un ami tel que toi, merci !

Enfin, **à la plus vieille des amitiés** qui me porte à chaque instant de ma vie. Je revois encore cette petite fille fragile et timide, qui pourtant rayonnait déjà. Tu es devenue une femme ravissante et une amie en or ! Merci d'être présente à mes côtés !

Ce manuscrit n'existerait pas si je n'avais pas été portée à bout de bras par ces belles personnes, qui ont cru en moi ! **MERCI** encore !

Au meilleur des meilleurs, celui qui pardonne ma maladresse, qui me rassure, crois en moi et m'élève, merci d'être présent chaque jour à mes côtés ! Si tout le monde avait au moins un ami tel que toi, le monde serait une utopie ! Je n'ai pas besoin d'écrire ce que je pense de toi, puisque tu le sais déjà. Cette relation pure et intense, fait ressortir le meilleur en chacun de nous. Quoi qu'il arrive, c'est certain, nous resterons *Binômes pour la vie* ! Merci, merci, merci d'être là !

Pour finir ces remerciements, ces dernières lignes seront dédiées à ma famille, *je vous aime* !

À toi grand frère, j'admire la personne que tu es devenue et ces valeurs que tu incarnes. Je suis fière d'être ta petite sœur et je serai toujours présente dans les moments de joie et de peine !

Au Petit, ... Je te revois plus jeune, insouciant, zen et heureux, entouré de cette nature et de ce petit oiseau sur ton épaule ... Je sais que tu trouveras l'harmonie qui te rendra à nouveau heureux ! Écoute-toi & crois en toi ! Sache que tu peux compter sur moi dans n'importe quelle circonstance.

Merci **M'man**, pour tout ce que tu m'as apportée dans ma vie et ces longs derniers mois, pour ta présence et ton amour inconditionnel ! Tu es la première personne qui a contribué à devenir les personnes que nous sommes aujourd'hui, tu peux en être fière ! Je te souhaite du plus profond de mon cœur, que tes rêves se réalisent et que tu trouves la sérénité et la reconnaissance dont tu mérites. Je sais que ton envol est proche, continue de tenir le coup, tu y es presque !

Une nouvelle page se tourne ... Une expérience se termine, mais le chemin reste long et déborde d'itinéraires bis, de nouvelles rencontres et d'émotions à partager.

Serment éthique des chercheurs¹

« Pour ce qui dépendra de moi, éclairé(e) par ma conscience et devant mes maîtres, je jure d'être fidèle:

-à poursuivre la recherche de la vérité en vue de contribuer à l'accroissement des connaissances par la science et à la plus large diffusion du savoir, dans le respect de toute personne humaine et du patrimoine naturel de l'humanité ;

-à soulager les souffrances de tous les êtres vivants. Admis (e) à avoir accès à l'intimité tissulaire ou génétique des personnes, je tairai leur identité et m'astreindrai au secret médical ;

-à ne point faire servir mes connaissances, mes inventions et les applications que je pourrais tirer de celles-ci à la violence, à la destruction ou à la mort, à la croissance de la misère ou de l'ignorance, à l'asservissement ou l'inégalité ;

-à les partager et les dévouer, au contraire, à l'égalité entre les hommes, à leur survie, leur élévation et leur liberté ;

- à préserver l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission ;

- à intervenir pour défendre, s'il m'en est donné l'occasion, l'ensemble de ces règles ;

Que la communauté scientifique m'accorde son estime si je suis fidèle à mes engagements.

Que le déshonneur m'accompagne si j'y manquais.»

¹Ce serment est une adaptation du serment adopté à l'unanimité lors du colloque CIRUISEF 2016, basé sur une proposition de Pierre Léna (qui était également une adaptation du « serment du scientifique » (cf. « le trésor-dictionnaire des sciences » 1997)), ainsi que du serment approuvé par le ministère de l'Éducation Nationale en 2000. Souhaitons qu'il soit adopté officiellement dans toutes les universités concernées.

Pour ce qui est de l'avenir, il ne s'agit pas de le prévoir, mais de le rendre possible – *Saint Exupéry*

Table des matières

Résumé.....	5
Index des figures et des tables.....	7
Abréviations.....	10
PARTIE I – ETAT DE L’ART BIBLIOGRAPHIQUE	13
CHAPITRE I – LE CÔLON	13
I/ ORGANISATION ET STRUCTURE DU COLON.....	14
1) Organisation et fonction du côlon.....	14
2) Structure du côlon.....	16
II/ EPITHELIUM COLIQUE.....	17
1) Epithélium colique au cours du développement.....	17
2) Composition cellulaire de l’épithélium colique mûre.....	18
3) Les cellules souches et leurs rôles dans le renouvellement épithélial.....	19
III/ LE MAINTIEN DE L’HOMEOSTASIE DE L’EPITHELIUM COLIQUE.....	22
1) Composition du microenvironnement.....	22
2) Voies de signalisation impliquées.....	23
a) La voie de signalisation Wnt/ β caténine.....	24
b) La voie de signalisation Notch.....	25
c) La voie de signalisation BMP.....	25
d) La voie de signalisation Hedgehog.....	26
e) La voie de signalisation Hippo.....	26
CHAPITRE II – ALTERATIONS DE LA CRYPTÉ COLIQUE EN CONTEXTE PATHOLOGIQUE.....	29
I/ LA REGENERATION DE LA CRYPTÉ COLIQUE EN CONDITION INFLAMMATOIRE.....	30
1) Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l’Intestin (MICI).....	30
a) Epidémiologie.....	30
b) Anatomopathologie.....	31
2) Etiologie des MICI.....	32
3) Réponse inflammatoire des MICI.....	33
4) Prise en charge thérapeutique des MICI et ses limites.....	35
a) Thérapeutique de la phase aiguë des MICI.....	35
b) Thérapeutique de la phase chronique des MICI.....	36
II/ LES ALTERATIONS DE LA CRYPTÉ COLIQUE EN CONTEXTE CANCEREUX.....	37
1) Le cancer colorectal (CCR).....	37
a) Aspects épidémiologiques et étiologiques.....	37
b) Classification anatomopathologique et clinique des tumeurs colorectales.....	40
2) Carcinogénèse colorectale et voies de signalisation dérégulées.....	42
a) L’instabilité chromosomique (Chromosome Instability-CIN).....	42

b) L'instabilité des microsatellites (MicroSatellite Instability-MIN).....	43
c) Les hyperméthylations des îlots CpG des promoteurs (CpG Island Methylator Phenotype-CIMP).....	44
d) Implication des protéases et de leurs récepteurs dans un contexte de cancérisation	45
3) <i>Cellules initiatrices de cancer</i>	45
4) <i>Prise en charge thérapeutique et ses limites</i>	47
a) La chirurgie	47
b) La chimiothérapie	47
c) Les thérapies ciblées	48
CHAPITRE III –LA THROMBINE, PROTEASE AUX MULTIPLES FONCTIONS.....	50
I/ <i>LA THROMBINE</i>	51
1) <i>Généralités</i>	51
2) <i>Structure, activité et régulation</i>	51
a) Structure.....	51
b) Régulation de l'activité.....	52
II/ <i>LES PARs (PROTEASE-ACTIVATED RECEPTORS)</i>	55
1) <i>Découverte et structure</i>	55
a) Découverte.....	55
b) Structure.....	56
2) <i>Mécanismes de régulation des PARs</i>	57
a) Activation des PARs.....	57
b) Transduction du signal	61
c) Terminaison du signal	62
3) <i>Rôles physiologiques et pathologiques des PARs dans le côlon</i>	63
a) Implication des PARs dans les processus physiopathologiques.....	63
b) Fonctions physiopathologiques de la thrombine au travers de l'activation des PARs	66
4) <i>Modulation de l'activation de PAR₁ et de PAR₄</i>	67
a) Modulation de l'activation de PAR ₁	67
b) Modulation de l'activation de PAR ₄	68
CHAPITRE IV –LE MODELE D'ETUDE EX VIVO – LES ORGANOÏDES DE CÔLON HUMAIN	70
I/ <i>GENERALITES</i>	71
1) <i>Evolution du modèle organoïde</i>	71
2) <i>Première exploitation du modèle pour comprendre les mécanismes de morphogenèse</i>	73
3) <i>Les organoïdes intestinaux et coliques</i>	73
II/ <i>CULTURE EX VIVO D'ORGANOÏDES COLIQUES</i>	74
1) <i>Reconstitution du microenvironnement des cellules souches</i>	74
a) Régulation de la survie des cellules souches	74
b) Régulation de la prolifération des cellules souches.....	75
c) Régulation de la différenciation des cellules souches	75
2) <i>Génération d'un épithélium colique humain</i>	76
3) <i>Intérêts et limites du modèle ex vivo organoïde</i>	77
a) Avantages et limites des lignées cellulaires tumorales.....	77
c) Avantages et limites des PDX (Patient-Derived Xenografts).....	77

d) Avantages et limites du modèle organoïde	78
III/ APPLICATIONS THERAPEUTIQUES POUR LES PATHOLOGIQUES COLIQUES	79
1) Utilisation thérapeutique du modèle organoïde colique	79
2) Systèmes à haut débit pour l'analyse des organoïdes	80
3) Pathologies intestinales, organoïdes et analyse à haut débit	81
OBJECTIFS DE LA THESE	83
PARTIE II – RESULTATS EXPERIMENTAUX	85
I/ LA THROMBINE MODIFIE LA CROISSANCE, LA PROLIFERATION ET L'APOPTOSE DES ORGANOÏDES DE COLON HUMAIN : UN MECANISME PAR1 ET PAR4 DEPENDANT	86
<i>Préambule</i>	87
<i>Abstract</i>	89
A) <i>Introduction</i>	90
B) <i>Methods</i>	91
a) Human samples	91
b) Organoids culture	91
c) Treatments with thrombin and antagonists	91
d) Images of culture and analysis	92
e) Metabolic activity assay	92
f) Apoptosis assay	92
g) Proliferation measure	92
h) Statistical analysis	93
C) <i>Results</i>	94
1) <i>Characterization of organoid cultures</i>	94
2) <i>Effects of Thrombin exposure on human colon organoid culture</i>	95
3) <i>Thrombin-induced effects on human colon organoid cultures are mediated by the activation of both PAR1 and PAR4</i>	99
D) <i>Discussion</i>	100
E) <i>Conclusion</i>	103
F) <i>Supplementary Data</i>	104
G) <i>References</i>	105
II/ ACTIVITE METABOLIQUE DANS LES ORGANOÏDES INFLAMMATOIRES ISSUS DE COLON DE PATIENTS ATTEINTS DE MICI	107
A) <i>Introduction</i>	108
B) <i>Méthodologie</i>	109
a) Echantillons coliques humains	109
b) Isolement et culture de cryptes coliques	109
c) Traitements	109
d) Suivi des cultures	110
e) Analyse de l'activité métabolique	110
f) Analyse statistique	110
C) <i>Résultats</i>	110

a) Les organoïdes issus de patients atteints de MICI présentent une diminution de l'activité métabolique	110
b) Le cocktail de cytokines pro-inflammatoires permet d'induire un phénotype inflammatoire à des organoïdes contrôles	111
D) <i>Discussion</i>	112
E) <i>Conclusion</i>	113
III/ DEVELOPPEMENT D'UNE ANALYSE PAR HIGH-CONTENT SCREENING (HCS) APPLIQUEE AU MODELE <i>EX VIVO</i>	
ORGANOÏDE	114
A) <i>Introduction</i>	115
B) <i>Méthodologie et résultats</i>	117
1) <i>Réadaptation des conditions de culture d'organoïdes pour leur analyse en HCS</i>	117
a) Conditions de culture précédentes	117
b) Conditions de culture optimisées actuelles.....	118
2) <i>Suivi de la culture d'organoïdes</i>	120
a) Suivi de la viabilité	120
b) Suivi de l'apoptose.....	121
3) <i>Caractérisation phénotypique des organoïdes de côlon humain</i>	124
a) Comparaison de différents systèmes HCS.....	124
b) Développement du traitement et de l'analyse d'images pour la caractérisation du modèle organoïde.....	130
C) <i>Discussion</i>	134
D) <i>Conclusion et Perspectives</i>	135
PARTIE III – CONCLUSION	137
PARTIE IV – ANNEXES	142
PARTIE V – BIBLIOGRAPHIE	189

Résumé

La **thrombine**, une protéase à sérine connue pour être l'acteur clé de la cascade de coagulation, a été décrite pour réguler les processus apoptotiques au niveau du côlon via l'activation de récepteurs activés par des protéases ou PARs (Protease-Activated Receptors). Cependant, les effets de la thrombine sur la cellule épithéliale colique n'ont été étudiés qu'en utilisant des lignées cellulaires. Les conséquences d'une exposition à différentes doses de thrombine sur un épithélium complexe, composés de différents types cellulaires plus ou moins différenciés sont inconnues à ce jour. Un nouveau modèle cellulaire, nommé **organoïde**, permet de reconstituer un épithélium colique fonctionnel en 3-dimensions (3D) à partir de résections ou de biopsies humaines, et ce, grâce aux capacités d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules souches issues des cryptes coliques.

Le 1^{er} objectif de ma thèse a été d'évaluer les **effets de la thrombine sur la survie, la prolifération, l'apoptose et la différenciation** de l'épithélium colique humain, en utilisant le modèle organoïde. Puis, de déterminer l'implication des récepteurs PAR₁ et PAR₄ activés par la thrombine dans ces effets. Ainsi, l'ajout de thrombine (à faible dose : 10mU/mL et à forte dose : 50mU/mL) sur une culture d'organoïdes établis à partir de tissus colorectaux normaux entraîne une **diminution de moitié de l'activité métabolique** et de la **prolifération cellulaire**. Ces effets sont bloqués en présence d'un antagoniste de PAR₁. Le **processus apoptotique** est, cependant, **augmenté d'un facteur 8** en réponse à la thrombine (aux deux doses). Ce processus est inhibé en présence d'antagoniste de PAR₁ ou de PAR₄. Concernant la différenciation épithéliale, la thrombine **diminue le nombre de colonosphères** (structures immatures), au profit d'une **augmentation du nombre de structures apoptotiques et de colonoïdes** (structures plus matures présentant des néo-cryptes). Cet effet est dû à **l'activation à la fois de PAR₁ et de PAR₄** dans les cellules épithéliales coliques. Mes résultats démontrent que la thrombine exogène agit sur les processus d'apoptose, de prolifération et de différenciation sur un épithélium complexe, issu de la culture de tissus humains.

L'utilisation de ce modèle *ex vivo* permet de comparer les organoïdes pathologiques et normaux, voire **de tester les effets d'approches pharmacologiques et de nouveaux médicaments sur ces cultures**. Ainsi, la 2^{nde} partie de ce travail de thèse a été d'aborder la mise en place **des conditions de culture et d'imagerie nécessaires pour réaliser un criblage à haut débit robuste et reproductible**, HCS (High-Content Screening), sur des organoïdes. Les conditions de culture d'organoïdes en plaques 96-puits ont été mises au point de même que les conditions permettant d'acquérir des images répondant aux critères nécessaires pour une analyse via un système HCS. Le système Operetta HCS couplé au logiciel d'Analyse Harmony (PerkinElmer) a été utilisé pour mettre en place une procédure d'analyse permettant de **reconnaître les organoïdes, de les dénombrer, de les classer selon leur état de différenciation et de suivre leur croissance** tout au long de la culture.

Pour conclure, ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence les effets de la thrombine sur l'état métabolique, l'apoptose et la différenciation de l'épithélium colique humain, grâce au modèle 3D *ex vivo* d'organoïdes colorectaux. L'utilisation de ce modèle complète les approches jusque-là effectuées dans des modèles de lignées de cellules épithéliales, proposant une vision intégrée du comportement d'un épithélium complexe humain. L'approche HCS initiée lors de

ces travaux de thèse pourrait permettre d'analyser de façon robuste et automatisée dans ce modèle, les effets d'autres composés et avoir ainsi un impact majeur sur notre compréhension des pathologies épithéliales et sur les tests de nouvelles approches thérapeutiques.

Index des figures et des tables

PARTIE I / ETAT DE L'ART BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I – LE CÔLON

Figure 1 : Représentation schématique du système digestif de l'Homme.

Figure 2 : Représentation schématique de la vascularisation artérielle du côlon.

Figure 3 : Représentation schématique des différentes couches du côlon humain.

Figure 4 : Composition cellulaire de l'épithélium colique humain.

Figure 5 : Les cellules souches intestinales.

Figure 6 : Les voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie des cellules souches coliques.

Figure 7 : L'environnement de la crypte.

Figure 8 : L'implication de la voie de signalisation Hippo.

CHAPITRE II – ALTERATIONS DE LA CRYPTÉ COLIQUE EN CONTEXTE PATHOLOGIQUE

Figure 9 : Incidence des MICI à travers le monde

Figure 10 : Anatomopathologie de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique.

Figure 11 : Répartition de l'incidence et de la mortalité pour les hommes et les femmes à travers le monde, pour 100 000 habitants.

Figure 12 : Coupe histologique d'un foyer de cryptes aberrantes colique d'un patient atteint d'un cancer sporadique.

Tableau 1 : Classification clinique des cancers colorectaux.

Figure 13 : La séquence de carcinogenèse colorectale du polype au cancer.

CHAPITRE III – LA THROMBINE, PROTEASE AUX MULTIPLES FONCTIONS

Figure 14 : Structure schématique de la thrombine.

Figure 15 : Représentation de la cascade de coagulation

Figure 16 : Structure des Protease-Activated Receptors.

Figure 17 : Co-activation de PAR₄

Figure 18 : Transactivation de PAR₂ via PAR₁.

Figure 19 : Désensibilisation des PARs.

Figure 20 : Désensibilisation des PARs.

Figure 21 : Structure chimique du F16357

Figure 22 : Structure chimique du ML354.

CHAPITRE IV – LE MODELE D'ETUDE *EX VIVO* – LES ORGANOÏDES DE CÔLON HUMAIN

Figure 23 : Représentation schématique d'un organoïde de côlon.

Figure 24 : Structures issues de cryptes intestinales murines.

LA THROMBINE MODIFIE LA CROISSANCE, LA PROLIFERATION ET L'APOPTOSE DES ORGANOÏDES DE COLON HUMAIN : UN MECANISME PAR1 ET PAR4 DEPENDANT

Figure 1: Organoid characterization

Figure 2: Effects of thrombin on organoid characteristics

Figure 3: Effects of thrombin on organoid metabolic activity

Figure 4: Effects of thrombin on organoid cell apoptosis

Figure 5: Effects of thrombin on organoid cell proliferation

Figure 6: Effects of PAR1 and PAR4 antagonists on thrombin-induced changes in metabolic activity, apoptosis and cell proliferation

Supplementary Table 1: Characteristics and outcomes of control patients

Supplementary Figure 1: Schedule of experiments

ACTIVITE METABOLIQUE DANS LES ORGANOÏDES INFLAMMATOIRES ISSUS DE COLON DE PATIENTS ATTEINTS DE MICI

Figure 1 : Activité métabolique relative des cultures d'organoïdes contrôles, contrôles stimulés inflammatoires et inflammatoires, après 6 ou 9 jours de culture.

DEVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE DE SCREENING, APPLIQUEE AUX ORGANOÏDES, AFIN D'ETUDIER DES CIBLES THERAPEUTIQUES DANS LES PATHOLOGIES INTESTINALES

Figure 1 : Culture d'organoïdes dans des plaques Labteck 8 puits et visualisation d'une structure en imagerie 3D.

Figure 2 : Conditions de culture incompatibles avec une analyse HCS.

Figure 3 : Plaque 96 puits μ -angiogenesis, Ibidi, Biovalley.

Figure 4 : Comparaison de l'évolution de la culture d'organoïde sur 9 jours selon la plaque utilisée et le volume de matrigel déposé.

Figure 5 : Comparaison des kits de suivi de viabilité de la culture d'organoïde sur 6 jours.

Figure 6 : Identification de cellules apoptotiques au sein d'un organoïde de côlon humain.

Figure 7 : Schéma de la fonction d'étalement du point, ou PSF (Point Spread Function) et effet de la différence d'indices de réfraction sur la PSF.

Figure 8 : Schéma comparatif des systèmes champ large et confocal.

Figure 9 : Suivi d'une culture d'organoïdes de côlon humain.

Figure 10 : Acquisition d'un organoïde de côlon humain réalisé via l'Operetta™ (4.2), sans module confocal.

Figure 11 : Acquisition d'un organoïde de côlon humain réalisé via l'Operetta™ (4.2).

Table 1 : Comparatif des spécifications des HCS utilisés.

Figure 12 : Acquisition d'un organoïde de côlon humain réalisé via l'Opera Phenix™ (4.5).

Figure 13 : Processus de traitement d'images 3D via Harmony® (PerkinElmer).

Figure 14 : Programme de traitement d'images et d'analyse créé par l'utilisation et l'ajustement de blocs de calculs proposés dans Harmony® sur l'Operetta™.

Figure 15 : Suivi de l'évolution des différentes classes de structures issues de la culture de cryptes coliques humaines ensemencées.

Abréviations

2D : 2-Dimensions	FVII : Factor VII
3D : 3-Dimensions	FVIII : Factor VIII
5-ASA : Acide 5-AminoSalicylique	FX : Factor X
5-FU : 5-FluoroUracile	FXI : Factor XI
A : Adénine	G : Guanine
ADAM10 : A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 10	GDP : Guanosine DiPhosphate
AdC : Adenylate Cyclase	GRK : G-protein Receptor Kinase
ADN : Acide DesoxyriboNucléique	GSK3β : Glycogen Synthase Kinase 3 β
AMPc : Adenosine MonoPhosphate Cyclique	GTP : Guanosine TriPhosphate
AOM : AzOxyMethane	HBD : Human β Defensin
AP2 : Activating Protein 2	HCS : High-Content Screening
APC : Adenomatous Poliposis Coli	hES : human Embryonic Stem
ARNm : Acide RiboNucléique messenger	HGF : Hepatocyte Growth Factor
Asp : Aspartate	His : Histidine
ATP : Adenosine TriPhosphate	HNPCC : Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
BMP : Bone Morphogenetic Protein	HTS : High-Throughput Screening
BUB1 : Budding Uninhibited by Benzimidazoles	ICL : intracellular Loop
C : Cytosine	IgA : ImmunoGlobuline A
CBC cells : Crypt Base Columnar cells	Ihh : Indian Hedgehog
CCR : Cancer ColoRectal / CRC : ColoRectal Cancer	IL : InterLeukine
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator	INFγ : Interferon γ
CGPR : Calcitonin Gene-Related Peptide	IP3 : Inositol Triphosphate
CK1 : Casein Kinase 1	ISC : Intestinal Stem cells
CRISPR-Cas9 : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated 9	kDa : kiloDalton
CXCL8 : C-X-C motif Chemokine Ligand 8	KO : Knock Out
DBPS : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	LGR5 : Leucine-Rich Repeat Containing G-protein coupled Receptor 5
DII : Delta	LOH : Loss of Heterozygoty
DSS : Dextran Sulfate Sodium	LRC : Label-Retaining Cell / +4 cells
DTT : Dithiothreitol	LSFM : Light Sheet Fluorescence Microscopy
E.Coli : <i>Escherichia Coli</i>	MAP : Mitogen-Activated Protein
EC50 : Effective Concentration 50%	MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
ECL : ExtraCellular Loop	MC : Maladie de Crohn / CD : Crohn Disease
EDTA : EthyleneDiamineTetraacetic Acid	MEC : Matrice ExtraCellulaire
EGF : Epidermal Growth Factor	MEK1/2 : Mitogen-Activated Protein kinase Kinase 1/2
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor	MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
EHS : Engelbreth-Holm-Swarm	MLCK : Myosin Light-Chain Kinase
ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2	MLH1 : MutL Homolog 1
FCA : Foyer de Cryptes Aberrantes	mmHg : millimètre de Mercure
FIX : Factor IX	MMP : Matrix Metalloproteinase
FRET : Förster Resonance Energy Transfer	MMR : MisMatch Repair
FV : Factor V	

MSH : MutS Homolog
MSI : MicroSatellite Instability
Na⁺ : ion sodium
NAC : N-AcetylCysteine
NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NFκB : Nucleor Factor κ B
NICD : Notch IntraCellular Domain
NLR : Nucleotide Oligomerization domain Receptor
NOD2 : Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2
PAF : Polypose Adénomateuse Familiale
PAM : Polypose Associée aux mutations MUTYH
PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAR : Protease-Activated Receptor
PBS : Phosphate Buffered Saline
PI3K : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3
PI3KCa : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PLC : PhosphoLipase C
PR3 : Proteinase 3
PRR : Pathogen Recognition Receptors
PSF : Point Spread Function
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
RCH : RectoColite Hémorragique
RCPG : Récepteurs couples aux protéins G
ROS : Reactive Oxygen Species - espèces réactives de l'oxygène
RT : Room Temperature
SD : Standard Deviation
sE : Semaine Embryonnaire
SEM : Standard Error of the Mean
Ser : Serine
SFEB : Serum Free floating of Embryoid Body-like aggregates
Shh : Sonic Hedgehog
SLPI : Secretory Leukocyte Protease Inhibitor
SNX1 : Sorting NeXin1
SVF : Serum de Veau Fetal
T : Thymine
TA cells : Transit-Amplifying cells
TAP : Tick Anticoagulant Peptide
TAZ : Transcriptional coActivator with PDZ-binding motif
TF : Tissue Factor
TFPI : Tissue Factor Protein Inhibitor
TGF : Transforming Growth Factor
TGFβRII : Transforming-Growth Factor β Receptor II
THRβ : Thrombine
TLR : Toll-Like Receptors
TNFγ : Tumor Necrosis Factor γ
TP53 : Tumor Protein 3
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt : Wingless + Integration site
YAP : Yes-Associated Protein
ZO1 : Zonula Occludens 1

Chapitre I. Le côlon

I/ Organisation et structure du côlon

1) Organisation et fonction du côlon

Chez l'Homme, le processus de digestion correspondant à la dégradation des aliments, l'absorption, l'assimilation des nutriments et l'élimination des produits résiduels, est contrôlé par le système digestif. Ce dernier se compose de différents segments, dont **le côlon (ou gros intestin)** qui reçoit une matière résiduelle composée d'eau, de sels minéraux et de fibres alimentaires, provenant des aliments. Après transformation et absorption d'une partie de ces résidus, une concentration des dernières matières est réalisée sous forme de selles (ou fèces) qui seront stockées puis évacuées par le rectum et l'anus. Le côlon comprend le caecum, le côlon ascendant (côlon gauche), le côlon transverse, le côlon descendant (côlon droit) et le côlon sigmoïde aboutissant au rectum et à l'anus (Figure 1) (Microbiology, 2015).

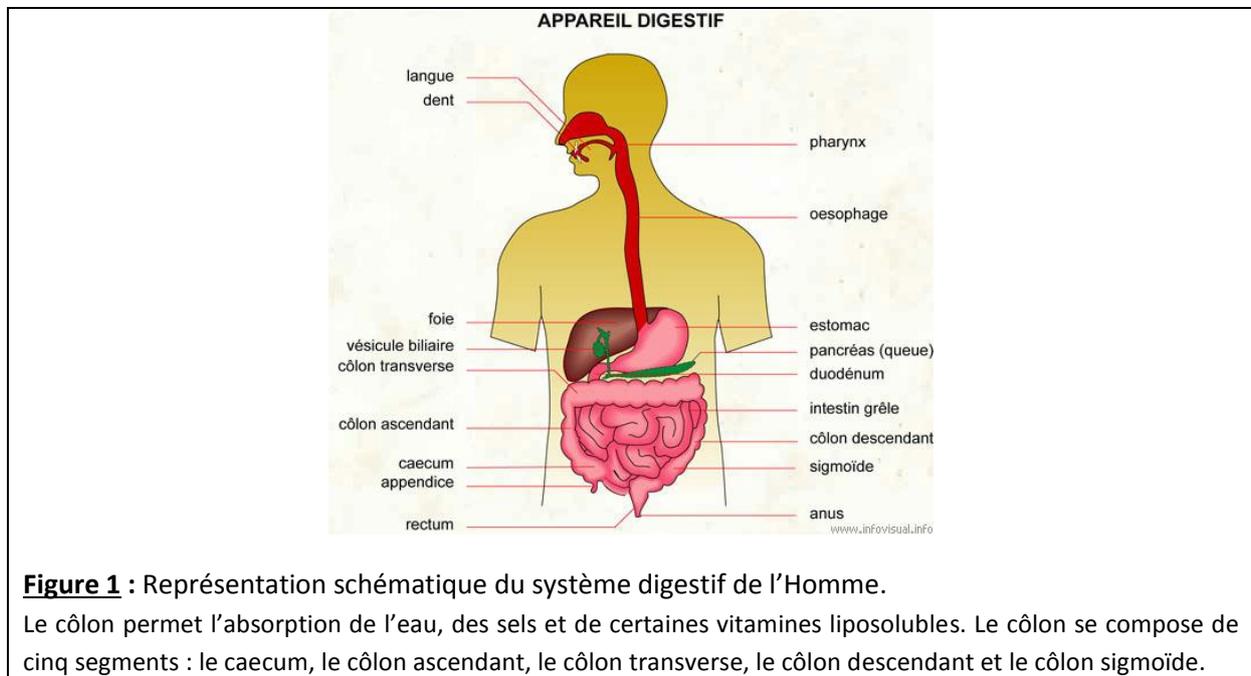


Figure 1 : Représentation schématique du système digestif de l'Homme.

Le côlon permet l'absorption de l'eau, des sels et de certaines vitamines liposolubles. Le côlon se compose de cinq segments : le caecum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant et le côlon sigmoïde.

Chaque segment colique présente des caractéristiques de **vascularisation** et d'innervation (Kadric, Mesic et al. 2003). Les artères mésentériques supérieures et inférieures se divisent en plusieurs branchements qui vascularisent les différents segments coliques (Figure 2).

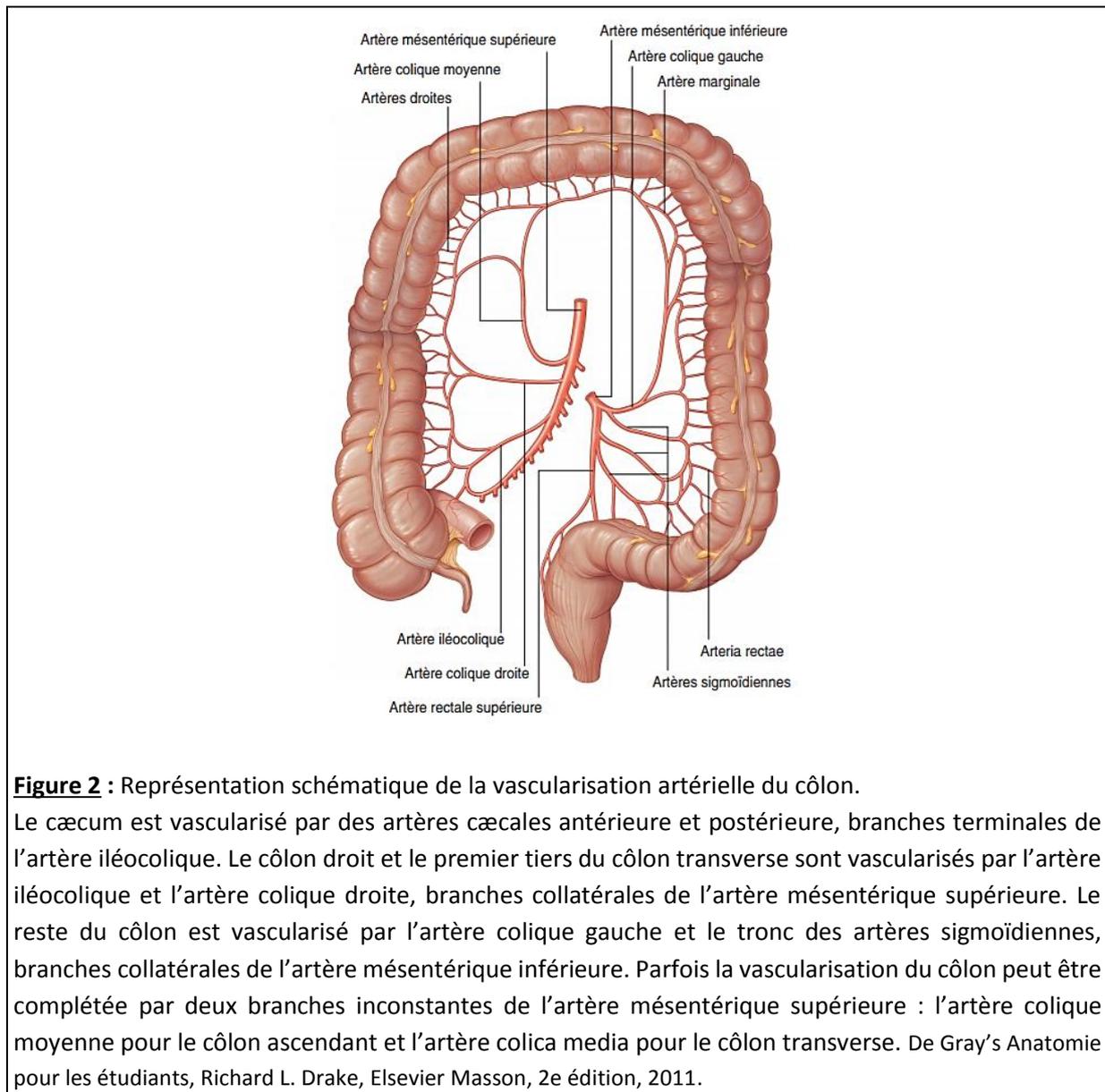


Figure 2 : Représentation schématique de la vascularisation artérielle du côlon.

Le cæcum est vascularisé par des artères cæcales antérieure et postérieure, branches terminales de l'artère iléocolique. Le côlon droit et le premier tiers du côlon transverse sont vascularisés par l'artère iléocolique et l'artère colique droite, branches collatérales de l'artère mésentérique supérieure. Le reste du côlon est vascularisé par l'artère colique gauche et le tronc des artères sigmoïdiennes, branches collatérales de l'artère mésentérique inférieure. Parfois la vascularisation du côlon peut être complétée par deux branches inconstantes de l'artère mésentérique supérieure : l'artère colique moyenne pour le côlon ascendant et l'artère colica media pour le côlon transverse. De Gray's Anatomie pour les étudiants, Richard L. Drake, Elsevier Masson, 2e édition, 2011.

L'innervation du côlon est assurée par le plexus solaire ainsi que par le plexus mésentérique supérieur et inférieur, générant un réseau nerveux associé à la paroi colique. Ainsi, **l'activité motrice** est assurée tout le long du côlon, par contractions segmentaires de faible amplitude (5 à 50 mmHg), uniques ou en courtes stimulation et non propagées. Dans le côlon distal et surtout au niveau de la région sigmoïdienne, la fréquence des contractions est plus soutenue et plus régulière, avec un rythme de trois contractions par minute. Ce type de contractions permet l'avancée du chyme (ou bol alimentaire) dans les différents segments du côlon ainsi que son élimination. Un autre type de contractions, plus caractéristique de la motricité colique puisqu'il permet une digestion rapide dès le réveil et après le petit-déjeuner par exemple, se distingue par une propagation de grande amplitude (100 à 120 mmHg).

Concernant **les fonctions du côlon**, la principale est d'assurer, grâce à ses capacités motrices et de réabsorption, une absorption hydrique optimale provoquant une **déshydratation progressive** du chyme le long de ses segments, aboutissant à la formation des fèces.

En effet, chaque jour le côlon absorbe 1,5L d'eau provenant de l'hydratation et de l'alimentation, et ceci grâce à l'absorption active du sodium. Cette capacité d'absorption hydro-électrolytique est régulée par les sels biliaires, les acides gras à chaînes courtes et certaines hormones gastro-intestinales pouvant augmenter d'un facteur 4 en cas de diarrhée aiguë.

Les **autres fonctions** du côlon sont la fermentation et la métabolisation glucidique et protéique. Elles sont assurées grâce au microbiote colique, représentant la majorité du microbiote intestinal. Celui-ci permet de métaboliser et d'assimiler les glucides et les protéines. En ce qui concerne le **métabolisme glucidique**, il s'agit de l'hydrolyse de substrats exogènes non digérés et absorbés dans l'intestin grêle, (tels que le lactose, le fructose ou les polysaccharides de fibres alimentaires) et de substrats endogènes (tels que les mucines et ceux des cellules desquamées). Cette hydrolyse conduit à la formation d'acides gras à chaînes courtes, tels que l'acide acétique, l'acide butyrique et l'acide propionique (importants pour le maintien de l'intégrité de la muqueuse colique et l'organisme) et à la formation de gaz (sulfures d'hydrogène et gaz carbonique). Quant au **métabolisme protéique**, il concerne les substrats azotés exogènes et endogènes (pancréatiques, intestinaux et bactériens). Cette protéolyse s'effectue particulièrement au niveau du côlon ascendant et permet la formation d'acides aminés, d'acides gras et de gaz, notamment. Par contre **les lipides** non digérés et non absorbés dans l'intestin grêle sont retrouvés dans les selles.

2) Structure du côlon

La paroi colique possède **5 couches fonctionnelles**, ou tuniques, se succédant de l'extérieur vers la lumière du côlon (Komuro and Hashimoto 1990) (Figure 3) :

- l'**adventice** ou **séreuse**, la tunique la plus externe, est composée de tissu conjonctif de soutien et est le lieu d'entrée des systèmes nerveux, sanguin et lymphatique, en provenance du mésentère,

- la **musculeuse**, tunique externe et épaisse, constituée de cellules musculaires longitudinales et circulaires lisses ayant une activité péristaltique autonome nécessaire au processus de digestion, et du plexus myentérique (ou d'Auerbach) innervant le côlon,

- la **sous-muqueuse**, tunique interne, est constituée d'un tissu conjonctif lâche, contenant des vaisseaux sanguins, le plexus sous-muqueux (de Meissner), ainsi que des vaisseaux lymphatiques,

- la **musculaire-muqueuse** est une fine couche séparant la sous-muqueuse de la muqueuse. Elle se compose de cellules musculaires lisses et de tissu conjonctif,

- la **muqueuse**, tunique la plus interne, composée d'un tissu conjonctif appelé chorion (ou lamina propria), riche en cellules immunitaires et fibroblastes, mais aussi en prolongements vasculaires et nerveux, ainsi que d'un **épithélium unistratifié**. Elle permet les échanges entre la lumière colique et l'organisme tout en prévenant l'entrée de pathogènes ; il s'agit donc d'une barrière physique.

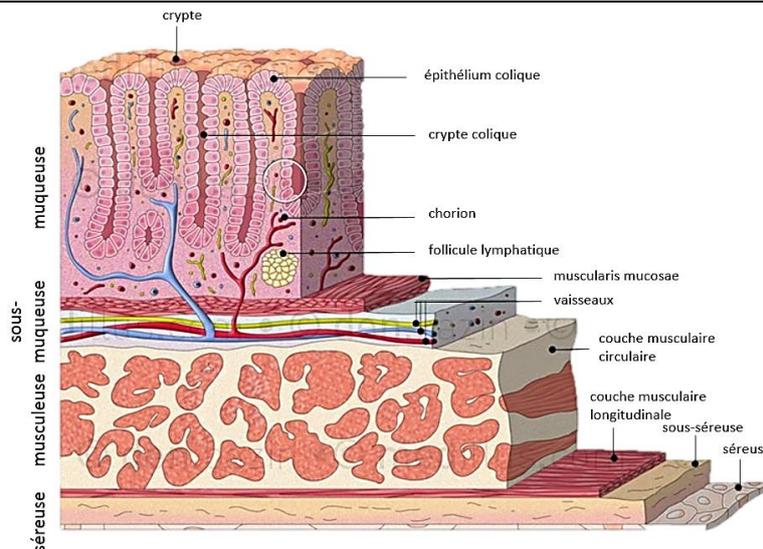


Figure 3 : Représentation schématique des différentes couches du côlon humain.

Le côlon se subdivise en 5 couches ou tuniques : de l'extérieur vers la lumière colique : la séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse, la musculaire muqueuse et la muqueuse. Schéma adapté de l'encyclopédie medillus.

II/ Epithélium colique

1) Epithélium colique au cours du développement

L'épithélium unistratifié du côlon permet d'établir une **barrière physique** entre le milieu extérieur (lumière digestive) et le milieu intérieur. Chez les vertébrés, sa mise en place au cours de **l'embryogenèse** est réalisée en plusieurs étapes. Il est issu de l'assemblage de structures endodermiques à l'origine de l'épithélium et de structures mésodermiques générant le tissu conjonctif, la séreuse et les muscles lisses. L'épithélium intestinal s'acquiert grâce à des processus conservés chez les mammifères (de Santa Barbara, van den Brink et al. 2003, Spence, Lauf et al. 2011).

Au premier stade de morphogenèse du tube digestif, **l'épithélium est pluristratifié** avec des cellules indifférenciées et très prolifératives. Puis, le mésenchyme sous-jacent se réorganise et la villogenèse débute à partir de la 8^{ème} semaine embryonnaire (sE8), dans le duodénum chez l'Homme et va s'effectuer tout le long du tube digestif (Moxey and Trier 1979). L'épithélium devient alors une **monocouche de cellules immatures** ayant des protrusions de cellules différenciées formant ainsi les villosités. A ce stade, l'intestin grêle et le côlon ne se distinguent pas encore et se composent de tous les types différenciés de cellules épithéliales (absorptives et sécrétoires, à l'exception des cellules de Paneth qui apparaissent plus tard dans le développement de l'intestin grêle) (Simon-Assmann and Keding 1993). À la 16^{ème} semaine, la **cryptogenèse** s'effectue par l'invagination des zones prolifératives et les villosités présentes au niveau du côlon vont progressivement régresser entre sE20 et sE25.

2) *Composition cellulaire de l'épithélium colique mûre*

L'**épithélium unistratifié** colique est caractérisé par son unité de base appelée glande de Lieberkühn ou **crypte** colique. La crypte se distingue par 3 compartiments cellulaires, les **cellules souches** à sa base, puis les **cellules progénitrices** (transitoires ou Transit-Amplifying cells) et les **cellules différenciées** en haut de crypte (Figure 4). L'épithélium colique se **renouvelle** de façon permanente tous les 4 à 5 jours chez l'homme, en condition physiologique (Cheng 1974, Cheng 1974, Cheng and Leblond 1974, van der Flier and Clevers 2009). Ce renouvellement est assuré par la prolifération des cellules souches et progénitrices. Les cellules différenciées de l'épithélium de surface se détachent de la lame basale et sont éliminées dans la lumière du côlon par le processus d'apoptose induit par la perte d'adhésion, appelé **anoïkis** (Creamer, Shorter et al. 1961, Potten and Loeffler 1990, Bullen, Forrest et al. 2006).

En ce qui concerne les cellules différenciées, il est possible de distinguer **deux types de lignage** en fonction de leur capacité d'absorption ou de sécrétion (Sancho, Batlle et al. 2004).

-Le **lignage absorptif** est le plus représenté dans l'épithélium colique (80% des cellules de l'épithélium colique) et est exclusivement constitué de **colonocytes**. Ces cellules cylindriques ont pour fonction d'absorber les nutriments. En effet, le côté apical présente des microvillosités permettant d'augmenter la surface d'échange avec le chyme, tout en sécrétant également des enzymes digestives telles que des hydrolases, et des immunoglobulines A capables de reconnaître les antigènes présents dans la lumière intestinale. De plus, les colonocytes participent à la fonction de barrière de l'épithélium grâce à la présence de jonctions serrées (détaillées dans le chapitre II, I/ 3), page 33).

-Le **lignage sécrétoire** est composé de trois types cellulaires : les cellules **entéroendocrines**, les cellules à mucus, ou **caliciformes** et les cellules **Tufts**.

Les cellules **entéroendocrines** ne représentent qu'1% des cellules de l'épithélium colique. Elles participent à la digestion en favorisant les sécrétions pancréatiques et de la vésicule biliaire via la sécrétion de différentes hormones telles que le glucagon, la sécrétine et la cholécystokinine. Elles contrôlent également la motricité du côlon (Lechago 1990).

Les cellules à **mucus ou caliciformes** sont 15 fois plus nombreuses que les cellules entéroendocrines (Karam 1999). Elles sont essentielles à la protection de l'épithélium colique en produisant et sécrétant du mucus constitué de glycoprotéines formant ainsi une couche protectrice vis-à-vis du chyme et incluant des bactéries commensales. Ce mucus favorise également le passage des résidus du chyme grâce à sa fonction de lubrifiant (Deplancke and Gaskins 2001). L'altération de ces cellules ou de la production de mucus peut être responsable d'un état inflammatoire (détaillé dans le chapitre II, I/ 3), page 33).

Les cellules **Tuft** représentent 0,4% des cellules de l'épithélium colique et n'ont été caractérisées que récemment (Gerbe, Legraverend et al. 2012). Elles présentent une large et haute bordure en brosse et un système tubulo-vésiculaire singulier. Les cellules Tuft sécrètent un opioïde endogène, la β -endorphine, suggérant leur implication dans la motricité intestinale, l'inflammation et la douleur (Gerbe, Brulin et al. 2009, Gerbe, van Es et al. 2011), Steele, Melchor et al. 2016).

Toutes ces cellules différenciées sont générées à partir d'un seul type cellulaire, les cellules progénitrices ou d'amplification transitoire (Transit-Amplifying - TA), qui possèdent une capacité multipotente. Ces progéniteurs prolifèrent plus rapidement (toutes les 12-16 heures) que les 4-5 cellules souches présentes dans la crypte colique (environ toutes les 36 à 72 heures) (Bjerknes and Cheng 1999, Gargett 2007).

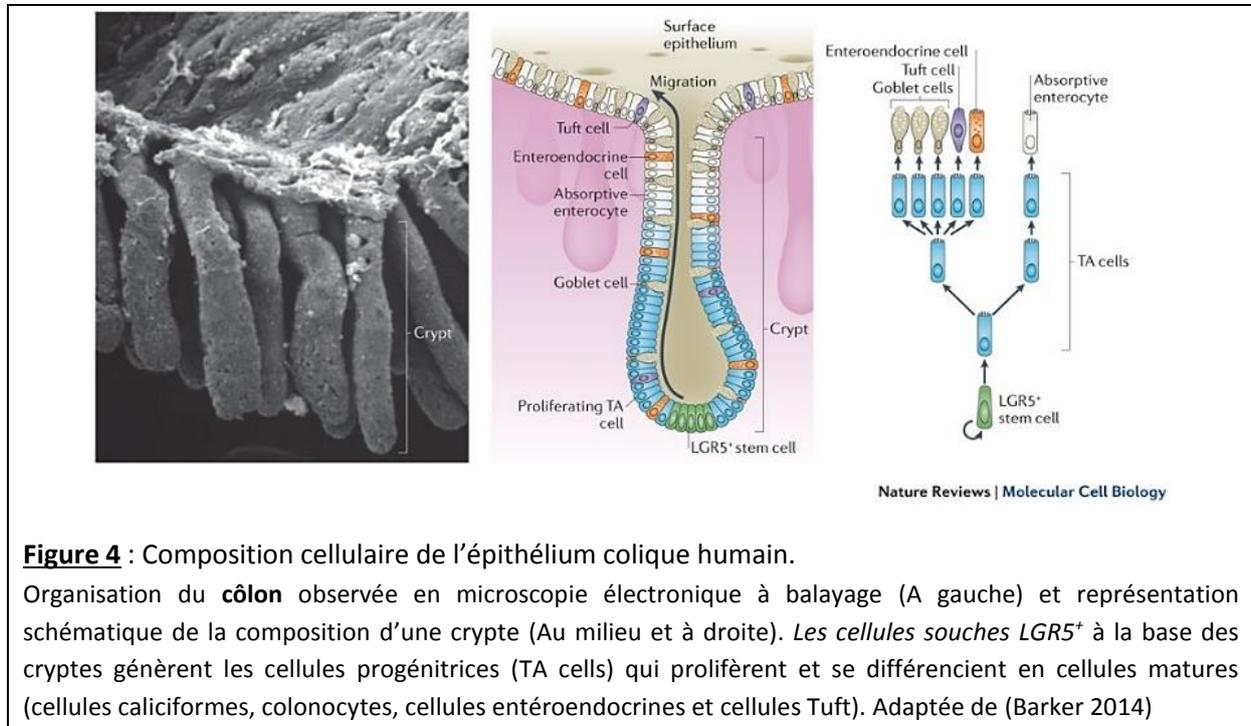


Figure 4 : Composition cellulaire de l'épithélium colique humain.

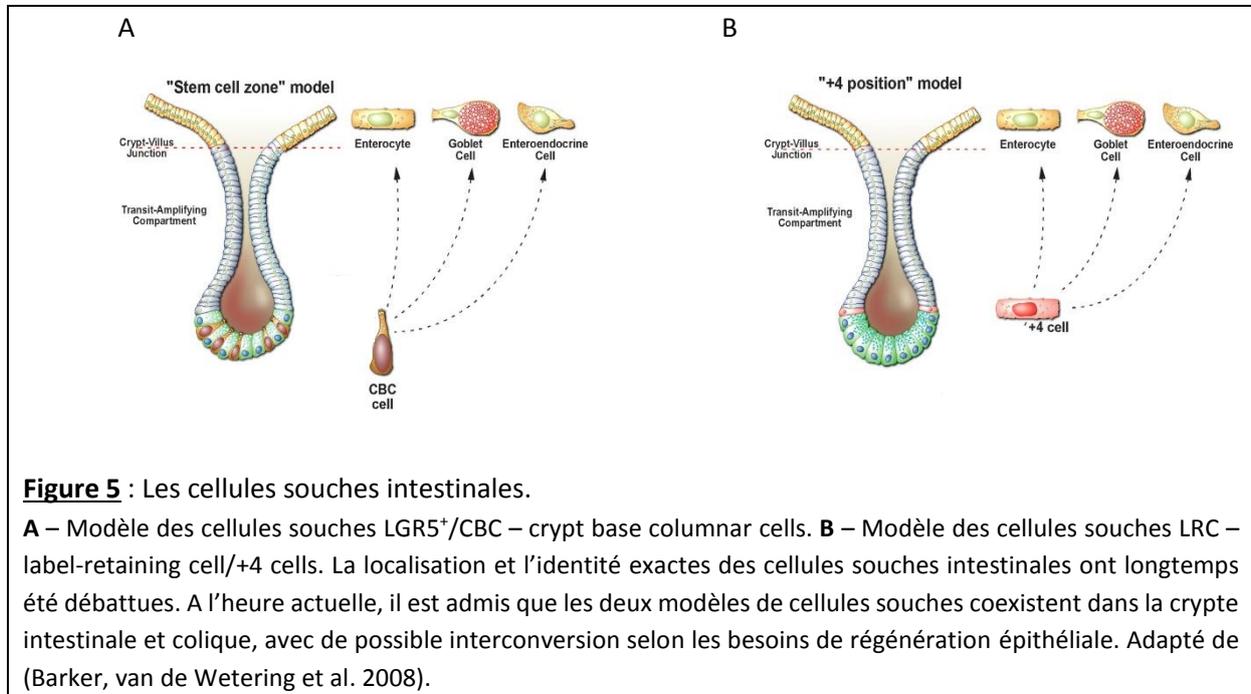
Organisation du **côlon** observée en microscopie électronique à balayage (A gauche) et représentation schématique de la composition d'une crypte (Au milieu et à droite). Les cellules souches $LGR5^+$ à la base des cryptes génèrent les cellules progénitrices (TA cells) qui prolifèrent et se différencient en cellules matures (cellules caliciformes, colonocytes, cellules entéroendocrines et cellules Tuft). Adaptée de (Barker 2014)

3) Les cellules souches et leurs rôles dans le renouvellement épithélial

Toutes les cellules coliques différenciées sont générées à partir des cellules souches de la crypte. Ces cellules souches adultes sont **multipotentes** et **s'auto-renouvellent** pour maintenir la régénération épithéliale tout le long de la vie de l'individu. De plus, ces cellules souches sont **hétérogènes** de par leur taux de prolifération et leur capacité de survie (détaillés ensuite). Elles ont également la propriété d'être **plastiques**, en s'adaptant aux variations environnementales.

L'auto-renouvellement des cellules souches est basé sur leurs **divisions cellulaires, symétriques et asymétriques**. La division symétrique génère 2 cellules souches, alors que la division asymétrique génère une cellule souche et une cellule progénitrice. Les facteurs déterminant le type de division de la cellule souche sont intrinsèques, telle que la répartition des ARNm et protéines, et extrinsèques, faisant notamment intervenir **l'adhésion cellulaire** (Knoblich 2008). L'adhésion cellulaire pourrait s'expliquer selon des **principes thermodynamiques**. En effet, Steinberg émettait l'hypothèse qu'au sein d'un tissu, il existe des cellules à faible énergie de surface et d'autres ayant une forte énergie de surface. Cette variation contraint ces cellules à se réorganiser spontanément afin de **minimiser l'énergie de surface libre** et de produire ainsi une **stabilité thermodynamique** (Steinberg 1970, Foty and Steinberg 2005). De plus, l'activité télomérase des cellules souches permet la conservation de l'intégrité du génome (Asahara, Kalka et al. 2000).

Le microenvironnement joue un rôle crucial sur l'orientation de leur division mais aussi sur leur survie et leur différenciation. La composition de ce microenvironnement sera abordée ultérieurement (page 21). Si la localisation des cellules souches ($LGR5^+$ ou CBC cells) est clairement établie au fond de crypte, plusieurs travaux ont mis en évidence une population dite de réserve (cellules +4), ayant des propriétés souches, plus haut dans la crypte, à environ 4 cellules de distance ces cellules CBC (figure 5).



Les cellules souches $LGR5^+$ ou CBC

C'est en 1974, que les **CBC** (crypt columnar base cells) ont été identifiées comme cellules souches de l'intestin, par leur immaturité, leur rapport nucléo-cytoplasmique élevé et leur multipotence, observée par un marquage à la thymidine tritiée (Cheng 1974, Cheng 1974, Cheng and Leblond 1974). L'étude des cellules souches de la crypte s'est ensuite accentuée grâce à la découverte de l'importance de la **voie Wnt/ β -caténine** dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal ainsi que dans son développement tumoral (Radtke and Clevers 2005). En effet, le gène **APC** (Adenomatous Polyposis Coli), suppresseur de tumeur et régulateur négatif de la signalisation Wnt/ β -caténine, est muté dans 80% des formes familiales et sporadiques de cancers colorectaux (Fearon 2011). Une étude transcriptomique de ces cellules cancéreuses coliques a permis d'identifier des gènes cibles de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, avec un un profil d'expression localisé en **fond de crypte** (Van der Flier, Sabates-Bellver et al. 2007). Parmi eux, le gène **LGR5** (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor 5), récemment identifié comme étant un récepteur de la R-Spondine, promeut l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (voie qui sera détaillée page 23) (Carmon, Gong et al. 2011). De plus, des expériences de 'lineage tracing' avec le modèle murin $LGR5$ -EGFP-IRES-CreERT2/Rosa26-LacZ, ont démontré les capacités **d'auto-renouvellement** et de **multipotence** des **CBC $LGR5^+$** (Barker, van Es et al. 2007).

À l'heure actuelle, d'autres marqueurs complètent la carte d'identité des CBC LGR5⁺, tels que Olfm4, Ascl2, Prom1, Sox9^{lo}, CD24^{lo}, CD166, EphB2, des protéines d'adhésion ou des facteurs de transcription soulignant l'implication du contexte environnemental dans le maintien de leur identité (van der Flier, Haegerbarth et al. 2009, Zhu, Gibson et al. 2009). Les cellules souches LGR5⁺ ont une prolifération active et entrent en compétition avec les cellules progénitrices pour l'occupation de leur niche. Il en résulte la formation monoclonale de la crypte intestinale ou colique.

Cependant, l'extinction des cellules souches LGR5⁺ dans un modèle transgénique, a permis de démontrer que les cellules LGR5⁺ n'étaient pas indispensables à l'homéostasie intestinale et que leur délétion pouvait être compensée par d'autres cellules souches de la crypte. En réalité, une hiérarchie des populations souches était ainsi mise en évidence puisque ces cellules de réserve donnaient naissance à de nouvelles cellules LGR5⁺ (Tian, Biehs et al. 2011)

Les populations souches de réserve

En parallèle de la découverte des CBC, Potten et ses collaborateurs mettaient en évidence une population cellulaire ayant des caractéristiques de cellule souche située en position +4 par rapport au fond de crypte, donc au-dessus des CBC/LGR5⁺. Ces cellules +4 retenaient le marquage de l'ADN à la thymidine tritiée sur le long terme et étaient identifiées comme des **LRC (Label-Retaining Cells)** (Potten, Kovacs et al. 1974). De plus, Potten et ses collaborateurs furent les premiers à suggérer l'existence d'une division **asymétrique** au sein de cette population, ce qui fut confirmé récemment (Potten, Owen et al. 2002, Srinivasan, Than et al. 2016).

Ces cellules souches de réserve dites 'dormantes' seraient caractérisées par un fort contrôle de leur survie et de leur prolifération par la phosphatase PTEN et l'inhibiteur d'EGFR LRIG1, et une forte expression de protéines contribuant à la protection de leur phénotype, telles que TERT et Bmi1 (Powell, Wang et al. 2012, Richmond, Shah et al. 2015). Grâce à cette capacité de survie et leur faible taux de prolifération, démontré par une résistance aux rayonnements, et leur capacité de multipotence, les LRC peuvent se diviser en LGR5⁺ et régénérer la crypte endommagée (Potten 1977). Contrairement aux cellules LGR5⁺, elles présentent une voie Wnt/ β -caténine peu active.

Les travaux les plus récents démontrent qu'en réalité cette population de cellules souches de réserve, issue des cellules LGR5⁺ elles-mêmes, est très hétérogène. Elle est d'abord non exactement située en position +4, car elle est souvent localisée au sein des progéniteurs précoces en zone TA (transit-amplifying zone) (Figure 4). C'est le cas des cellules Krt19⁺-LGR5⁻ dans le côlon (Asfaha 2015). De plus, la simple caractéristique LRC ne suffit pas à les identifier, puisque d'autres cellules comme les cellules de soutien (Paneth-like cells/Reg4⁺ cells) des cellules LGR5⁺ ont cette propriété (Li, Nakauka-Ddamba et al. 2016). Enfin, ces cellules souches de réserve partagent des marqueurs avec les progéniteurs sécrétoires, notamment du lignage entéroendocrine (Jadhav, Saxena et al. 2017, Yan, Gevaert et al. 2017). Il est donc difficile d'établir une carte d'identité de cette population souche de réserve. En cas de dommage et de mort des cellules souches LGR5⁺, une reprogrammation d'origine épigénétique (plasticité) se produirait dans les populations de réserve conduisant à leur réactivation et/ou acquisition de propriétés souches. Il n'est pas connu à ce jour si ce processus est lié à une localisation particulière dans la crypte.

Les LGR5⁺ et les cellules souches de réserve ont la capacité de régénérer les différents types cellulaires de la crypte *in vivo* et *ex vivo*. Le **dialogue entre les différents types cellulaires de la crypte paraît crucial dans** l'homéostasie intestinale et colique mais est méconnu chez les mammifères. Cependant, il est déjà établi que cette interaction permet également d'adapter les réponses de ces populations face aux différents stress affectants l'intégrité de l'épithélium (Scoville, Sato et al. 2008). C'est notamment le cas, lors d'une **irradiation** où les **LCR** prennent le relais des CBC, sortent de l'état de quiescence et génèrent un lignage cellulaire. Les LCR murins isolés permettent une culture de sphéroïdes sur le long-terme avec présence d'un lignage cellulaire (cellules caliciformes et de cellules entéroendocrines identifiables) (Yan, Chia et al. 2012). De plus, une étude réalisée chez la drosophile, décrit les propriétés plastiques des progéniteurs intestinaux, qui, selon des processus de transition épithélio-mésenchymateuse et de réversion mésenchymo-épithéliale, sont capables d'induire leur différenciation terminale 'à la demande' (Antonello, Reiff et al. 2015). Un dialogue entre ces progéniteurs et les cellules souches 'mères' semble réguler la quiescence ou la prolifération des cellules souches dans ce modèle, via le facteur de transcription Sox21a induisant l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT (Zhai, Kondo et al. 2015).

Ainsi, par leurs diverses propriétés évoquées ci-dessus, les cellules souches participent fortement à **l'homéostasie de l'épithélium colique** grâce à une **balance finement contrôlée** entre l'auto-renouvellement et la différenciation (Li and Xie 2005).

III/ Le maintien de l'homéostasie de l'épithélium

1) *Composition du microenvironnement*

Nous avons insisté précédemment sur l'importance des interactions entre les cellules souches et leur microenvironnement pour le contrôle de l'homéostasie dans la crypte, mais aussi pour les réponses aux agressions tissulaires. Nous allons approfondir ici les données existantes sur la niche des cellules souches coliques, divisée en niche intrinsèque et en niche extrinsèque.

La niche intrinsèque

Il s'agit des cellules dites de soutien des cellules souches LGR5⁺. Ce sont des cellules à propriétés sécrétoires (sécrétion de défensines pour l'intestin grêle et de mucus pour le côlon) qui produisent des ligands clefs pour la régulation des cellules souches (Wnt3a, EGF, TGFβ, ligands Notch). Dans l'intestin grêle, ce sont les cellules de Paneth et dans le côlon, ce sont les cellules Reg4⁺ (Sato, Stange et al. 2011, Sasaki, Sachs et al. 2016). Leur absence dans la crypte entraîne la perte complète des cellules LGR5⁺.

La niche extrinsèque

Ce **microenvironnement** est complexe et constitue la **lamina propria**, qui participe à la fonction de barrière vis-à-vis des composés présents dans la lumière colique. Sa composition est la suivante :

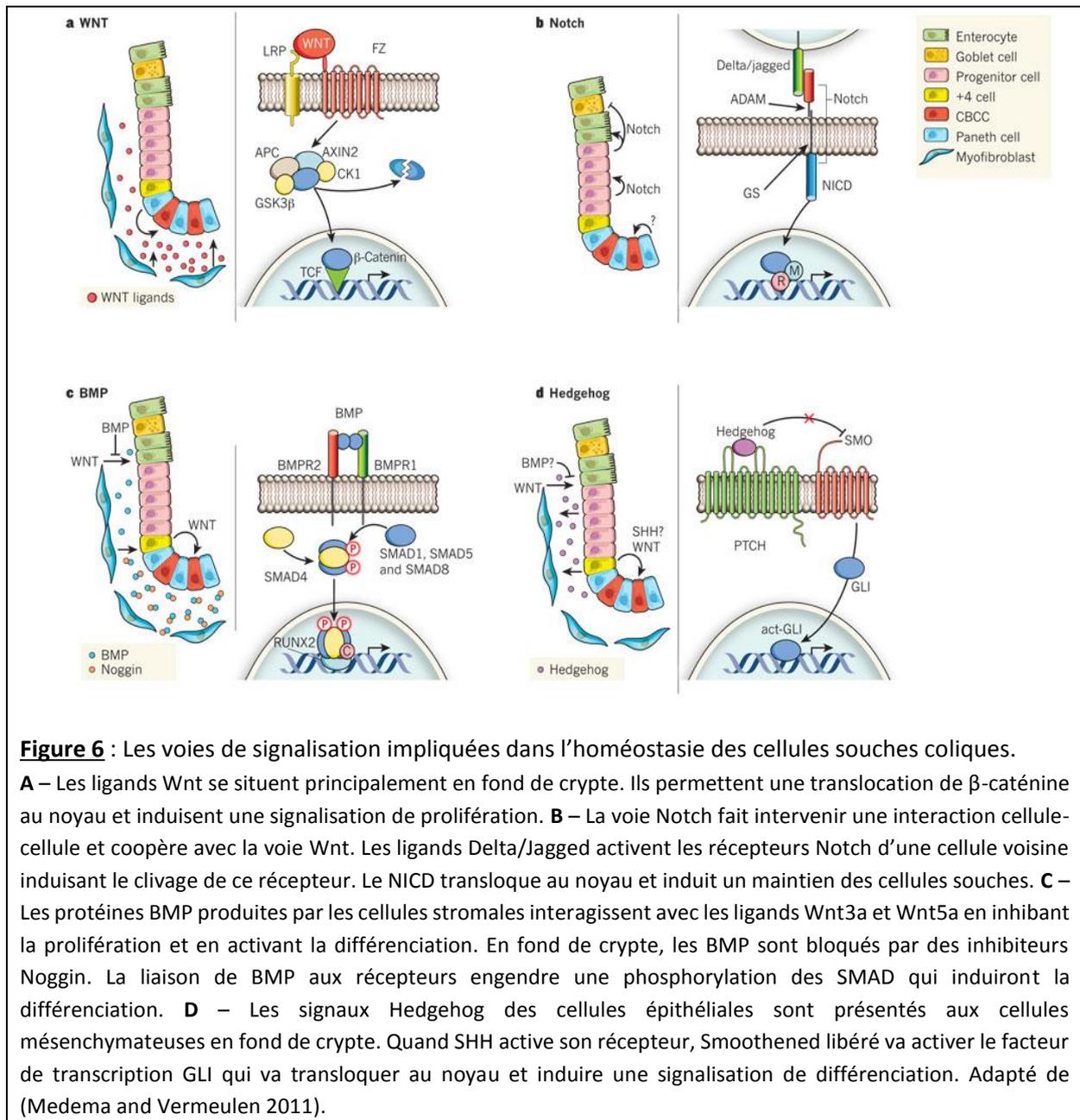
- **la lame basale**, sur laquelle repose le pôle basal des cellules épithéliales de la crypte. Elle est épaisse de 100 à 200 nm, composée de deux couches interconnectées de molécules de matrice extracellulaire, telles que la laminine, le collagène de type IV, l'héparan sulfate, la fibronectine, la tenascine (Louvard, Kedinger et al. 1992). Des métalloprotéases (MMP) sont également présentes, telles que la MMP2, MMP7 et MMP9, qui remodelent cette matrice extracellulaire et libèrent des facteurs de croissance. Très proches de la lame basale et de la crypte, sont présents des fibroblastes qui sécrètent les protéines matricielles. En conditions inflammatoire et tumorale, leur stimulation par le TGF β les transforment en myofibroblastes qui ont des capacités migratoires et sécrétoires augmentées (Evans, Tian et al. 2003).

- **le stroma** ou tissu conjonctif, est constitué de collagènes de type I et III, d'élastine et de glycosaminoglycanes (Louvard, Kedinger et al. 1992). Il comprend également **des cellules mésenchymateuses** progénitrices des fibroblastes, des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des cellules nerveuses (neurones et cellules gliales) résidant dans le tissu. Le dialogue entre les différents types cellulaires du stroma est dépendant de cytokines telles que les interleukines (IL6, IL8, IL11 et IL12) et a des conséquences immunomodulatrices (Di Nicola, Carlo-Stella et al. 2002). Les **cellules immunitaires** telles que les monocytes, macrophages, mastocytes, les lymphocytes B et les cellules dendritiques, sont résidentes dans ce stroma, afin de faire face aux pathogènes pouvant pénétrer la barrière intestinale (Sailaja, He et al. 2016).

Ce microenvironnement permet ainsi de supporter physiquement la crypte colique, mais aussi de la nourrir et de maintenir son intégrité. Il y a peu d'informations concernant d'éventuelles niches spécifiques des diverses populations de cellules souches dans la crypte. Toutefois, Westphalen et ses collaborateurs ont décrit des cellules souches intestinales et coliques quiescentes DCLK1⁺ dont la survie est contrôlée par les neurones (Westphalen, Asfaha et al. 2014). Ces cellules participent également à la carcinogenèse spécifiquement en contexte inflammatoire. En effet, la combinaison de la perte d'APC chez les souris *Dclk1-CreERT* \times *Apc^{fllox/fllox}* et d'un stimulus inflammatoire (DSS), active ces cellules et les convertit en cellules initiateuses de tumeur.

2) Voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie épithéliale

L'homéostasie de l'épithélium colique, qui se traduit par une balance finement contrôlée de l'auto-renouvellement et de la différenciation des cellules souches, est régulée par plusieurs voies de signalisation majeures. Ces voies mettent en jeu des signaux extracellulaires intervenant dans la communication cellule-matrice extracellulaire et des facteurs solubles ou protéines membranaires impliqués dans la communication cellule-cellule. Ainsi, cette double communication implique des voies de signalisation telles que Wnt, Notch, BMP, Hedgehog (Hh) régulant l'expression de gènes spécifiques comme des facteurs de transcription, notamment impliqués dans la prolifération et la différenciation du lignage cellulaire (Figure 6).



La voie de signalisation Wnt (contraction de Wg pour *wingless* et Int pour *integration site*), initialement découverte chez la drosophile dans le processus d'embryogenèse, est cruciale à la prolifération épithéliale et les facteurs Wnt et Frizzled sont exprimés par les cellules épithéliales coliques (Gregorieff, Pinto et al. 2005). Les ligands Wnt vont se fixer au récepteur Frizzled qui est activé par la fixation des co-récepteurs LRP5 et LRP6, entraînant une activation de la β -caténine. En présence de ligand Wnt, la **β -caténine** est stabilisée et s'accumule dans le cytoplasme. Elle va ensuite être transloquée dans le noyau où elle transactive les facteurs de transcription TCF4/LEF pour réguler l'expression de gènes cibles, notamment impliqués dans la prolifération. La β -caténine peut interagir avec l'E-cadherine, impliquée dans l'adhésion cellulaire (van de Wetering, Sancho et al. 2002). La voie Wnt/ β -caténine influence également la différenciation des progéniteurs vers le lignage sécrétoire (Korinek, Barker et al. 1998).

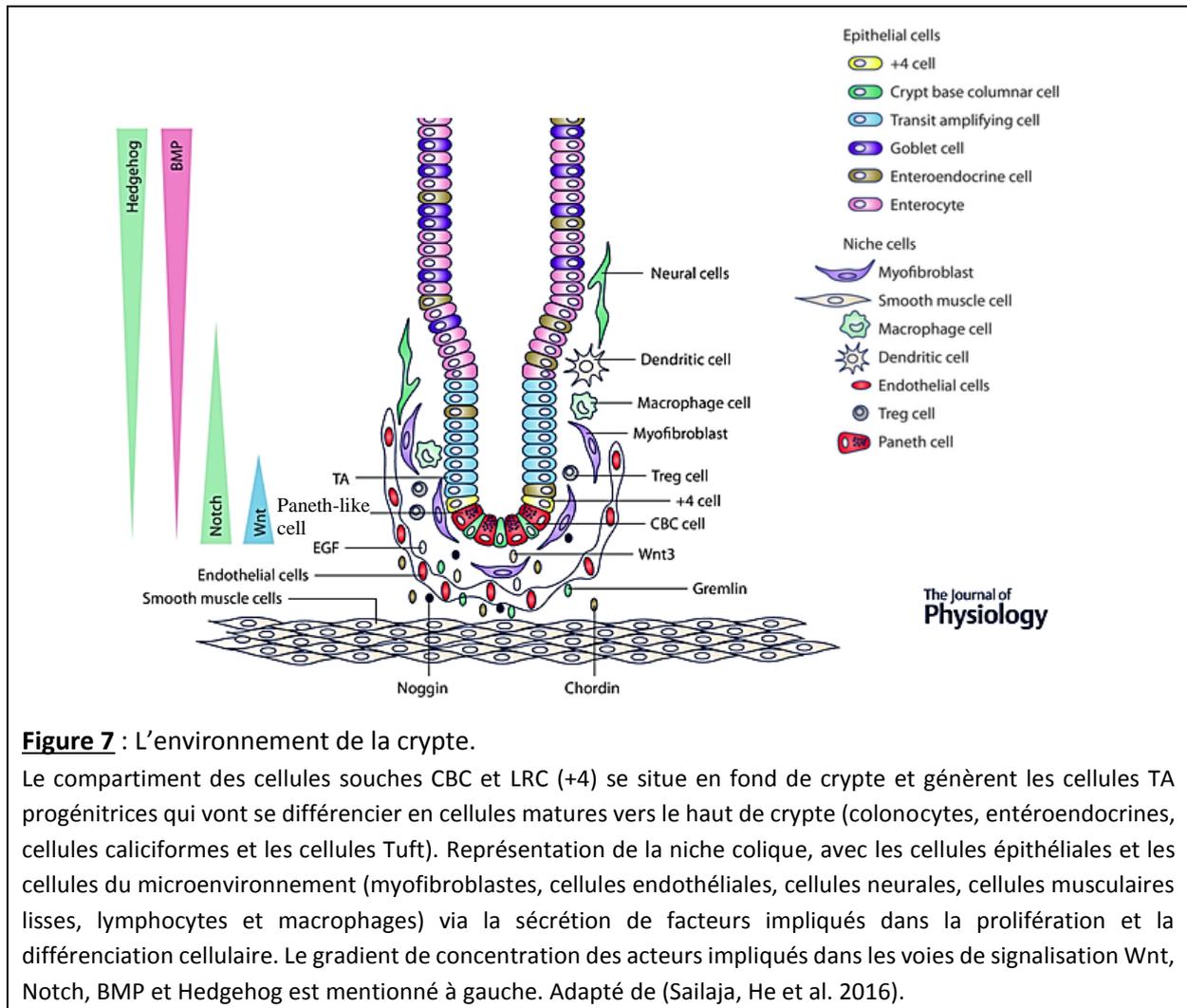
En l'absence de ligand Wnt, un **complexe multi-protéique** formé du suppresseur de tumeur l'**APC** (Adenomatous Poliposis Coli), de l'**axine**, de **CK1** (Casein Kinase1) et de la **GSK3 β** (Glycogen Synthase Kinase 3 β), va permettre la dégradation de la β -caténine. Cette dernière, fixée au complexe, est phosphorylée par CK1 et GSK3 β , puis reconnue et ubiquitynilée par la β -TRCP (β -transducin repeat containing protein) et finalement dégradée par le protéasome (Senda, Iizuka-Kogo et al. 2007). La R-spondine, ligand de LGR5, inhibe la dégradation du récepteur Frizzled et maintient alors la voie Wnt/ β -caténine active. L'implication de la voie Wnt dans **l'auto-renouvellement et la prolifération des cellules souches** a été mise en évidence par divers travaux. La suppression d'antagonistes ou de gènes cibles de Wnt (tels que Dkk1 ou c-Myc) affectent négativement le compartiment prolifératif de l'épithélium (Fevr, Robine et al. 2007, van Es, Haegerbarth et al. 2012). La voie Wnt joue donc un rôle majeur dans l'auto-renouvellement et la prolifération des cellules souches et une **activation anormale de cette voie** peut générer une **hyperprolifération conduisant à la tumorigenèse**. En effet, une sur-activation de cette voie via la R-spondine ou un KO (Knock-Out) du gène APC ont pour effet une hyperplasie au niveau du côlon (Kim, Kim et al. 2005). Il est à noter que, tout comme les cellules épithéliales, les **cellules stromales sécrètent également les ligands Wnt**, comme Wnt3a et Wnt5a (Sato, Stange et al. 2011). S'il n'y pas de source en Wnt3a, les récepteurs Lgr peuvent transduire les signaux activés par la R-spondine pour induire la voie Wnt (Farin, Van Es et al. 2012). Un gradient de concentration décroissant de ces ligands s'effectue dans la crypte colique, du fond vers le haut de la crypte. En dépit des nombreux travaux démontrant le rôle crucial de la voie Wnt, d'autres études se questionnent sur la source des Wnt sécrétés (Barker 2014).

La voie de signalisation Notch joue un rôle clé dans le **maintien des cellules souches et leur lignage cellulaire** (Barker 2014). Contrairement aux ligands Wnt, Notch est un récepteur membranaire et requiert une **interaction cellule-cellule**, suggérant une régulation par les cellules épithéliales adjacentes (Tian, Biehs et al. 2015). Le processus de différenciation débute, au moment où les cellules vont migrer vers le haut de la crypte, par une perte de contact direct aux cellules de soutien (Paneth-like cells/Reg4⁺ cells) (Bjerknes and Cheng 1999). En parallèle, elles expriment des ligands Notch transmembranaire Delta (Dll) ou Jagged, qui vont être présentés aux cellules environnantes, leur permettant d'activer le facteur de transcription Hes1 et devenir des cellules entérocytaires (van Es, Haegerbarth et al. 2012). Cette liaison entraîne la libération de la γ -sécrétase par un clivage de la métalloprotéase ADAM10. La γ -sécrétase va cliver le récepteur Notch, libérant ainsi un fragment intracellulaire, nommé NICD (Notch Intra-Cellular Domain), qui va être transloqué au noyau pour contrôler la transcription de gènes cibles tels que Hes1 ou Hath1 via le facteur de transcription CBF-1 (Sander and Powell 2004). En fonction de l'expression du facteur de transcription **Hes1** ou *Hath1* au sein de ces progéniteurs, la différenciation va être déterminée en **cellule entérocytaire** ou en **cellule sécrétrice** respectivement (Yang, Bermingham et al. 2001, Ueo, Imayoshi et al. 2012). L'inactivation des ligands Notch, Dll1 et Dll4, entraîne une différenciation vers le lignage sécrétoire (van Es and Clevers 2005).

La voie de signalisation BMP, fait intervenir une famille de ligands comprenant les BMP et des membres de la famille de TGF β , partageant des voies de signalisation intracellulaire à travers les protéines SMAD (Medema and Vermeulen 2011). Cette voie possède un gradient de concentration inverse à celui des voies Wnt et Notch. En effet, le rôle majeur de cette voie est **d'inhiber l'auto-renouvellement et de favoriser la différenciation** à partir des cellules souches. Les signaux BMP sont activés en haut de crypte, au niveau du compartiment différencié, mais sont également présents en fond de crypte (tels que BMP4), produits par les cellules mésenchymateuses.

Afin de contrôler la balance prolifération/différenciation, des inhibiteurs de BMP nommés Noggin et Gremlin, sont sécrétés par les cellules mésenchymateuses au fond de crypte (Kosinski, Li et al. 2007).

La voie de signalisation Hedgehog implique des ligands Sonic Hedgehog (Shh) et Indian Hedgehog (Ihh) émanant de l'épithélium de surface, qui vont se lier à leurs récepteurs Patched1/2 (Ptc) des cellules mésenchymateuses environnantes (van Dop, Uhmman et al. 2009). Cette voie régule positivement la **prolifération** des cellules mésenchymateuses **et favorise la différenciation** épithéliale.



La voie de signalisation Hippo, est cruciale pour la **balance entre la prolifération, la croissance et l’apoptose cellulaire**. Elle inhibe les co-activateurs de transcription **YAP et TAZ** en réponse à divers signaux cellulaires, tels que le contact cellulaire, la polarité, les forces mécaniques et l’état énergétique cellulaire (Yu, Zhao et al. 2015). La dérégulation de la voie de signalisation Hippo est impliquée dans le développement tumoral. En effet, en condition physiologique, quand le complexe YAP/TAZ est phosphorylé, il est séquestré dans le cytosol et permet ainsi au facteur de transcription TEAD de rester lié au cofacteur VGLF, qui réprime l’expression de gènes cibles impliqués dans la croissance.

Quand la voie Hippo est inactive, le complexe YAP/TAZ non phosphorylé transloque au noyau et active des gènes cibles. Dans l'intestin est retrouvé un gradient d'expression de YAP décroissant du bas vers le haut de crypte, donc la voie Hippo est plus active en haut de crypte. **YAP/TAZ promeuvent la prolifération des cellules souches dans l'intestin** et leur surexpression induit une dysplasie épithéliale (Camargo, Gokhale et al. 2007). De plus, la voie de signalisation Hippo semble réguler d'autres voies, telles que les voies Wnt et Notch (Smith, Rao-Bhatia et al. 2017). Le complexe YAP/TAZ peut activer la voie Wnt en maintenant la prolifération des cellules souches intestinales, alors que s'il est phosphorylé, il peut supprimer la voie Wnt canonique en inhibant DVL ou la β -caténine. **YAP régule positivement la voie Notch** et induit une **différenciation des cellules souches en progéniteurs**. La voie de signalisation Hippo est inhibée dans les cellules souches par la présence de YAP, engendrant une activation des voies Wnt et Notch, tandis que la voie Hippo est activée dans les cellules différenciées. Cette voie est donc importante dans les processus de prolifération, mais également de différenciation vers le lignage sécrétoire.

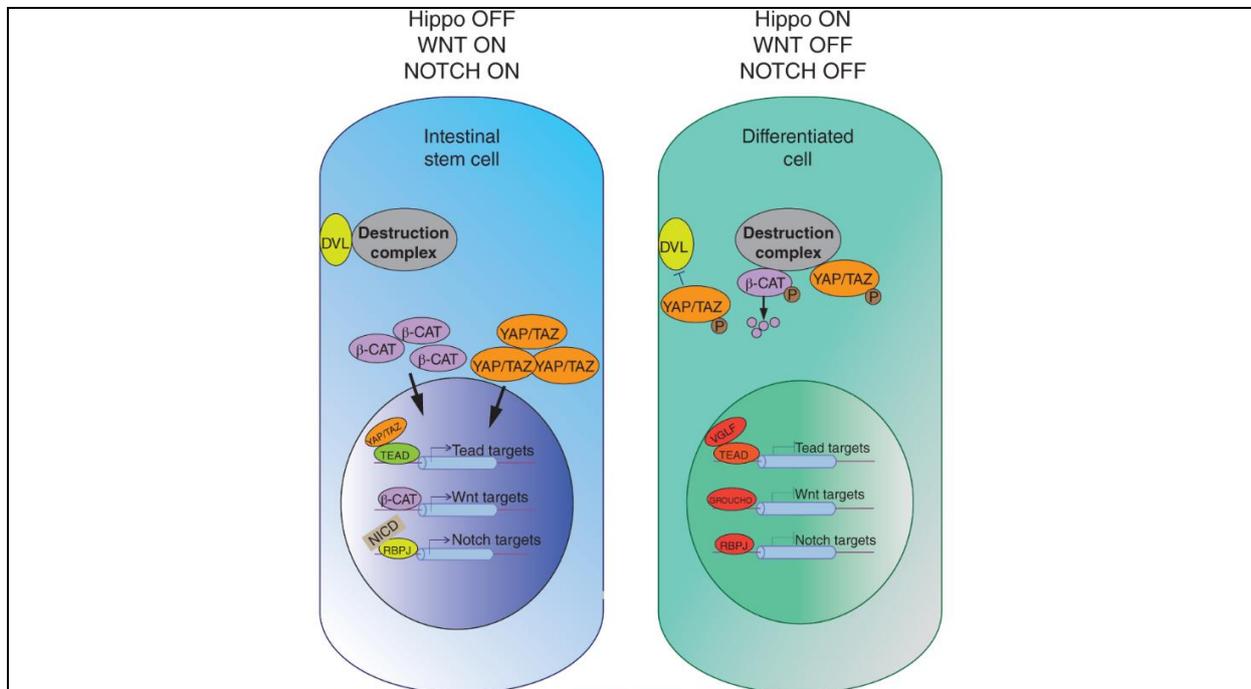


Figure 8 : L'implication de la voie de signalisation Hippo.

Dans les cellules souches intestinales (en bleu), la voie Hippo est inactive, induisant une translocation du complexe YAP/TAZ dans le noyau, où l'expression de gènes cibles est activé au travers du facteur de transcription TEAD. Le complexe YAP/TAZ peut également activer la voie Wnt et la voie Notch. L'activation de ces différents éléments favorise et maintient les capacités des cellules souches. Dans les cellules différenciées (en vert), la voie Hippo est active et induit une phosphorylation du complexe YAP/TAZ séquestré dans le cytosol, réprimant TEAD et VGLF. Les voies Wnt et Notch ne sont alors pas favorisées et maintiennent l'état différencié. D'après (Smith, Rao-Bhatia et al. 2017).

Ainsi, à travers les différentes voies de signalisation décrites précédemment, l'homéostasie de l'épithélium colique est finement contrôlée et leurs interactions permettent de coordonner la balance de l'auto-renouvellement et de la différenciation des cellules souches coliques.

Les **cellules souches** coliques possèdent des **capacités spécifiques** leur permettant de générer un **épithélium différencié et fonctionnel**. L'homéostasie de cet épithélium est contrôlée par la compartimentation des **zones d'auto-renouvellement et de différenciation**. Ceci grâce à la présence d'un microenvironnement riche et complexe faisant intervenir **différentes voies de signalisations nécessaires à cette homéostasie**. L'activation aberrante de ces voies princeps conduit à des pathologies coliques telles que les maladies inflammatoires chroniques et le cancer du côlon.

Chapitre II / Altérations de la crypte colique en contexte pathologique

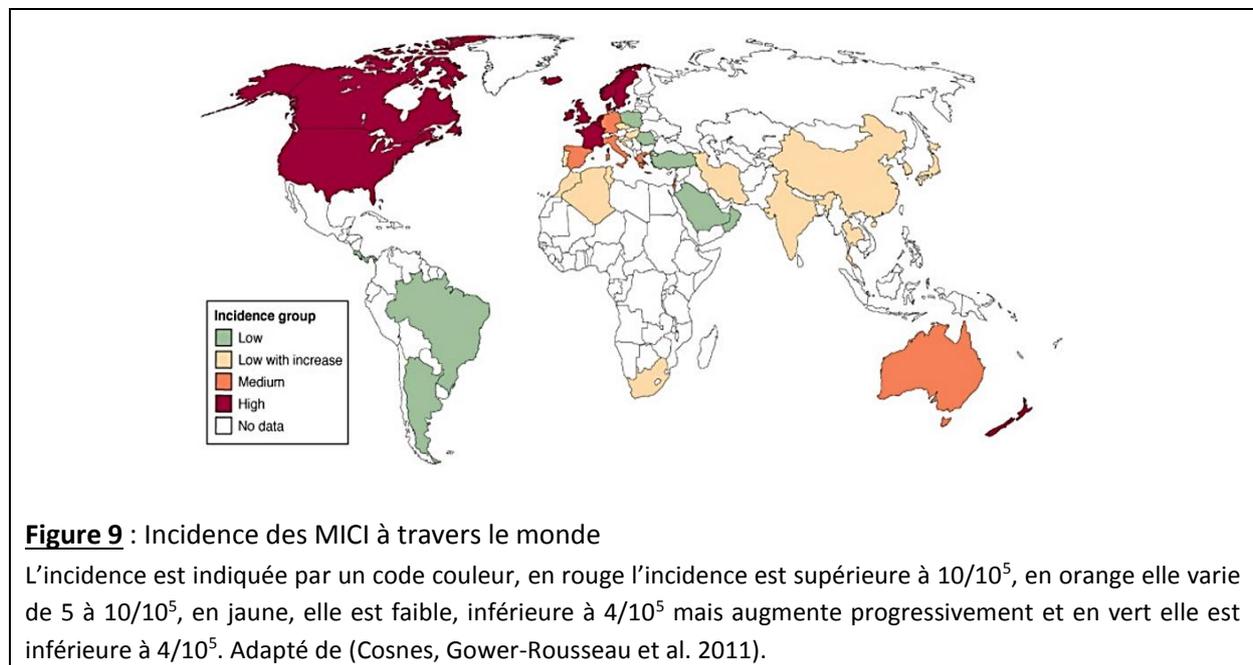
Dans ce chapitre, nous allons considérer l'inflammation colique et la cancérisation colique comme les deux exemples types de dérégulation de la régénération de la crypte. En effet, si l'inflammation chronique peut aboutir à un défaut de régénération, la carcinogenèse peut entraîner au contraire une régénération excessive et anarchique.

I/ La régénération de la crypte colique en condition inflammatoire

1) Les maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)

a) Epidémiologie

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) comprennent la **maladie de Crohn** (MC) et la **rectocolite hémorragique** (RCH). Le 1^{er} article décrivant les symptômes de plusieurs patients atteints d'une pathologie nommée 'iléite régionale' renommée plus tard *Maladie de Crohn* par un des médecins la caractérisant, le Dr. Crohn (Crohn, Ginzburg et al. 1984), fut publié en 1932. Quant à la RCH, elle fut découverte par le Dr. Wilks en 1859 puis décrite et dénommée 'colite ulcéreuse' en 1875 (Wilks, 1859). L'incidence (nombre de nouveau cas/an pour 10^5 habitants sur une période donnée) des MICI est variable selon les pays, avec un gradient décroissant Nord/Sud (Figure 9). En **France**, la prévalence (nombre de personnes atteintes) est de **200 000 personnes** en 2013, généralement des jeunes adultes entre 20 et 30 ans, avec autant de femmes touchées que d'hommes. Elle a fortement augmenté au cours des 50 dernières années dans les pays occidentaux, du fait des changements de modes de vie et d'environnement (Koutroubakis, Manousos et al. 1996).



b) Anatomopathologie

Les MICI sont des pathologies chroniques alternant des phases de rémissions et de poussées se traduisant par des douleurs abdominales et des diarrhées parfois sanglantes. Cependant, la MC et la RCH se distinguent par leurs atteintes digestives (Figure 10). Concernant la **RCH**, elle se **restreint au côlon et au rectum** avec des **lésions superficielles** mais étendues sur tout le long de la muqueuse. Ces lésions aboutissent à diverses altérations : une diminution des cellules caliciformes produisant le mucus, des abcès au niveau des cryptes, une activation de cellules immunitaires infiltrée (monocytes et neutrophiles) et des hémorragies résultant de la dilatation accrue des vaisseaux sanguins (Xavier and Podolsky 2007).

Quant à la **MC**, les altérations s'étendent sur **tout le tube digestif**, mais est principalement localisée au niveau de **l'iléon ou du côlon**. Les **lésions sont discontinues et transmuraux voire ulcéreuses**. Les altérations concernent l'infiltrat leucocytaire, la présence de granulomes, l'irrégularité des cryptes avec l'apparition d'abcès, une hypertrophie neuromusculaire localisée et des ulcérations. L'apparition d'une masse sensible et palpable au niveau de l'abdomen lors de l'examen médical est caractéristique d'une MC.

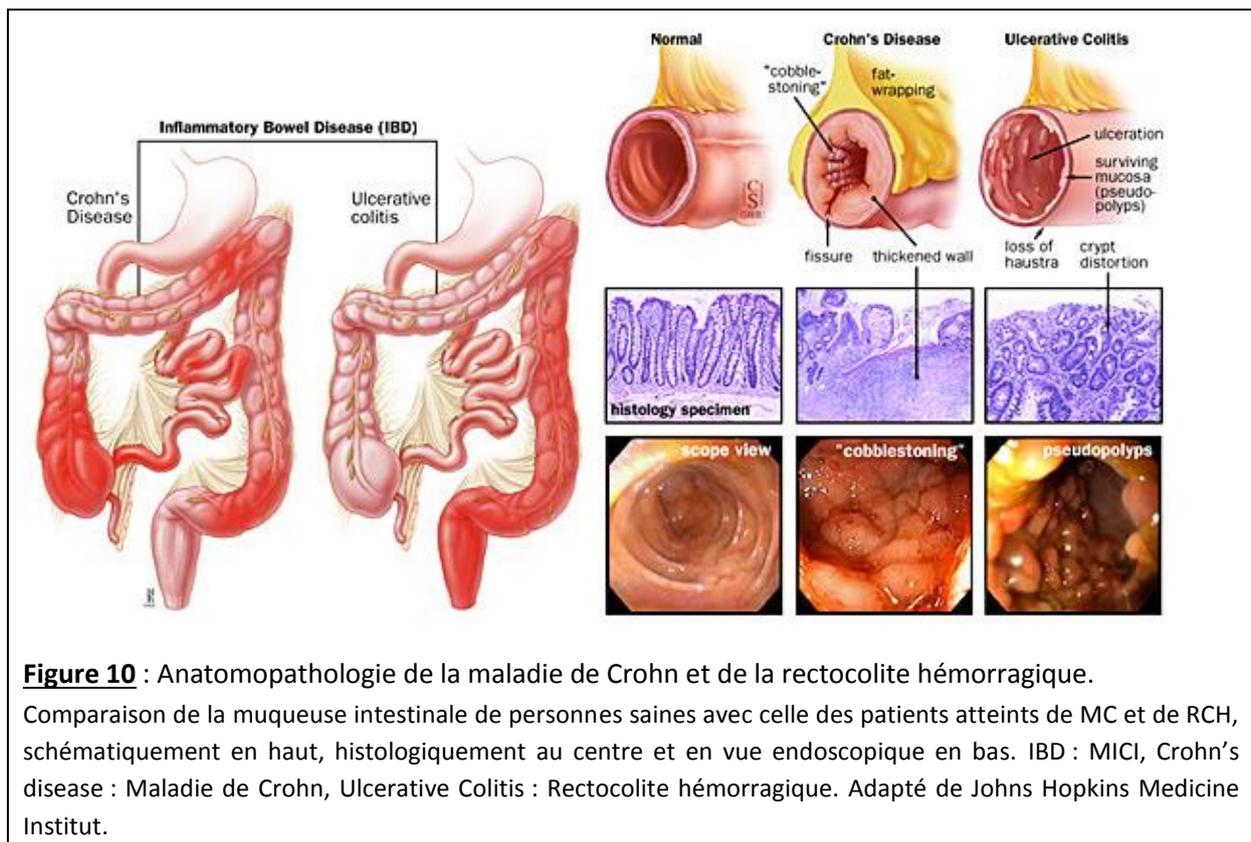


Figure 10 : Anatomopathologie de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique.

Comparaison de la muqueuse intestinale de personnes saines avec celle des patients atteints de MC et de RCH, schématiquement en haut, histologiquement au centre et en vue endoscopique en bas. IBD : MICI, Crohn's disease : Maladie de Crohn, Ulcerative Colitis : Rectocolite hémorragique. Adapté de Johns Hopkins Medicine Institut.

2) *Etiologie des MICI*

Les MICI ont une **origine multifactorielle, génétique, infectieuse et environnementale**. Concernant les prédispositions génétiques, des **polymorphismes** ont été plus décrits dans le développement de la MC que dans celui de la RCH, avec une distinction de populations à risque (comme les populations d'israélites migrantes). Pour la MC, un des gènes de susceptibilité est le **gène NOD2/CARD15** avec un polymorphisme décrit chez 20 à 50% des patients atteints de MC ayant une atteinte iléale (Yazdanyar and Nordestgaard 2010). Ce gène code pour un récepteur intracellulaire exprimé par les monocytes et les macrophages, reconnaissant les lipopolysaccharides des bactéries et induisant une réponse immunitaire de type NF- κ B activant la production de cytokines pro-inflammatoires (Ogura, Bonen et al. 2001). D'autres variants génétiques impliqués dans la production de mucines, des cytokines ou de l'expression de leurs récepteurs ont également été décrits (Van Limbergen, Wilson et al. 2009). Les facteurs génétiques ne sont pas les seuls responsables de l'apparition de la pathologie. Pour le démontrer, il suffit de s'appuyer sur les études réalisées sur des jumeaux homozygotes. En effet, pour une pathologie autosomique dominante, le **taux de concordance** entre les jumeaux est de 100%. Alors que dans le cas des MICI, ce taux varie de 20 à 62 % pour la MC et de 6 à 19 % pour la RCH (Spehlmann, Begun et al. 2008). Les facteurs génétiques sont donc présents mais ne sont **pas prédominants**.

La **flore intestinale** est importante dans l'homéostasie tissulaire. Les effets bénéfiques de l'allaitement et du régime alimentaire ont été démontrés pour influencer la composition de cette flore, mais également la mise en place du système immunitaire (Packey and Sartor 2008). Toutefois, l'alimentation peut aussi avoir un effet prédisposant au développement de MICI, par l'exposition à certains **pathogènes tels qu'*Escherichia Coli (E. Coli)* ou *Listeria***. En effet, *E. Coli adhérente-invasive* est retrouvée dans 22 à 36 % des lésions de la muqueuse intestinale de patients atteints de MC (Barnich and Darfeuille-Michaud 2007). Ceci s'explique par la capacité d'adhérence de cette bactérie, qui peut ensuite rentrer dans les cellules et s'y multiplier. Ceci est également le cas vis-à-vis des cellules immunitaires telles que les macrophages, pour lesquels *E. Coli adhérente-invasive* va persister au niveau du cytoplasme et induire une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires (comme le TNF α). Ce processus engendre une **réponse inflammatoire anormalement élevée provoquant des dommages** au niveau de la muqueuse intestinale (Abraham and Cho 2007). De plus, le microbiote intestinal semble avoir un effet dans le développement de la pathologie. La **dysbiose**, un déséquilibre de la flore intestinale induit par une altération qualitative et fonctionnelle du microbiote, joue un rôle dans la pathogénie des MICI. Il reste à déterminer s'il s'agit d'un rôle inducteur ou favorisant (Swidsinski, Ladhoff et al. 2002). Au niveau des muqueuses intestinales lésées des patients, il est observé une plus forte concentration bactérienne et une diminution de la biodiversité du microbiote (Manichanh, Rigottier-Gois et al. 2006, Walker, Sanderson et al. 2011). En effet, l'analyse de cette biodiversité révèle une forte réduction des espèces bactériennes bénéfiques (Bifidobacteria et Lactobacilli) et une augmentation d'espèces bactériennes pathogènes (Bacteroides et Enterobacteria, type *E. Coli*) (Sokol, Pigneur et al. 2008). Des travaux *in vivo* ont démontré le **rôle pro-inflammatoire des Bacteroides** conduisant à une colite persistante (Rath, Herfarth et al. 1996).

Enfin, parmi les nombreux **facteurs environnementaux** étudiés, seuls le tabagisme et l'appendicectomie ont été reconnus comme éléments favorisant le développement de MICI, même si leur mécanisme d'action reste inconnu. De façon surprenante, la **nicotine** a des effets opposés selon la MC ou la RCH.

En effet, elle **favoriserait le développement de la MC et protégerait contre la RCH** (Cosnes 2004). Les fumeurs ont un risque réduit de 40% de développer une RCH et s'ils sont atteints de RCH, celle-ci est moins sévère que pour les non-fumeurs. La survenue de MC est doublée chez les fumeurs comparés aux non-fumeurs. L'effet contradictoire de la nicotine pourrait s'expliquer par diverses actions. Sa première action est immuno-modulatrice au niveau de la muqueuse intestinale en activant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL8, IL1 β et le TNF α . Sa seconde action régule la production de mucus, par une augmentation de production de mucines par les cellules caliciformes. Cette production est altérée chez les patients atteints de RCH, expliquant l'effet bénéfique de la nicotine (Pullan 1996). La nicotine a également un effet anti-inflammatoire en inhibant la synthèse de prostaglandines et de leucotriènes impliquées dans les poussées inflammatoires des patients atteints de RCH (Motley, Rhodes et al. 1990). En ce qui concerne l'effet néfaste de la nicotine pour les patients atteints de MC, il pourrait s'expliquer par l'action pro-coagulante. En effet, elle est associée au processus de thromboses légères des vaisseaux mésentériques de la sous-muqueuse intestinale, ce qui accroît le phénomène ischémique et les lésions de la muqueuse des patients atteints de MC (Srivastava, Russell et al. 1990). Ces lésions inflammatoires peuvent également être entretenues par les radicaux libres générés par les leucocytes via la nicotine (Kalra, Chaudhary et al. 1991).

En ce qui concerne **l'appendicectomie, une diminution de 70% de risque de développer une RCH** a été démontrée (Sahami, Kooij et al. 2016). Cet effet s'expliquerait par le fait qu'au niveau de la muqueuse intestinale des patients atteints de RCH, il y ait une diminution de cellules caliciformes, avec une fonction de barrière altérée, induisant ainsi une entrée facilitée des bactéries. Puisque l'appendice serait un réservoir de bactéries commensales, une appendicectomie aurait donc pour effet de prévenir la colonisation bactérienne (Dharmani, Srivastava et al. 2009). Une autre hypothèse serait que l'appendice soit un élément majeur du tissu lymphoïde, générant des lymphocytes B sécrétant des IgA responsables de la reconnaissance de pathogènes. S'il y a une dérégulation de la réponse immunitaire (détaillée ensuite) et notamment de la spécificité de reconnaissance des peptides microbiens, l'appendicectomie permettrait de restaurer cet effet (Masahata, Umemoto et al. 2014).

3) Réponse inflammatoire des MICI

La perte de l'homéostasie de la barrière intestinale des patients atteints de MICI, s'expliquerait par des défauts de l'épithélium, avec notamment un déficit de la production de mucus par les cellules caliciformes, une réduction de la synthèse de peptides antimicrobiens et une augmentation de la perméabilité de la muqueuse par déstabilisation des jonctions serrées (Brown, Sadarangani et al. 2013).

La réponse inflammatoire est un **processus physiologique** qui se met en place en réponse à une agression. Cette réponse va s'adapter en fonction de l'élément déclenchant l'agression, qui peut être d'origine infectieuse (virus, bactérie, parasite), physique (blessure, fistule) ou bien chimique (antibiotique, solvant). Le processus inflammatoire fait intervenir le recrutement de cellules immunitaires et la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Dans un premier temps, **l'immunité innée** permet de réagir de façon non spécifique à l'agression en faisant notamment appel aux polynucléaires, macrophages/monocytes et cellules dendritiques.

Les microbes expriment des motifs moléculaires spécifiques, les **PAMPs** (Pathogen-Associated Molecular Pattern), qui sont reconnus par des récepteurs exprimés par les cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques), les PRRs (Pathogen Recognition Receptors) comprenant les **TLRs** (Toll-Like Receptors) et les récepteurs de type NOD (NLR, nucleotide oligomerization domain receptors) (Murillo, Morre et al. 2003, Rakoff-Nahoum, Paglino et al. 2004). L'activation de ces récepteurs induit la voie pro-inflammatoire **NFκB** qui aboutit à l'expression de **cytokines ou chimiokines pro-inflammatoires** telles que le **TNFα, l'IL1 ou CXCL8** (Zuckerman, Evans et al. 1991, Zheng, Meng et al. 2008). **Les mastocytes et les polynucléaires** libèrent également des composés induisant un stress oxydatif, tels que l'histamine, la trypsine ou l'héparine.

Chez les patients atteints de MICI, la **barrière épithéliale est altérée**. Les causes de cette altération sont une diminution de production de mucus par les cellules caliciformes, une diminution de sécrétion d'agents antimicrobiens, et/ou une augmentation de la perméabilité trans- et paracellulaire. L'altération de cette barrière épithéliale est un marqueur diagnostique et de suivi de la pathologie.

La **réduction du mucus** est un signe d'altération de la barrière intestinale, puisqu'il s'agit de la première barrière physique entre le microbiote et l'organisme (Kim and Ho 2010). Le mucus est constitué d'un réseau de **mucine 2**, qui est une protéine sécrétée par les **cellules caliciformes**. Il est possible de distinguer deux couches de mucus à la surface de l'épithélium intestinal. La première couche dite 'interne', est adhérente aux cellules épithéliales, fine mais dense ne laissant pas passer les bactéries. La seconde couche superposée à la première est en contact avec la lumière intestinale, plus large mais plus lâche. Cette seconde couche de mucus abrite les bactéries commensales qui participent au maintien de cette dernière, soulignant ainsi la symbiose entre les bactéries commensales et l'hôte (Johansson, Larsson et al. 2011). Pour les patients atteints de **RCH**, il a été observé une diminution de la densité du réseau de mucine 2 et de l'épaisseur de la couche de mucus associée à une augmentation du nombre de bactéries (McCormick, Horton et al. 1990, Pullan, Thomas et al. 1994). Des études **d'invalidation du gène MUC2** (codant pour la protéine mucine 2) ont démontré un **développement spontané de colite *in vivo*** (Van der Sluis, De Koning et al. 2006). L'altération de la couche de mucus favorise l'exposition directe des cellules épithéliales au contenu luminal, ce qui fragilise la fonction de barrière intestinale.

L'augmentation de la **perméabilité para-cellulaire** résulte de la fragilisation de la barrière épithéliale, liée à la **dégradation des jonctions serrées**. Ces jonctions serrées sont composées de différentes protéines : **les claudines, les occludines et les zonula-occludens (ZO)** qui sont reliées au réseau d'actine et de myosine des cellules épithéliales (Chiba, Osanai et al. 2008). Dans les MICI, la composition des **jonctions serrées est modifiée. L'expression de la claudine 2 est augmentée alors que celle des claudines 3, 4, 5 et 8 et de l'occludine** est diminuée (Prasad, Mingrino et al. 2005, Zeissig, Burgel et al. 2007). La composition protéique des jonctions serrées est **dépendante du profil cytokinique** du microenvironnement épithélial. Les cytokines de type Th2, comme l'IL13, caractéristiques de la RCH ou de type Th1, caractéristiques de la MC, comme le TNFα et l'INFγ induisent une surexpression de la claudine 2 au niveau de l'épithélium. *In vitro*, le **TNFα et l'INFγ** augmentent la perméabilité para-cellulaire en induisant la contraction des fibres d'actines et de myosine via la MLCK (Myosine Light-Chain Kinase) (Schmitz, Fromm et al. 1999, Weber, Raleigh et al. 2010). La **diminution de production par les colonocytes de peptides antimicrobiens**, notamment des β-défensines HBD1, HBD2, HBD3, HBD4 et de la cathélicidine a été décrite chez les patients atteints de MICI (Jager, Stange et al. 2010).

La **dérégulation de la balance protéolytique**, due à une **surexpression des protéases ou bien à une baisse de l'activité des inhibiteurs endogènes de protéases**, joue un **rôle dans les MICI**. Les protéases à sérine peuvent cliver les **cytokines pro-inflammatoires**, ce qui conduira soit à une **augmentation, soit à une inhibition de leurs activités**. Par exemple, la PR3 peut cliver et activer l'IL1, l'IL18 et le TNF α , ou cliver et inhiber l'IL6 (Scuderi, Nez et al. 1991, Padrines, Wolf et al. 1994, Bank, Kupper et al. 1999, Coeshott, Ohnemus et al. 1999, Sugawara, Uehara et al. 2001). **Lors de l'inflammation**, les leucocytes peuvent également être recrutés par le biais de la chymotrypsine, ce qui participerait à l'inflammation observée chez les patients atteints de MICI (Basil and Strominger 1994). L'altération des protéines de jonctions ZO1 et occludines par **l'élastase du neutrophile** ou la chymase est associée à **l'augmentation de la perméabilité** de l'épithélium intestinal des patients atteints de **RCH** (Andus, Gross et al. 1993, Scudamore, Jepson et al. 1998, Ginzberg, Cherapanov et al. 2001, Morohoshi, Matsuoka et al. 2006). De même, l'apoptose des cellules épithéliales induite par les protéases augmente la perméabilité intestinale à l'origine de l'inflammation (Laforge, Bidere et al. 2006).

L'augmentation des protéases observée dans les MICI, peut être aussi le fait d'une diminution de la production d'inhibiteurs endogènes des protéases, comme cela a été montré pour l'élafine (inhibiteur de l'élastase) (Motta, Bermudez-Humaran et al. 2012). L'administration *per os* de la bactérie recombinante *Lactococcus lactis* sécrétant l'élafine, **dans différents modèles de colite induite chez la souris, réduit l'activité élastolytique** et la sévérité de l'inflammation intestinale (Motta, Bermudez-Humaran et al. 2012).

4) *La prise en charge thérapeutique des MICI et ses limites*

Les altérations épithéliales citées précédemment, sont à la fois la conséquence et la cause d'anomalies de la régénération épithéliale dans les MICI, qui sont la source d'inefficacité thérapeutique. En effet, les **traitements actuels** pour les MICI **ne sont pas curatifs**. Ils ont pour objectif de contrôler sur le long terme les symptômes de la pathologie, en réduisant et prévenant l'inflammation de la muqueuse intestinale, en contrôlant les douleurs abdominales et les alternances diarrhées/constipations, puis en prévenant les complications et les hospitalisations associées et enfin en corrigeant l'apport nutritionnel. Ces traitements font appel à des molécules pharmacologiques diverses qui seront utilisées soit pendant la phase de poussée pour la traiter, soit durant la phase de rémission pour la maintenir. Ces molécules se distinguent en quatre familles : les salicylés, les corticoïdes, les immunosuppresseurs et les thérapies biologiques (anti-TNF α). Néanmoins, dans certains cas, l'intervention chirurgicale est nécessaire.

a) Thérapeutique de la phase aiguë des MICI

- **Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens** sont des dérivés aminosalicylés, tels que l'acide 5-aminosalicylique (**5-ASA**), avec un taux de réponse de 60 à 80% dans la **RCH**, mais sans effet probant dans la MC (Burger and Travis 2011, Meier and Sturm 2011, Pithadia and Jain 2011).

Cette molécule réduit la perméabilité intestinale, inhibe la sécrétion des molécules inflammatoires impliquées dans le chimiotactisme des neutrophiles et des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ses effets secondaires sont nombreux et limitent donc son utilisation.

- **Les anti-inflammatoires stéroïdiens** sont les **corticostéroïdes**, utilisés après un échec du traitement au 5-ASA (Pithadia and Jain 2011). Le taux de réponse est variable selon les patients. Les corticostéroïdes inhibent la production des cytokines pro-inflammatoires, mais leur utilisation reste limitée, puisque les effets indésirables sont majeurs.

- Le **régime alimentaire** est préconisé en réduisant les apports en fibres pendant les phases de poussées et en préférant les aliments sans résidu pour diminuer les selles. Ce régime est souvent associé à la prise de médicaments soulageant les symptômes, tels que les antispasmodiques, les anti-diarrhéiques et les antalgiques.

b) Thérapeutique de la phase chronique des MICI

- **Les immunosuppresseurs**, tels que **l'azathiopurine (dont l'Imurel), le 6-mercaptopurine, le méthotrexate et les thiopurines**, sont utilisés pour maintenir la phase de rémission ou pour des patients cortico-dépendants ou cortico-résistants (Triantafillidis, Merikas et al. 2011). L'inhibition générale de l'immunité nécessite une surveillance étroite des patients (Cottone, Renna et al. 2011). Le taux de réponse est observable après 3 à 6 mois de traitement, mais un tiers des patients sont intolérants aux thiopurines et 10% n'y répondent pas.

- **Les biothérapies ciblées** et les **anti-TNF α** , sont utilisées pour des patients ne répondant pas aux traitements conventionnels cités auparavant (environ 10%). Il s'agit d'anticorps de synthèse tels que l'infliximab, l'adalimumab et le certolizumab pégylé (Triantafillidis, Merikas et al. 2011). Les effets secondaires sont aussi présents, tels qu'une prédisposition aux infections opportunistes, une insuffisance cardiaque, une hépatite, ou le développement de lymphomes. De plus, le taux de rémission après 12 mois de traitement n'est que de 30%.

- La **chirurgie** : face aux échecs de ces différents traitements ou en cas de complications (sténoses, fistules, obstructions intestinales), l'intervention chirurgicale est requise. Au moins 70% des patients atteints de MC et environ 35 % des patients atteints de RCH subiront une intervention chirurgicale au cours de leur vie. Toutefois, cette intervention ne protège pas des récives et une colectomie totale peut être proposée. La conséquence d'une anastomose iléo-anale (liaison entre l'intestin et l'anus) est une augmentation de selles au cours de la journée et pendant la nuit, ainsi qu'un risque de pochete (inflammation de l'anastomose).

D'autres approches thérapeutiques sont également utilisées. Elles sont actuellement utilisées en parallèle des traitements conventionnels dans le but de les remplacer, à terme. **Les probiotiques** sont de plus en plus développés, dans le but de rééquilibrer la flore intestinale et de réduire l'inflammation par la sécrétion de molécules anti-inflammatoires (Jonkers and Stockbrugger 2003, Ganji-Arjenaki and Rafieian-Kopaei 2017). Dans cette optique, la **transplantation de microbiote fécale** est également réalisée (Colman and Rubin 2014).

L'état psychologique des patients est également pris en considération (Bannaga and Selinger 2015). En effet, l'utilisation **d'antidépresseurs, d'anxiolytiques et de médecines alternatives** (hypnose et yoga) est de plus en plus commune et améliore la prise en charge des patients atteints de MICI (Cheifetz, Gianotti et al. 2017).

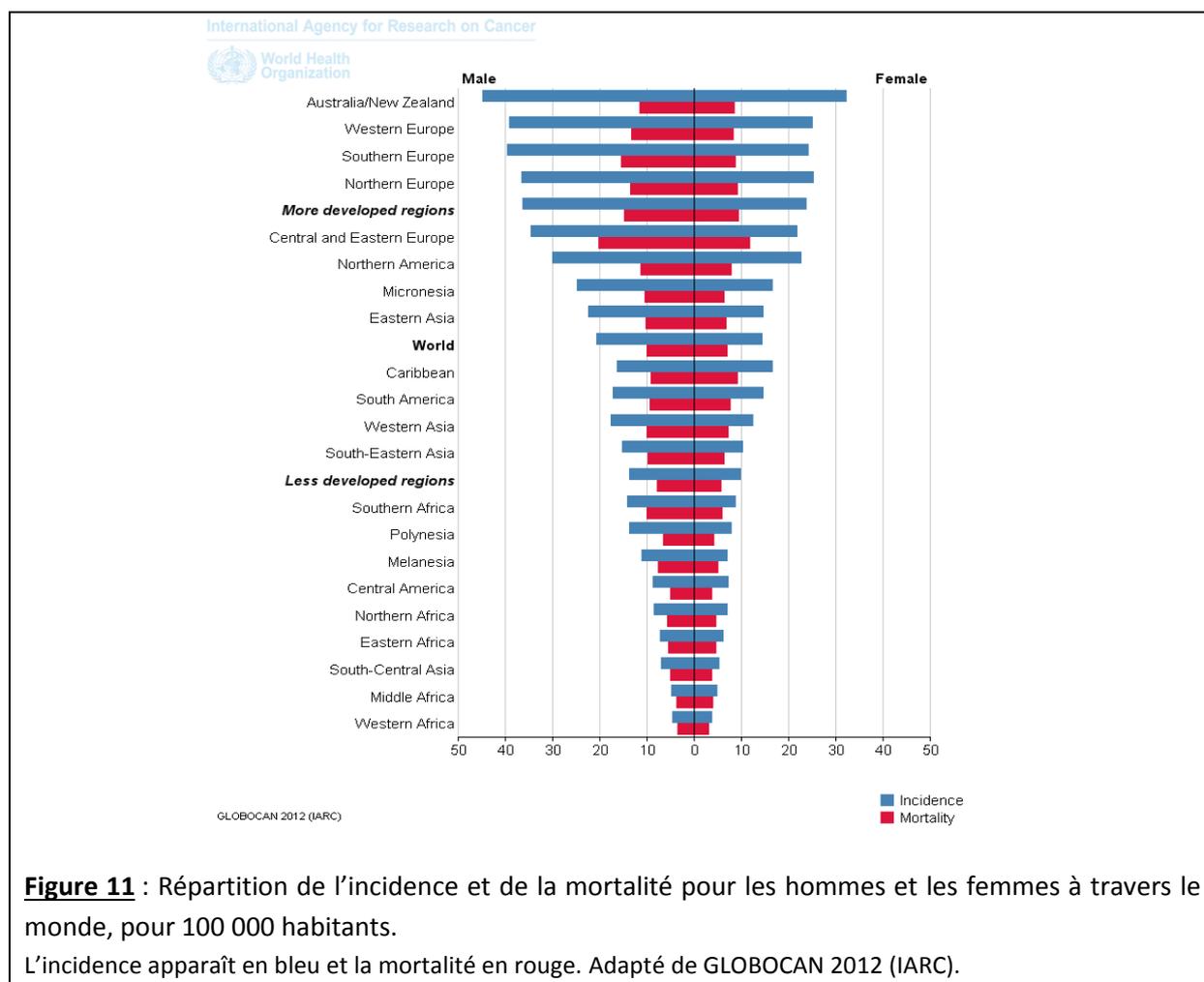
Pour résumer, s'ils sont pris en charge, le pronostic vital des patients atteints de MICI n'est pas engagé, mais leur qualité de vie est altérée. Des approches thérapeutiques ont été développées en ce sens, mais elles se focalisent sur la prise en charge des symptômes de la pathologie, engendrant des effets secondaires importants, et pour lesquelles un grand nombre de patients ne répond pas. Il est donc crucial de développer d'autres approches thérapeutiques et pour cela une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques des MICI est primordiale. L'utilisation du modèle cellulaire *ex vivo* en 3D, les organoïdes, est alors de plus en plus commune. Ce modèle sera traité dans le chapitre IV, page 63.

II/ Les altérations de la crypte colique en contexte cancéreux

1) *Le cancer colorectal (CCR)*

a) *Aspects épidémiologiques et étiologiques*

Le cancer colorectal (CCR) est le **3^{ème} cancer chez l'homme** et le **2^{ème} chez la femme** à travers le monde (Globocan, 2012). L'incidence est variable géographiquement, avec une plus forte incidence dans les pays développés (tels que les Etats-Unis, l'Australie et l'Europe) comparés aux pays émergents (tels que la Polynésie, les pays d'Afrique ou d'Amérique Latine) (Figure 11). Ceci est notamment dû à l'hygiène de vie et aux moyens de diagnostic disponibles. En **France, le CCR représente 15% des cancers** et touche principalement les personnes de **plus de 50 ans**. Le **taux de survie à 5 ans est de 57%**, car le diagnostic est souvent réalisé tardivement, mais le taux de mortalité a baissé d'environ 8% en 30 ans (Douaiher, Ravipati et al. 2017). Si l'âge avancé est considéré comme un facteur de risque de développer cette pathologie, d'autres ont été également identifiés.



Il est possible de distinguer deux types de CCR, les **formes sporadiques et les formes familiales**. La majorité des CCR (75%) sont **sporadiques**, c’est-à-dire que leur développement s’effectue sans facteur de risque génétique identifié et donc sans histoire familiale associée. Dans la population générale, le risque de développer un CCR est de 3 à 5%. Concernant les formes **familiales**, ce risque double si un parent au 1^{er} degré a développé un CCR diagnostiqué entre 50 et 70 ans et triple si le diagnostic a été effectué avant 50 ans (Kuipers, Grady et al. 2015).

- Les facteurs génétiques

Les cancers de forme familiale se développent principalement à partir de diverses pathologies : le syndrome de Lynch, la polypose adénomateuse familiale (PAF), le syndrome de Li-Fraumeni et la polypose associée aux mutations de MUTYH (PAM).

Le syndrome de Lynch (ou Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer, HNPCC) est une pathologie **autosomique dominante**, causée par une **mutation d’un des gènes impliqués dans la réparation de mésappariement de l’ADN** (tels que MLH1, MSH2, MSH6). Ces mésappariements, causés par l’ADN polymérase, apparaissent lors de la réplication de l’ADN et sont normalement résolus grâce à l’intervention de ce système de réparation (Kolodner 1995). Si ces mésappariements persistent, ils provoquent une accumulation de mutations dans de petits fragments de l’ADN ayant une séquence nucléotidique répétée. Il s’agit alors d’une instabilité microsatellitaire (MSI) (Lynch, Lynch et al. 2009).

Ce syndrome se caractérise par la présence **d'adénomes de petite taille** au niveau du côlon. Ces derniers se développent en adénocarcinomes avant 50 ans dans 10% des cas et vers 70 ans dans 45% des cas.

La Polypose Adénomateuse Familiale est aussi une **pathologie autosomique dominante** causée par la **mutation germinale du gène APC** qui contrôle l'activité de la voie Wnt, impliquée dans la prolifération cellulaire. Cette mutation se traduit par la présence d'un codon-stop engendrant une forme tronquée de la protéine, qui ne pourra être liée et phosphorylée par le complexe APC/Axin/CK1/GSK3 β , activant la voie Wnt de manière constitutive (Grodin, Thliveris et al. 1991). Cette polypose se caractérise par la présence de **centaines d'adénomes** dans la paroi du côlon et du rectum **dès l'enfance**. Si aucune prise en charge n'est effectuée, les patients développeront systématiquement un CCR avant l'âge de 40 ans (Jarvinen 1985).

Le syndrome de Li-Fraumeni, est un **syndrome autosomique dominant**, causé par une **mutation germinale du gène suppresseur de tumeur** et acteur clé du cycle cellulaire, **p53** (Li, Fraumeni et al. 1988). Il se caractérise par la présence de **multiples cancers** dans l'organisme chez l'enfant, avec une prédominance pour les tissus mous (os, cerveau, sang). Le risque de développer un CCR est doublé par rapport à la population générale et est diagnostiqué aux alentours des 30 ans.

La polypose associée aux mutations de MUTYH (PAM), est un **syndrome autosomique récessif** causé par une **mutation germinale bi-allélique du gène MUTYH**. Ce gène code pour une glycosylase impliquée dans le système de réparation des lésions oxydatives de l'ADN (Cleary, Cotterchio et al. 2009). Sa perte de fonction entraîne des inversions de bases nucléotidiques (tels que G/C en T/A), notamment au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs ou oncogènes. Ce syndrome se caractérise par la présence d'au moins **10 polypes colorectaux**, qui évoluent en carcinomes (Chow, Thirlwell et al. 2004).

- Les facteurs d'inflammation chronique

Il a été démontré que l'état inflammatoire était un facteur de risque au développement de CCR. En effet, plusieurs études mettent en évidence **le risque de CCR chez des patients atteints de MICI** (8 à 10 ans après leur diagnostic) et que ce risque **corrèle avec l'étendue, la sévérité et la durée de l'inflammation** (Xie and Itzkowitz 2008, Ullman and Itzkowitz 2011, Baars, Kuipers et al. 2012, Nieminen, Jussila et al. 2014). Le risque est plus élevé pour les patients atteints de RCH, jusqu'à 18%, que pour les patients atteints de MC, en raison de la fréquence de l'inflammation.

Les CCR issus des MICI et les CCR de forme sporadique présentent tous deux des lésions et polypes dysplasiques et des cryptes aberrantes. Les deux CCR se développent par une **accumulation de hits mutationnels** localisés sur des gènes impliqués dans des **voies de signalisation majeures pour l'homéostasie** épithéliale. Cependant, ces mutations ne se succèdent pas de la même façon (Ullman and Itzkowitz 2011). Si la mutation du gène APC est initiatrice dans la carcinogenèse des CCR sporadiques, c'est celle du gène TP53 qui est initiatrice dans la carcinogenèse associée au MICI.

De plus, les mécanismes inflammatoires induisant le processus de cancérogenèse ne sont pas entièrement établis. Toutefois, il semblerait que les **espèces réactives de l'oxygène (ROS)** produites par les cellules inflammatoires initient le développement de CCR (Terzic, Grivennikov et al. 2010).

En effet, ces ROS peuvent intervenir dans la **transcription de plusieurs gènes** à fonction majeure, tels que les facteurs de transcription p53 et NFκB ou les gènes impliqués dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN. Ainsi, l'homéostasie épithéliale est perturbée au profit d'une prolifération cellulaire accrue et d'une apoptose diminuée. La **cancérogenèse** va être favorisée par les **cytokines et chimiokines pro-inflammatoires** telles que l'IL6, le TNFα, l'IL1 et l'IL17, sécrétées par les cellules immunitaires au niveau de la muqueuse colique. Ces médiateurs entretiennent également la formation de ROS, ce qui maintient cette inflammation de manière chronique (Ullman and Itzkowitz 2011). Enfin, la **dysbiose** est un facteur favorisant le développement de CCR issu de MICI (Schwabe and Jobin 2013). Il a été rapporté qu'elle permettait la synthèse de ROS et la production de toxines génotoxiques (induisant des dommages à l'ADN) provoquant plus de dommages tissulaires et favorisant ainsi la carcinogenèse. Plus particulièrement, l'**espèce *Bacteroides fragilis*** serait impliquée dans ce processus. L'inactivation de gène APC chez des souris, après administration de *Bacteroides fragilis*, démontre une **colite plus persistante et des lésions cancéreuses plus nombreuses** via l'expression d'une cytokine pro-inflammatoire en particulier, l'IL17 (Rhee, Wu et al. 2009, Wu, Rhee et al. 2009).

- Les facteurs environnementaux

Enfin, les facteurs environnementaux ne sont pas négligeables dans l'apparition de la pathologie. Il est d'ailleurs possible de l'observer grâce à la répartition géographique de l'incidence du CCR à travers le monde (Figure 10). En effet, le **mode de vie sédentaire et occidental** joue un rôle important avec notamment :

- une alimentation riche en graisses et protéines animales (Potter 1999),
- une consommation importante de viande rouge (Williams, Satia et al. 2010),
- un diabète de type II (Guraya 2015),
- une obésité, (risque augmenté d'au moins 50%) (Calle and Thun 2004),
- une consommation excessive d'alcool, augmentation de risque de 20% (Fedirko, Tramacere et al. 2011),
- et un tabagisme (Gandini, Botteri et al. 2008).

Néanmoins, une activité physique d'au moins 30 minutes par jour et un régime riche en lait (pour l'apport en calcium), en céréales, fruits et légumes (pour l'apport de fibres et de vitamines), diminuent ce risque de développement de CCR d'environ 10% (Song, Garrett et al. 2015). De plus, la prise d'aspirine à faible dose, serait protectrice en inhibant les cyclo-oxygénases (COX) impliquées dans le processus inflammatoire et surexprimées dans les CCR (Rothwell, Fowkes et al. 2011).

Une classification anatomopathologique permet de distinguer l'hétérogénéité des CCR, ainsi que l'évolution de la carcinogenèse.

b) Classification anatomopathologique et clinique des tumeurs colorectales

Classification anatomopathologique

La première étape de la carcinogenèse pouvant être observée cliniquement est la formation de polypes. Ce terme désigne une excroissance fibreuse faisant saillie dans la lumière intestinale sans préjuger de sa nature histologique.

C'est pourquoi, il est nécessaire de se baser sur des critères anatomopathologiques afin de pouvoir classer les différents types de tumeurs épithéliales colorectales. Ainsi le classement s'effectue en trois catégories :

- i) **les lésions pré-néoplasiques** se manifestent par une hyperprolifération cellulaire, aboutissant à la formation de larges cryptes réunies en 'foyers de cryptes aberrantes' (FCA) (Pretlow, Barrow et al. 1991) (Figure 12). Il est possible de distinguer deux types de FCA, les hyperplasiques, caractérisées par une augmentation de la prolifération anormale de cellules normales, et les dysplasiques, caractérisées par une organisation anarchique de cellules anormales de l'épithélium (Cheng and Lai 2003) ;
- ii) **les lésions précurseurs** de CCR comprennent les adénomes tubulaires, les adénomes villosités et les adénomes tubulo-villosités ; les tumeurs festonnées comprennent les polypes hyperplasiques, les adénomes festonnés sessiles et les adénomes festonnés traditionnels ;
- iii) et **les adénocarcinomes** sont représentés par les adénocarcinomes mucineux, les carcinomes à cellules en bague à chaton, les carcinomes médullaires et les carcinomes festonnés.

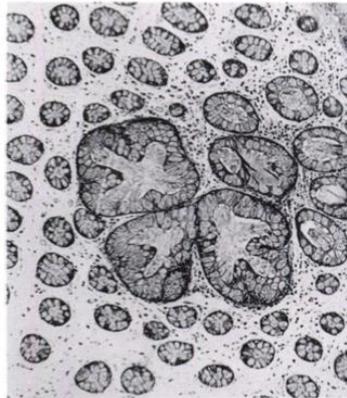


Figure 12 : Coupe histologique d'un foyer de cryptes aberrantes coliques d'un patient atteint d'un cancer sporadique.

Coupe de 3µm, coloration hématoxyline et éosine, Gx64. Adapté de (Pretlow, Barrow et al. 1991).

Classification clinique

La classification clinique des cancers colorectaux a été revue en 2010 et s'effectue selon trois critères : la taille et la profondeur de la tumeur (T), l'infiltration des ganglions périphériques (N), ainsi que la présence ou non de métastases dans d'autres organes (M) (Edge and Compton 2010) (Tableau 1).

Tumeur (T)	
T0	intra-épithéliale ou intra-muqueuse
T1	sous-muqueuse
T2	muscleuse
T3	sous-séreuse
T4a	pénétration du péritoine viscéral
T4b	envahissement d'un organe de voisinage
Infiltrat ganglionnaire (N)	
N0	N0 : pas de métastase ganglionnaire
N1a	N1a : 1 ganglion envahi
N1b	N1b : 2-3 ganglions envahis
N1c	dépôts tumoraux 'satellites' dans la sous-séreuse ou dans le tissu péri-colique non péritonisé, sans tissu ganglionnaire identifié
N2a	4-6 ganglions envahis
N2b	> 7 ganglions envahis.
Métastase (M)	
M0	pas de métastase
M1a	métastases à distance confinées à un organe
M1b	métastases atteignant plus d'un site métastatique ou atteinte du péritoine

Tableau 1 : Classification clinique des cancers colorectaux, selon (Edge and Compton 2010).

L'hétérogénéité des CCR est le reflet de la variété des facteurs de risques environnementaux, mais également des prédispositions et mutations génétiques. Des études de corrélation entre les facteurs génétiques et environnementaux, et les caractéristiques moléculaires ont permis de mieux comprendre le processus de carcinogenèse colorectale.

2) Carcinogenèse colorectale et voies de signalisation dérégulées

La séquence carcinogénèse s'établit telle quelle : **FCA (Foyer de Crypte Aberrante) < adénome de bas grade < adénome de haut grade < carcinome** sur 10 à 15 ans (Hamilton 1992). D'un point de vue moléculaire, le développement de cette séquence correspond à l'accumulation progressive de hits mutationnels, conduisant à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et/ou à l'activation d'oncogènes (Vogelstein, Fearon et al. 1988, Fearon and Vogelstein 1990). L'altération de ces gènes résulte de trois mécanismes : l'instabilité chromosomique, l'instabilité des microsatellites et les hyperméthylations des îlots CpG des promoteurs.

a) L'instabilité chromosomique (Chromosome INstability – CIN)

Il s'agit de l'instabilité la plus fréquente dans les CCR (~60%). Elle se traduit par des pertes d'hétérozygoties (Loss of Heterozygosity - LOH) ou perte d'allèles et une aneuploïdie des cellules (anomalie du nombre de chromosomes) (Pino and Chung 2010).

La mutation du gène suppresseur de tumeur, APC, intervient sur le chromosome 5q par une perte du second allèle aboutissant à une forme tronquée de la protéine.

Pour les cancers sporadiques, il initie la carcinogenèse colique et apparaît dans 80% des CCR (Senda, Iizuka-Kogo et al. 2007). Cette mutation aura deux conséquences. La première est que **APC ne pourra pas activer BUB1** (Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1) qui **favorise la ségrégation des kinétochores et permet de séparer correctement les chromosomes** (Fodde, Kuipers et al. 2001). La mutation affectera le rôle d'APC dans la prolifération épithéliale du côlon. Pour rappel, ce gène est un régulateur de la voie Wnt, et **s'il est muté**, il activera cette voie de manière constitutive. En effet, sa protéine ne permettra pas la formation du complexe permettant la dégradation de la **β-caténine, qui va alors être transloquée dans le noyau et activer la transcription de gènes cibles, tels que c-myc et Ccnd1** impliqués notamment dans la prolifération (He, Sparks et al. 1998, Tetsu and McCormick 1999).

La mutation du proto-oncogène, KRAS, intervient sur le chromosome 12. Ce gène est impliqué dans la différenciation et la croissance cellulaire et sa mutation s'effectue lors du processus de développement d'adénomes dans 40% des cas (Smith, Stern et al. 1994). KRAS régule la voie EGFR (Epidermic Growth Factor Receptor), impliquée dans la régulation de gènes cibles de la progression du cycle cellulaire. Lorsque **KRAS est muté, il favorise la prolifération cellulaire**. Si sa mutation a lieu après la mutation du gène APC, alors il y aura formation d'une tumeur, due à une prolifération cellulaire anarchique.

La mutation du suppresseur de gène, TP53, intervient sur le chromosome 17q. Ce gène code pour un facteur de transcription impliqué notamment dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, s'il y a des dommages de l'ADN, p53 qui est un acteur clé **du passage de la phase G1 en phase S**, va bloquer le cycle cellulaire. Si toutefois, ces dommages ne peuvent pas être réparés, **p53 va induire le processus apoptotique, par la transcription de gènes impliqués**, tels que BCL2 (Vousden 2002). Il est donc clair que si p53 est muté, il y aura une **dérégulation du cycle cellulaire**, des cellules contenant des anomalies persisteront et s'accumuleront. Cette mutation apparaît plus tardivement dans le processus de carcinogenèse colorectale et est présente dans 40 % à 70% des carcinomes invasifs.

La mutation du gène PI3KCA (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha), se localise sur l'unité catalytique du gène et est présente dans 15% des cas de CCR. Cette protéine a des fonctions diverses en fonction du récepteur ciblé, elle intervient notamment dans la prolifération et la survie et inhibe l'apoptose. Cette mutation engendre une activation constitutive de cette protéine et induit une **prolifération anarchique** (Nosho, Kawasaki et al. 2008).

b) L'instabilité des microsatellites (MicroSatellite Instability – MSI)

Une autre forme d'instabilité a été décrite initialement dans le syndrome de Lynch, l'instabilité microsatellitaire (Gryfe, Swallow et al. 1997). Les microsatellites sont des **séquences répétées en tandem au niveau de l'ADN**, qui peuvent être réparées en cas de mésappariement. Ceci se fait grâce au système de réparation des mésappariements de l'ADN (**MMR – MisMatch Repair**). Cependant, dans le cas d'une instabilité microsatellitaire, une inactivation bi-allélique apparaît pour l'un des gènes impliqués dans ce système (bien souvent, il s'agit des gènes MLH1 et MSH2). Cette **instabilité** est présente dans 15% des CCR sporadiques (Figure 12).

La dérégulation de la voie Wnt dans le CCR s'effectue donc par l'inactivation d'APC ou l'activation de la β -caténine, engendrant une **hyperprolifération visible dans les FCA** (Sancho, Batlle et al. 2004).

La mutation du gène TGF β (Transforming Growth Factor beta), qui est un facteur anti-prolifératif et pro-apoptotique, apparaît sur le début de la séquence codant pour le récepteur TGF β RII (Xu and Pasche 2007). Il interagit avec la voie SMAD pour favoriser la différenciation ou l'apoptose. TGF β RII est muté dans 30% des CCR et conduit à une **prolifération épithéliale incontrôlée**.

c) Les hyperméthylations des îlots CpG des promoteurs (CIMP – CpG Island Methylator Phenotype)

Ce mécanisme est le dernier à avoir été décrit et peut être retrouvé en association avec les deux autres (Toyota, Ahuja et al. 1999, Nazemalhosseini Mojarad, Kuppen et al. 2013). Les **îlots CpG sont des régions riches en cytosines (C) et en guanine (G) et sont souvent associés à des promoteurs**. La méthylation de ces îlots provoque une modification structurale de l'ADN et ainsi une inactivation des gènes touchés, tels que MLH1 ou BRAF (Figure 13).

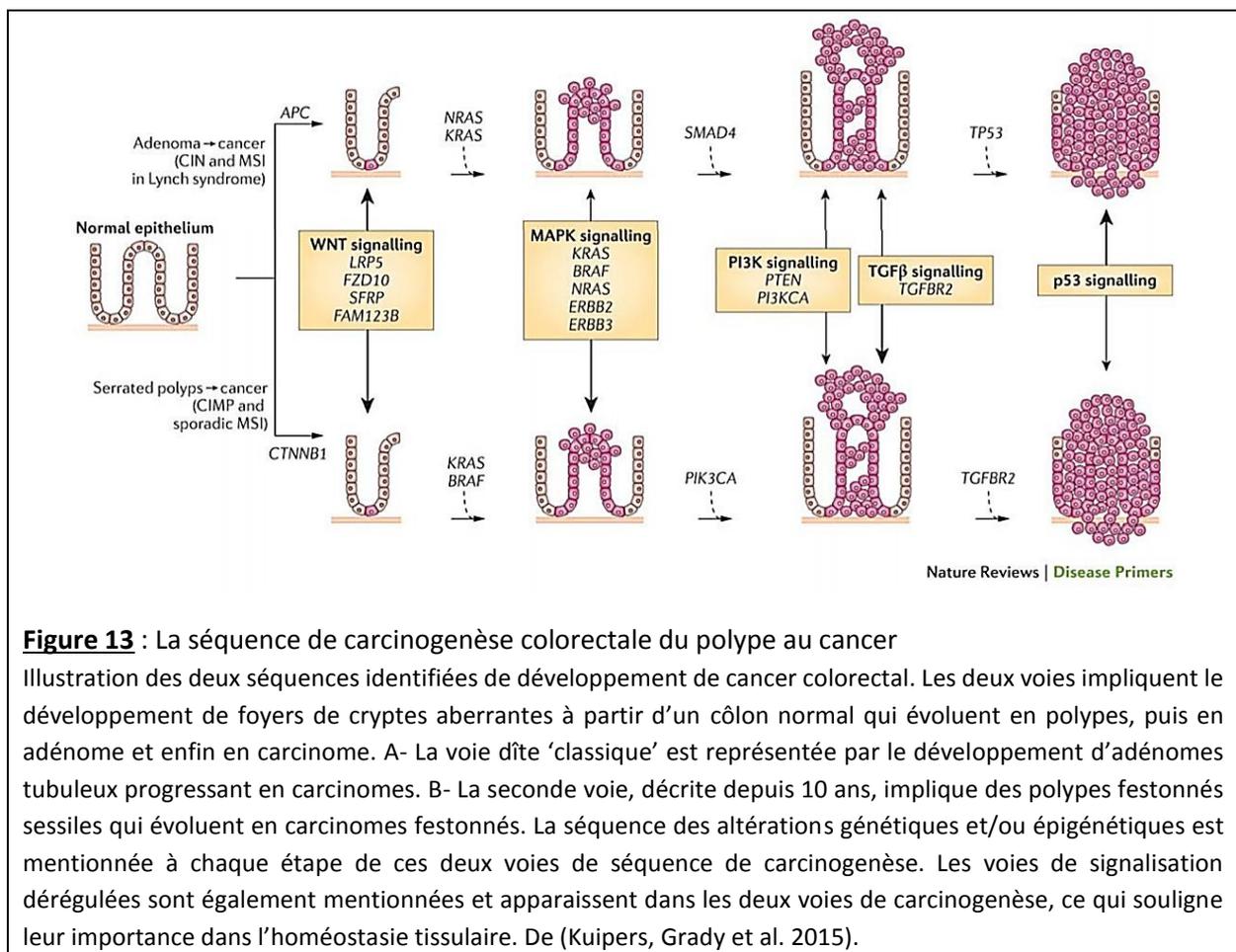


Figure 13 : La séquence de carcinogenèse colorectale du polype au cancer

Illustration des deux séquences identifiées de développement de cancer colorectal. Les deux voies impliquent le développement de foyers de cryptes aberrantes à partir d'un côlon normal qui évoluent en polypes, puis en adénome et enfin en carcinome. A- La voie dite 'classique' est représentée par le développement d'adénomes tubuleux progressant en carcinomes. B- La seconde voie, décrite depuis 10 ans, implique des polypes festonnés sessiles qui évoluent en carcinomes festonnés. La séquence des altérations génétiques et/ou épigénétiques est mentionnée à chaque étape de ces deux voies de séquence de carcinogenèse. Les voies de signalisation dérégulées sont également mentionnées et apparaissent dans les deux voies de carcinogenèse, ce qui souligne leur importance dans l'homéostasie tissulaire. De (Kuipers, Grady et al. 2015).

d) Implication des protéases et de leurs récepteurs dans un contexte de cancérisation

Dans un contexte de CCR, il a été observé une prolifération importante de cellules cancéreuses de côlon, d'autant plus si elles sont stimulées par l'ajout d'une protéase, la trypsine et de peptide agoniste du récepteur PAR₂ (Protease-Activated Receptor) (Darmoul, Marie et al. 2001). Quelques temps après, des ARNm de PAR₁ ont été retrouvés dans 11 lignées cellulaires cancéreuses humaines de côlon, comparées aux cellules épithéliales de côlon normal. L'expression de **PAR₁ était alors associée à la prolifération des cellules cancéreuses de côlon** (Darmoul, Gratio et al. 2003). De plus, l'activation de **PAR₂** entraîne une réduction de l'apoptose des cellules épithéliales coliques, en déclenchant la voie MAPK, **favorisant la survie cellulaire** (Iablokov, Hirota et al. 2014). Ceci a également été confirmé par notre équipe, qui démontre que **l'activation de PAR₂ régule la survie des cellules souches coliques** dans un modèle cellulaire 3D, appelé organoïde (qui sera décrit dans le chapitre suivant, page 69) (Nasri, Bonnet et al. 2016). Enfin, les protéases à sérine ont été récemment proposées comme biomarqueurs pour suivre l'évolution de la carcinogenèse. En effet, à partir de modèles de souris APC^{Min/+} et de patients atteints de CCR, les fluides interstitiels de côlon et le sérum ont été prélevés et la quantification protéomique a été réalisée. Parmi les 46 protéines identifiées, les élastases, la chymotrypsine, ainsi que la trypsine 2 et la trypsine 3 ont été identifiées et seraient de bons biomarqueurs à 90% de sensibilité et 80% de spécificité, pour suivre la carcinogenèse (Xie, Chen et al. 2016).

C'est pourquoi les protéases et leurs récepteurs, les PARs, sont des cibles prometteuses dans l'approche thérapeutique des altérations de la régénération épithéliale colique et ce point sera traité dans le chapitre III, II/, page 54.

3) Cellules initiatrices de cancer

À partir de quel type cellulaire, une tumeur se développe ? L'origine serait-elle une cellule différenciée, une cellule progénitrice, une cellule souche ou une combinaison de ces différents types cellulaires ? Cette question est cruciale étant donné que la population tumorale est hétérogène et les cellules initiatrices de tumeurs doivent être ciblées par les traitements anti-cancéreux afin d'éviter une récurrence tumorale. Cependant, les caractéristiques de ces cellules peuvent différer selon les tumeurs.

Deux hypothèses concernant l'identité de ces cellules à l'origine du cancer coexistaient, il y a encore quelques années (Grimwade and Enver 2004). En effet, la première hypothèse était le **modèle stochastique**, pour lequel **toutes les cellules tumorales** prolifèrent de façon importante selon l'environnement. Toutes les cellules du tissu, même les cellules différenciées, après avoir subies des mutations, peuvent proliférer de manière incontrôlée et aboutir à un clone tumoral.

L'hétérogénéité tumorale est ainsi la conséquence de la différenciation anarchique, des altérations génétiques et épigénétiques et de l'influence du microenvironnement (oxygène, nutriments, ...).

La seconde hypothèse est le **modèle hiérarchique** des **cellules souches cancéreuses**. Le développement tumoral est la conséquence de l'altération génétique d'une population cellulaire, les cellules souches. Ces cellules, de par leurs propriétés d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation vont induire une organisation dans le développement tumoral. L'hétérogénéité

cellulaire de la tumeur serait le résultat d'un arrêt de différenciation de certaines cellules à différents stades.

La notion de **cellules souches initiatrices de cancer** a été abordée pour la première fois dans les années 1970 et validée dans la leucémie à la fin du XX^{ème} siècle (Bonnet and Dick 1997). Une population de cellules néoplasiques, purifiée de patients atteints de leucémie, était **capable de s'auto-renouveler, de proliférer et de se différencier, induisant une hiérarchie au sein de la tumeur**. Cette notion de cellules souches initiatrices de cancer a ensuite été confirmée dans d'autres tumeurs solides et notamment dans le CCR. Une première étude a démontré que les cellules tumorales coliques CD133⁺ (qui ne représentent que 2,5% des cellules totales), implantées chez des souris immunodéficientes en sous-cutanée, généraient une tumeur identique à celle dont elles étaient issues. De plus, ces cellules CD133⁺ formaient des sphères tumorales non différenciées *in vitro* et pouvaient être maintenues plus d'un an en culture, grâce à leurs propriétés de survie et d'auto-renouvellement (Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007). Une seconde étude a également confirmé cette notion de cellules souches initiatrices de tumeur (Barker, Ridgway et al. 2009). Cette étude, invalidant le gène APC dans les cellules souches LGR5⁺, montrait l'importance de ce gène dans l'homéostasie épithéliale, par la formation de nombreux adénomes en 3 à 5 semaines. La mutation fut réalisée dans les cellules progénitrices et le développement d'adénomes était bien plus rare et plus lent (environ 30 semaines). Afin de savoir si ces adénomes étaient monoclonaux (suggérant le modèle hiérarchique) ou polyclonaux (du modèle stochastique), des expériences de lignage génétique utilisant le système de construction Cre/LoxP sur un modèle murin (Lgr5-EGFP-creERT2/Apc^{flox/flox}), ont permis de démontrer une origine monoclonale de ces adénomes. Ceci était donc la **confirmation du modèle hiérarchique et des cellules souches initiant le cancer**.

De plus, tous les cancers ne présentent pas la séquence hiérarchique des cellules souches, accumulant des mutations, proliférant de façon anarchique et amenant à une hétérogénéité cellulaire. **Les cellules progénitrices** peuvent sous conditions stressantes, subir des mutations et **acquérir des propriétés souches**, qui leur permettraient de proliférer et d'induire des tumeurs (Vermeulen, de Sousa e Melo et al. 2012). Cette notion avait été abordée bien avant par Cole et McKalen, qui faisaient l'observation que les polypes adénomateux étaient situés en haut de cryptes et n'avait pas de contact direct avec la zone des cellules souches (Cole and McKalen 1963).

Il est aujourd'hui admis que le modèle stochastique (théorie clonale) et le modèle hiérarchique (théorie souche) de tumorigenèse sont combinés en physiopathologie. Pour le CCR, la progression tumorale peut se faire de bas en haut de la crypte, de façon progressive, avec une persistance de cellules souches accumulant des mutations qui donneront naissance à des clones de progéniteurs. Alors que dans d'autres cas, comme l'inflammation, ce sont les progéniteurs qui sous dérégulation épigénétique réacquièrent des propriétés souches dans un contexte environnemental inapproprié et donnent naissance à la tumeur.

Dans tous les cas, pour qu'une cellule souche ou progénitrice devienne une cellule initiatrice de cancer, il faut qu'elle possède au moins quatre de ces capacités, selon (Hanahan and Weinberg 2000) :

- une autosuffisance en facteurs de croissance,
- une insensibilité aux facteurs inhibant la croissance,
- une insensibilité au processus d'apoptose,
- une répllication illimitée,
- une instabilité génomique,
- une angiogénèse maintenue,
- et une invasion tissulaire et métastatique.

4) *Prise en charge thérapeutique et ses limites*

La stratégie thérapeutique est dépendante du stade du CCR au moment du diagnostic, de sa localisation, de sa taille, de l'état de santé du patient et de son âge. En France, les patients doivent être informés de l'ampleur de leur pathologie et de toutes les possibilités thérapeutiques envisageables avec les bénéfices à court et moyen terme, ainsi que les effets indésirables associés.

Les thérapies proposées peuvent avoir des objectifs différents selon l'ampleur du cancer allant de la réduction des symptômes tels que la douleur, en bloquant le développement du cancer, jusqu'à la guérison en supprimant l'intégralité des cellules cancéreuses. Ainsi, différents traitements sont utilisés, la chirurgie, la chimiothérapie et les thérapies ciblées. Dans la majorité des cas, les traitements sont associés afin d'obtenir un meilleur résultat.

a) La chirurgie

La chirurgie est le premier traitement de référence les patients. Idéalement, la **résection** devrait suivre les **contours de la tumeur**, avec une marge dans le tissu sain (1mm), et devrait également comprendre **les ganglions lymphatiques associés**. Comme mentionné précédemment, le côlon n'est pas un organe vital, une partie ou la totalité du côlon peut être enlevée et le patient peut vivre presque normalement. Une des complications de la chirurgie peut être la fistule (infection) au niveau de l'anastomose. Cependant, cette complication est prévenue et n'est pas majeure. De plus, la chirurgie est ensuite associée à d'autres traitements permettant d'augmenter son efficacité, tels que la chimiothérapie ou les thérapies ciblées (décrites ensuite).

b) La chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement systémique, proposée dès que la tumeur est invasive et que les ganglions lymphatiques sont atteints. Il s'agit de la prise de molécules **anticancéreuses qui ont pour action de bloquer la prolifération des cellules cancéreuses**. La chimiothérapie peut être proposée avant, pendant ou après la chirurgie, afin de potentialiser son effet. De plus, afin d'utiliser la molécule la plus appropriée pour le traitement, une étude anatomopathologique et génétique est réalisée sur la résection colique. Ceci afin de rechercher une instabilité microsatellitaire qui aura une influence sur la réponse aux chimiothérapies (Kuipers, Grady et al. 2015). Si le patient ne possède pas encore de métastase, les traitements à base de 5-FluoroUracile (5-FU), d'oxaliplatine et d'irinotécan sont recommandés, en bloquant la synthèse de l'ADN. Si l'état métastatique est avéré, des traitements supplémentaires peuvent s'ajouter tels que la capecitabine, le raltitrexed, l'uracile-tegafur et des traitements ciblés.

L'inconvénient majeur de ces thérapies est que **toutes les cellules proliférantes, tumorales et saines sont touchées, d'où la présence de tels effets indésirables**. C'est pourquoi, la recherche de thérapies ciblées connaît un essor important afin d'augmenter l'efficacité de ces traitements et de diminuer les effets indésirables pour une qualité de vie acceptable.

c) Les thérapies ciblées

Le terme de thérapie ciblée est en adéquation avec l'action de ces traitements : ne cibler que les cellules cancéreuses et ainsi limiter les dommages aux cellules saines et réduire les effets indésirables. Ces traitements sont utilisés en association avec les chimiothérapies pour des CCR métastatiques. Ces traitements ciblés agissent sur la **capacité proliférative de la tumeur, en contrant les mécanismes permettant de se développer** (tels que l'angiogenèse et l'apport de l'oxygène et des nutriments) **ou en contrant les mécanismes favorisant la prolifération cellulaire** (tels que les facteurs de croissance). Aujourd'hui, il est possible d'utiliser trois médicaments, administrés par voie intraveineuse, qui sont des anticorps monoclonaux.

Le cetuximab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), empêchant ainsi l'induction de la cascade de signalisation des voies Ras/MAPK et PI3K, et ainsi la prolifération cellulaire anarchique (Jonker, O'Callaghan et al. 2007).

Le panitumumab est un anticorps monoclonal d'origine humaine, dirigé également contre l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Weber and McCormack 2008).

Le bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé, qui lie et bloque le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), acteur clé dans la vascularisation et l'angiogenèse (McCormack and Keam 2008).

L'inconvénient de ces thérapies ciblées est qu'elles ne ciblent pas spécifiquement les **cellules souches cancéreuses** qui sont à l'origine du développement tumoral et de son hétérogénéité. En effet, ces cellules ont une capacité de survie plus importante et sont dans un état de quiescence, leur permettant **d'échapper aux chimiothérapies conventionnelles**, et seraient responsables du taux de rechute après l'arrêt du traitement.

Le ciblage des cellules initiatrices de cancer est un défi majeur pour aboutir à une thérapeutique réellement curative, sans récurrence. Une prise en compte de leur microenvironnement dans cette approche est cruciale, puisque ce dernier est fréquemment altéré et est à l'origine de rechutes pathologiques. Pour effectuer ces recherches sur les mécanismes de survie, de prolifération et de différenciation anormales des cellules de tumeur colorectale, les lignées cellulaires et les modèles animaux sont insatisfaisants, puisqu'ils ne reflètent que partiellement et inexactly la physiopathologie humaine. C'est pourquoi, pour appréhender et comprendre le dialogue entre les cellules épithéliales et leurs partenaires cellulaires stromaux, des cocultures utilisant un modèle cellulaire *ex vivo* en 3D, les organoïdes, représente un outil intéressant. Il sera détaillé dans la partie IV, page 69.

La **régénération de la crypte colique** peut être **dérégulée** lors de processus physiopathologique comme l'inflammation et la cancérisation. En effet, **l'inflammation chronique** peut aboutir à un **défait de régénération**, alors que la **carcinogenèse** peut entraîner au contraire, une **régénération excessive et anarchique**. Ainsi, il est crucial de comprendre la physiologie des cellules souches et de l'homéostasie épithéliale colique et les **mécanismes impliqués** dans cette dérégulation de régénération, afin de pouvoir **proposer de nouvelles thérapies ciblées efficaces** et sans effet secondaire majeur.

Chapitre III / La thrombine, protéase aux multiples fonctions

Les **protéases**, ou peptidases, sont des enzymes protéolytiques, hydrolysant les ponts peptidiques des protéines. Il est à noter que 2% du génome codent pour les quelques 600 protéases déjà identifiées, suggérant ainsi **leurs rôles dans des voies de signalisations diverses et complexes** (Puenta, Sanchez et al. 2005). En fonction de l'acide aminé présent dans leur site catalytique, il est possible de distinguer cinq classes de protéases : les protéases aspartiques, les protéases à cystéine, les protéases à thréonine, les métalloprotéases et les protéases à sérine. **Les protéases à sérine** sont caractérisées par une triade catalytique formée d'une sérine, d'une histidine et d'une asparagine. Ces protéases sont impliquées dans des processus variés, tels que la composition du tissu conjonctif, l'inflammation immunitaire ou la cascade de coagulation. Ces protéases sont **majoritaires et très présentes au niveau de l'intestin et du côlon**. Parmi elles, la **thrombine**, qui est largement connue comme étant l'acteur clé du processus de coagulation, engendrant la formation de caillot sanguin par le clivage protéolytique du fibrinogène en fibrine, a fait l'objet de ce projet de thèse.

I/ La thrombine

1) Généralités

Comme les autres protéases à sérine, la thrombine est d'abord produite sous forme de précurseurs, ici la prothrombine, et activée par clivage protéolytique pour intervenir principalement dans le processus de **l'hémostase**, dont elle est à la fois **régulatrice et effectrice** (Royle, Irwin et al. 1987). Ainsi, le fibrinogène sera hydrolysé en fibrine, qui structurée en réseau formera le caillot sanguin, permettant de bloquer l'hémorragie. Les recherches sur la thrombine ont débuté après la description de la conversion du fibrinogène en fibrine en 1872, par Alexander Schmidt, qui émettait l'hypothèse qu'une enzyme en était responsable (Schmidt 1872).

2) Structure, activité et régulation

Le gène codant la prothrombine, FII, est localisé sur le chromosome 11 (Royle, Irwin et al. 1987). La prothrombine a un poids moléculaire de 72 kDa et est composée de quatre domaines :

- le domaine N-terminal ou domaine 'Gla' (γ -carboxyglutamique), permettant de lier les ions calcium avec une haute affinité,
- deux domaines 'kringle', caractérisés par trois boucles stabilisées par des ponts disulfures, essentiels aux interactions protéine-protéine,
- et un domaine serine protéase inactif (36 kDa).

a) Structure

La thrombine peut exister sous trois formes, α , β et γ . Ces formes se distinguent par leur clivage. Ainsi, la **thrombine active**, correspondant à la **forme α** , subi un clivage entre l'isoleucine 321 et l'arginine 322. Les autres formes, sont clivées en amont du clivage de la forme α et ne sont pas actives (Di Cera 2008). D'un point de vue structural, la thrombine ressemble aux autres protéases à sérine, avec **une triade catalytique identique Ser²⁰⁵, His⁴³ et Asp⁹⁹**. Elle possède **un site catalytique et deux exosites** (exosite I et exosite II) (Figure 14).

L'**exosite I** contient plusieurs résidus chargés positivement provoquant un fort champ électrostatique la liant au **fibrinogène**, à la **thrombomoduline**, à l'**hirudine** et au **PAR₁**. L'exosite I est donc considéré comme un épitope de liaison (Di Cera 2008).

L'**exosite II** est opposé à l'exosite I, en C-terminal et possède une affinité pour des ligands polyanioniques tels que l'**héparine** et les **glucosaminoglycanes** (Gan, Li et al. 1994, Tsiang, Jain et al. 1995, Carter, Cama et al. 2005).

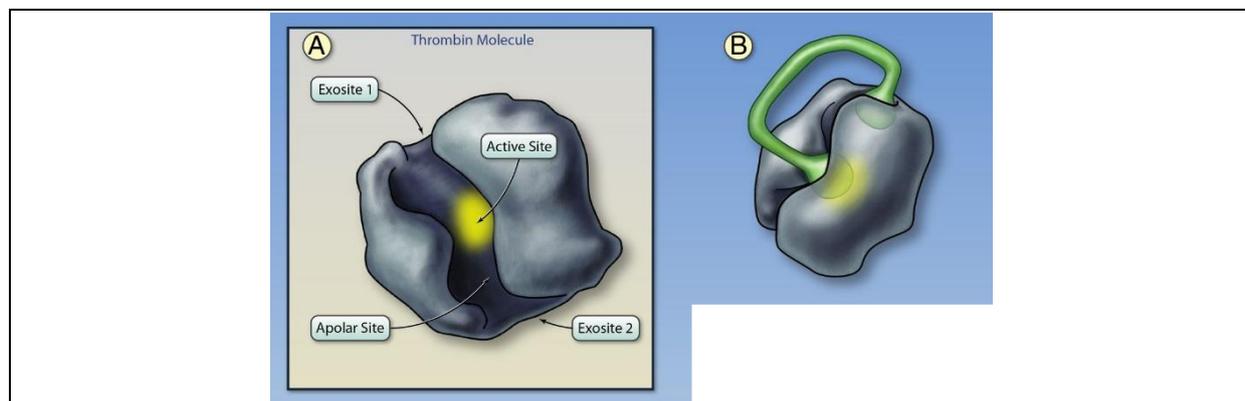


Figure 14 : Structure schématique de la thrombine.

A – Le site actif de la thrombine est représenté en jaune, dans la poche catalytique. Les exosites I et II sont de part et d'autre de ce site actif. L'exosite I augmente l'affinité des substrats à la thrombine, tels que le fibrinogène, la thrombomoduline et les PARs. L'exosite II lie l'héparine et les glucosaminoglycanes. **B** – L'hirudine inhibe la thrombine en se liant à l'exosite I et au site actif. Adapté de (Coppens, Eikelboom et al. 2012).

b) Régulation de l'activité

La régulation de l'activité à travers le couplage aux ions métalliques, joue un rôle essentiel dans de nombreuses réactions enzymatiques. **Les ions sodium, Na⁺**, sont les ions métalliques les plus représentés dans le plasma sanguin humain (Page and Di Cera 2006). L'implication des ions sodium est nécessaire afin de potentialiser **la liaison de la thrombine aux substrats pro-coagulants (fibrinogène), anticoagulants (protéine C) et pro-thrombotiques (PARs)** (Di Cera 2003, Di Cera 2007). En effet, il a été démontré que l'activation de la thrombine par les ions sodium sur son site Na⁺, est **spécifique et allostérique** (Wells and Di Cera 1992). L'allostérie se caractérise par un changement conformationnel et une modification de l'activité de l'enzyme, induite par la fixation d'une molécule effectrice à un site différent du site actif de l'enzyme. Ainsi, quand **le site Na⁺ est libre**, la thrombine possède une **activité faible et s'établit lentement**, tandis que lorsque le site est lié aux Na⁺, l'activité de la thrombine est **élevée et s'établit rapidement**. La rapidité, la durée et la spécificité de la liaison de la thrombine à un substrat donné, sont dépendantes de la liaison d'ions sodium. En effet, la conformation structurelle de la thrombine produite par la liaison aux ions sodium, va potentialiser la liaison et la catalyse du fibrinogène, alors que la liaison sodique ne sera pas bénéfique pour la liaison et le clivage de la protéine C (Di Cera 2008).

De plus, la prothrombine, initialement sécrétée par le foie, subie des modifications post-transcriptionnelles, par la vitamine K, sur le domaine *Gla*. Ainsi, la prothrombine pourra en présence d'ions calcium se lier aux bicouches lipidiques, à la surface des cellules.

Il s'agit donc d'une **protéase vitamine K-dépendante**. Classiquement, **la thrombine est l'acteur clé de la cascade de coagulation**. Cette cascade de coagulation fait intervenir deux voies.

La première, **la voie extrinsèque**, est **dépendante du facteur tissulaire (TF)** et permet de **générer rapidement un taux important de thrombine**. Lorsque l'intégrité vasculaire est endommagée, le facteur VII est activé et se lie au TF. Ce TF est exprimé par les cellules épithéliales, les leucocytes, les fibroblastes et les macrophages. Le complexe VIIa/TF active à son tour le FX et le FIX. Le complexe prothrombinase active FII et induit la formation du caillot sanguin. Ce processus est cyclique, par l'activation du FV, FVIII et FXI qui maintiennent l'activation de la thrombine (Coughlin 2000).

La seconde voie, **la voie intrinsèque** se caractérise par l'activation du FXII au contact **d'un vaisseau lésé**. Il active le FXI en présence d'ions calcium, qui à son tour activera le FIX. La faible dose de thrombine alors produite, active le FVIII, qui va se complexer au FIXa et au calcium pour activer le FX. La suite de la cascade est similaire à la voie extrinsèque, avec une complexation FXa et FVa, qui activera la thrombine (FIIa) (Figure 15).

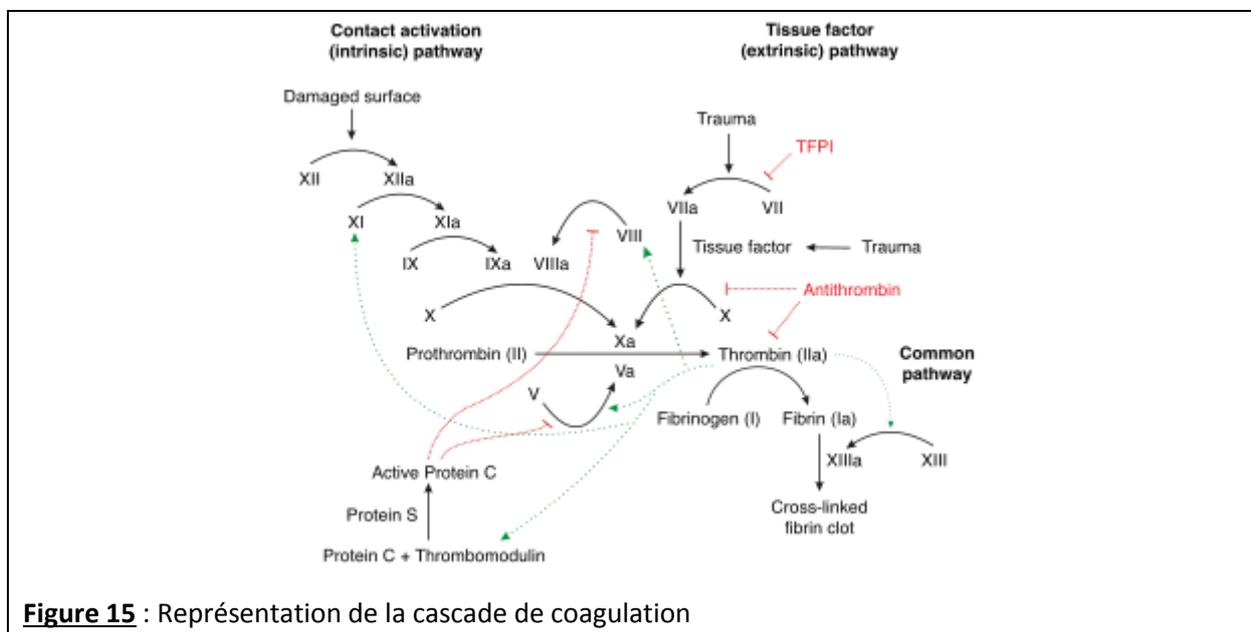


Figure 15 : Représentation de la cascade de coagulation

Comme mentionné sur la représentation de la cascade de coagulation (Figure 18), une fois la **thrombine activée**, elle active à son tour plusieurs **facteurs de coagulation** qui maintiennent et amplifient **l'effet pro-coagulant**, tel une boucle sans fin.

Cependant, plusieurs acteurs permettent de réguler l'activité de la thrombine, mais également les différents facteurs impliqués dans cette cascade. C'est notamment le cas de la thrombomoduline, de la protéine C et de son cofacteur la protéine S, l'antithrombine et le TFPI (Tissue Factor Protein Inhibitor) (Mann 2003).

- La **thrombomoduline**, est une protéine membranaire exprimée à la surface des cellules endothéliales qui permet le rétrocontrôle négatif de la thrombine. En effet, en liant la thrombine au niveau de son **exosite I**, elle va **activer la protéine C**. L'activité de cette protéine sera augmentée en étant couplée à son cofacteur, la protéine S. Ainsi, la **protéine C activée va stopper la cascade de coagulation, en inhibant FVa et FVIIIa**,

ce qui diminuera la production de prothrombinase et son activation en thrombine. De plus, la thrombine sera inhibée par **l'antithrombine qui viendra s'ancrer dans l'exosite I** (Esmon 2003).

- **L'héparine** augmente l'inhibition de la thrombine via l'antithrombine. **Le complexe antithrombine/héparine va alors s'ancrer dans l'exosite II et le site actif** de la thrombine, par couplage électrostatique (Gettins 2002, Dementiev, Petitou et al. 2004, Li, Johnson et al. 2004).
- **Le TFPI** est exprimé sur les cellules endothéliales et intervient dans la régulation de la voie extrinsèque, en bloquant le complexe TF/FVIIa, ainsi que le FXa (Sanders, Bajaj et al. 1985).
- Quant à **l'hirudine**, elle bloque l'accès au site actif de la thrombine en utilisant son domaine N-terminal et lie également l'exosite I via son domaine C-terminal (Rydel, Tulinsky et al. 1991).

Les autres inhibiteurs de protéases à sérine. Au vu de leurs implications, l'activité des protéases doit être finement régulée physiologiquement. En effet, plusieurs mécanismes permettent ce contrôle, avec notamment la synthèse et sécrétion de zymogènes, la dégradation des enzymes actives, ainsi que la présence d'inhibiteurs à protéases.

-Les inhibiteurs dits canoniques, sont nombreux et leur taille varie de 14 à 200 acides aminés. Leur mécanisme d'inhibition est classique, par la présence d'une boucle externe contenant le site actif. Cette boucle va induire l'inhibition de la protéase ciblée, grâce à sa liaison sur le site protéolytique de cette même protéase (et sans provoquer de changement conformationnel de l'un ou de l'autre). La particularité de cette boucle externe est de posséder des ponts disulfures permettant une forte stabilité. Ces inhibiteurs agissent sur certaines protéases impliquées dans la cascade de coagulation, telles que TAP (Tick Anticoagulant Peptide) (Krowarsch, Cierpicki et al. 2003). D'autres inhibiteurs ont un rôle dans la balance protéolytique intestinale, telles que SLPI (Secretory Leukocyte Protease Inhibitor) et l'élafine, sécrétées sur le site inflammatoire. Le **SLPI** est exprimé dans les macrophages et neutrophiles de la lamina propria et dans les cellules épithéliales coliques (Doumas, Kolokotronis et al. 2005). Il inhibe l'activité de l'élastase du pancréas, l'élastase du neutrophile, la trypsine, la chymotrypsine, la chymase et la cathepsine G (Ohlsson, Bergenfeldt et al. 1988). Concernant **l'élafine**, qui est aussi exprimée dans les cellules épithéliales coliques, elle inhibe l'activité des élastases et de la protéinase 3 (Kramps and Klasen 1985, Nara, Ito et al. 1994, Schmid, Fellermann et al. 2007).

-Les inhibiteurs non-canoniques, ont un mécanisme d'inhibition différent de celui des inhibiteurs canoniques, puisqu'ils agissent au travers d'un segment N-terminal, possédant le site actif. Grâce à la longueur de ce segment, deux liaisons s'établiront : une au niveau du site actif de l'inhibiteur et du site protéolytique de la protéase et une seconde liaison engendrant la spécificité, la robustesse et la vitesse de reconnaissance. C'est notamment le cas de l'hirudine inhibant l'activité de la thrombine et du facteur X, tous deux impliqués dans la cascade de coagulation (Krowarsch, Cierpicki et al. 2003).

Afin de connaître les rôles pro- et anticoagulants de la thrombine, des études de **mutagenèse dirigée** ont émergé dès les années 90. En effet, Wu et ses collaborateurs ont été les premiers ont reporté que la mutation de l'arginine75 en acide glutamique, au niveau de l'exosite I, amenait à une faible activité de protéine C (7%) en présence de thrombomoduline, sans affecter la formation de caillot sanguin. Ces auteurs ont également créé une autre mutation en amont de l'exosite I et observaient une augmentation de l'activité de la protéine C (d'un ratio 2,5) et une conversion de fibrinogène en fibrine diminuée (17%) (Wu, Sheehan et al. 1991).

Depuis, une librairie a été éditée afin de cartographier les épitopes et leur localisation, reconnaissant le fibrinogène, la protéine C et la thrombomoduline. Ceci dans le but d'identifier les résidus impliqués dans le rôle pro- et anticoagulant, mais également dans le rôle prothrombotique de la thrombine (par l'activation des PARs). La mutation la plus connue est la mutation congénitale G20210A. L'homozygotie de cette mutation expose à un risque plus élevé de thrombose, que la mutation hétérozygote. De plus, il a été reporté une relation entre les patients atteints de MICI et l'incidence des thromboses artérielles (Bernstein, Wajda et al. 2008).

III/ Les PARs (Protease-Activated Receptors)

1) *Découverte et structure*

a) *Découverte*

Les PARs appartiennent à la famille de **récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)** à 7 domaines transmembranaires. Quatre PARs ont été identifiés, **PAR₁**, **PAR₂**, **PAR₃** et **PAR₄**, en fonction de leur ordre de clonage (Hollenberg and Compton 2002). Étonnamment, les gènes de PAR₁, PAR₂ et PAR₃ sont localisés sur le chromosome 5q, alors que le gène de PAR₄ est localisé sur le chromosome 19p. Ces PARs sont ubiquitaires, avec une expression variable selon les tissus et le contexte physiopathologique (Ossovskaya and Bunnett 2004).

Le 1^{er} récepteur de cette famille à avoir été cloné fut **PAR₁** en 1991. Lors de cette étude, les auteurs souhaitaient découvrir et mettre en évidence le type de récepteurs impliqué dans les mécanismes d'action de la thrombine dans les processus biologiques tels que l'inflammation et l'hémostase (L'Allemain et al. 1991; Vu, Hung et al. 1991). Leurs résultats ont permis de mettre en évidence un nouveau type de récepteurs activable après clivage protéolytique par la thrombine.

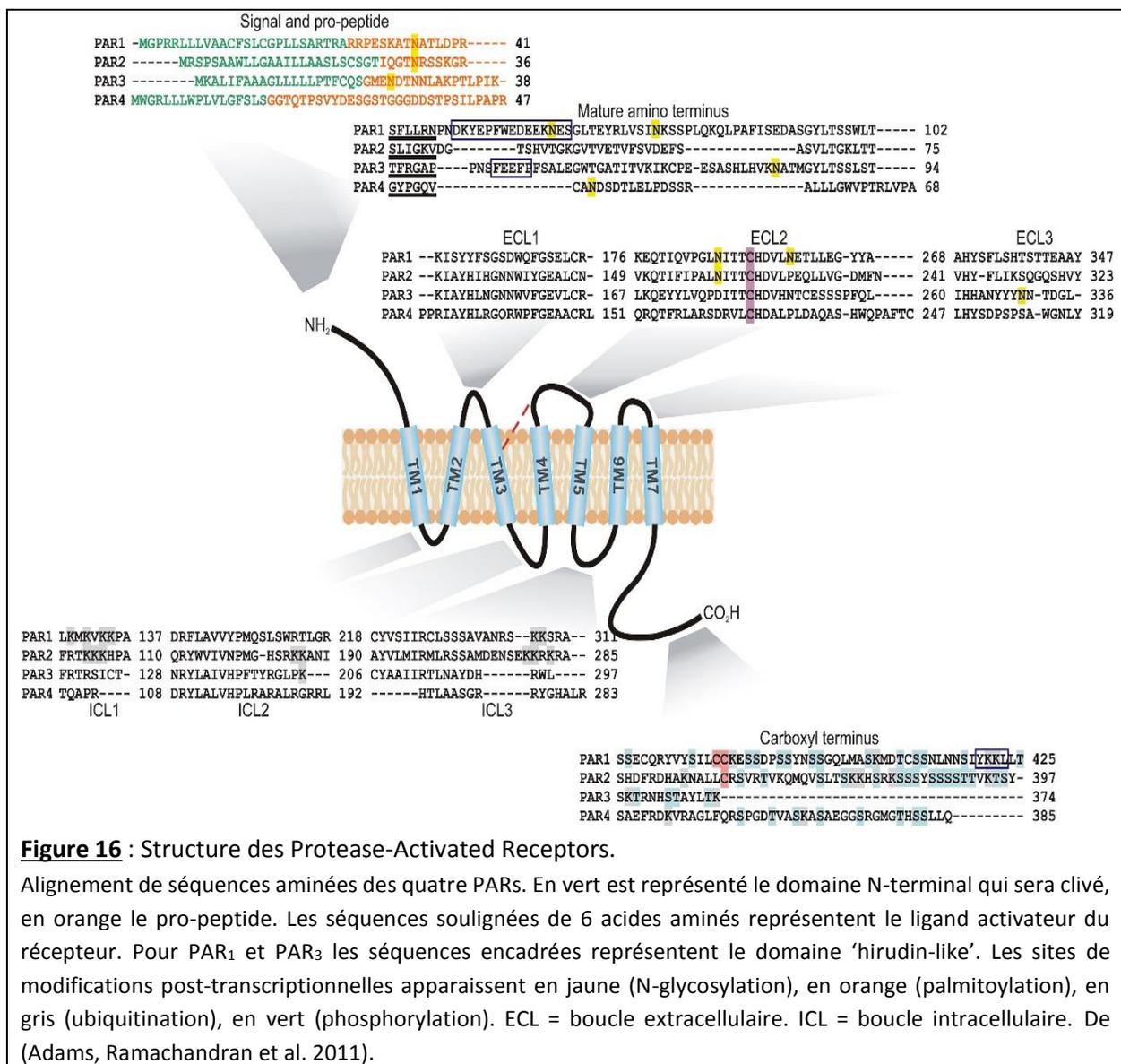
Le clonage des autres PARs s'est ensuite poursuivi, avec **PAR₂** en 1994. A partir d'une séquence protéique prédite similaire à celle de PAR₁, les auteurs ont voulu savoir si l'activation de ce récepteur était similaire à l'activation de PAR₁ et via la thrombine. Ce récepteur était bien activé par la trypsine, ce qui était précédemment connu, mais ne pouvait être activé via la thrombine. De plus, un peptide agoniste exogène de ce récepteur permettait son activation, suggérant l'importance de ce clivage protéolytique dans l'activation du récepteur. Ce récepteur fut dénommé PAR₂ (Nystedt, Emilsson et al. 1994). Aujourd'hui, il est établi que PAR₂ peut être indirectement activé par la thrombine par mécanisme de transactivation (détaillé page 59) (O'Brien, Prevost et al. 2000), ou directement chez un modèle murin KO pour PAR₁, déclenchant la signalisation de la vasodilatation de l'aorte et la signalisation des MAPK (Mihara, Ramachandran et al. 2016).

PAR₃, découvert en 1997 par une même démarche scientifique, est également activable par la thrombine et serait un cofacteur de PAR₄ (Ishihara, Connolly et al. 1997). Aucun peptide agoniste exogène et spécifique ne peut l'activer, à ce jour.

Enfin **PAR₄** a été découvert quelques temps après et est activable par la trypsine et la thrombine (Xu, Andersen et al. 1998).

b) Structure

Les gènes codant pour les PARs sont constitués de deux exons. Le premier permet de générer une séquence N-terminale plus étendue que la plupart des RCPG, possédant le **site de clivage** et le second exon code pour le **récepteur lui-même** (Kahn, Hammes et al. 1998). Les PARs sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires (TM), avec un domaine N-terminal de 17 à 26 acides aminés, un pro-domaine de 11 à 30 acides aminés, 3 boucles intracellulaires (ICL) et 3 boucles extracellulaires (ECL), ainsi qu'un domaine C-terminal de 13 à 51 acides aminés (Figure 16). **PAR₁ et PAR₃ possèdent un domaine 'hirudin-like'**, permettant à la thrombine de se lier plus spécifiquement (Vu, Hung et al. 1991). Ces récepteurs peuvent également subir des modifications post-transcriptionnelles (phosphorylation, ubiquitination, ...). Chaque récepteur possède un **ligand activateur** : FLLLR pour PAR₁, SLIGKV pour PAR₂, TFRGAP pour PAR₃ et GYPGQV pour PAR₄. Ce ligand est suivi d'une séquence d'acides aminés ayant pour fonction de bloquer son auto-activation (Coughlin 2000).



2) Mécanismes des PARs

a) Activation des PARs

Activation canonique

L'**activation des PARs** par clivage protéolytique au niveau du **site canonique** du domaine N-terminal, sous l'action d'une protéase, **révélant le ligand activateur** du récepteur **est irréversible**. Ce ligand va ensuite se **lier à la seconde boucle extracellulaire du récepteur**, entraînant son **changement conformationnel qui induira une cascade de signalisation** (Macfarlane, Seatter et al. 2001).

PAR₁ est clivé au niveau de son site canonique, **LDPR⁴¹↓S⁴²FLLRN**, par la thrombine (Molino, Barnathan et al. 1997).

PAR₂ peut être activé au niveau de son site de clivage canonique, **SKGR³⁴↓S³⁵LIGKV**, par la trypsine (Nystedt, Emilsson et al. 1994).

PAR₃ possède ce site de clivage : **LPIK³⁸↓T³⁹FRGAP** pour la thrombine (Ishihara, Connolly et al. 1997). Son activation n'induit pas de transduction de signal et comparé aux autres récepteurs, les protéases pouvant potentiellement l'activer n'ont pas été identifiées à ce jour.

PAR₄ peut être clivé par la thrombine et la trypsine à des doses similaires, au niveau de ce site canonique : **PAPR⁴⁷↓G⁴⁸YPGQV** (Xu, Andersen et al. 1998). PAR₄ peut également être activé par la cathepsine G, la plasmine, le facteur X et les kallikréines (Sambrano, Huang et al. 2000, Camerer, Kataoka et al. 2002, Quinton, Kim et al. 2004, Oikonomopoulou, Hansen et al. 2006).

Activation non canonique ou biaisée

Une nouvelle notion est ensuite apparue, celle de l'**activation biaisée**. Elle se caractérise par une **activation du récepteur sur d'autres sites que le site de clivage canonique**, et sont nommés '**sites non-canoniques**'. Cette activation biaisée va alors provoquer une **signalisation incomplète ou différente** de celle observée après une activation canonique. Les protéases peuvent activer les PARs de façon biaisée.

L'activation biaisée a d'abord été identifiée pour **PAR₁** (Boire, Covic et al. 2005). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que MMP1 pouvait activer PAR₁ via un ligand activateur situé deux acides aminés en amont de celui de la thrombine (ligand PRSFLLR) et engendrait la même signalisation que celle provoquée par l'activation du récepteur par la thrombine. Cependant, une autre équipe a pu montrer l'activation biaisée de PAR₁ avec une signalisation différente. Cette activation était induite par la protéine C activée sur un site non-canonique et favorisait des effets opposés à l'activation par la thrombine, c'est-à-dire un effet anti-inflammatoire et une protection de la barrière endothéliale (Russo, Soh et al. 2009). PAR₁ peut également être activé de façon biaisée par d'autres protéases et acteurs de la cascade de coagulation, telles que la plasmine, le facteur X, les granzymes A, les trypsines, les kallikréines et la cathepsine G (Vu, Hung et al. 1991, Suidan, Bouvier et al. 1994, Kuliopulos, Covic et al. 1999, Camerer, Kataoka et al. 2002, Riewald, Petrovan et al. 2002, Knecht, Cottrell et al. 2007, Wilson, Nannuru et al. 2009, Gao, Chao et al. 2010).

Concernant **PAR₂**, une étude a pu démontrer le rôle de l'élastase du neutrophile dans la signalisation MAPK au travers de l'activation biaisée de PAR₂ (Ramachandran, Mihara et al. 2011).

PAR₂ peut également être activé par d'autres protéases à sérine, telles que la tryptase, les granzymes et les kallikréines (Molino, Barnathan et al. 1997, Hansen, Sherman et al. 2005, Oikonomopoulou, Hansen et al. 2006).

Enfin, aucune étude démontrant l'activation biaisée de PAR₃ et de PAR₄ n'a été publiée à ce jour. Toutefois, cela ne veut pas dire que ce mécanisme n'existe pas pour ces récepteurs.

Activation par les peptides agonistes

Ainsi, au vu de la diversité des éléments pouvant cliver et activer les PARs, **il n'était pas aisé d'identifier les mécanismes d'activation d'un seul récepteur à la fois**. En effet, pour exemple la thrombine peut activer PAR₁, PAR₃ et PAR₄. La signalisation déclenchée par PAR₁ via la thrombine ne peut alors être isolée et étudiée précisément. C'est pourquoi, l'utilisation de séquences peptidiques synthétiques ou **peptides agonistes** de 5 à 6 acides aminés a été primordiale (identiques au ligand activateur de PAR₁, de PAR₂ et de PAR₄) (Vu, Hung et al. 1991, Scarborough, Naughton et al. 1992, Ossovskaya and Bunnett 2004).

Plusieurs séquences peptidiques ont été développées afin d'activer PAR₁, avec un nombre d'acides aminés différent, des résidus hydrophiles supplémentaires ou des substitutions d'acides aminés par rapport à la séquence du ligand activateur de PAR₁. Finalement, la séquence étant la plus efficace était en fait similaire à la séquence du ligand activateur de PAR₁, **TFLLR** (Feng, Veber et al. 1995). Un autre point a été soulevé en réalisant cette étude de peptides agonistes, celui de la signalisation induite. En effet, il a été observé que la **signalisation engendrée via un peptide agoniste n'était pas identique** en tous points à celle engendrée par un clivage protéolytique, confirmant l'activation biaisée. Par exemple, plusieurs peptides agonistes pour PAR₁ ont été testés et ont montré des effets opposés sur la signalisation déclenchant l'activation plaquettaire : pas d'activation, peu d'activation ou activation (Mao, Jin et al. 2008). De plus, la voie MAPK engendrée par l'activation de PAR₁ via la thrombine n'est pas déclenchée par le peptide agoniste SFLLRN-NH₂ (Vouret-Craviari, Van Obberghen-Schilling et al. 1992). Sauf si les doses de peptides agonistes utilisés étaient nettement supérieures (100 fois) par rapport à la dose couramment utilisée (Blackhart, Ruslim-Litrus et al. 2000).

Des approches similaires ont été réalisées pour activer PAR₂ via un peptide agoniste. Une fois encore, **selon le peptide agoniste testé, le résultat n'était pas identique**. En effet, le peptide agoniste SLAAAA entraînait un relargage calcique intracellulaire, la signalisation de la voie MAPK et l'internalisation du récepteur (Al-Ani, Hansen et al. 2004). Alors que le peptide agoniste SLAAAA-NH₂, n'induisait que le relargage calcique intracellulaire (Ramachandran, Mihara et al. 2009). Une séquence activatrice a alors été validée : **SLIGKV**, entraînant un relargage calcique intracellulaire dans des lignées cellulaires de rat et d'humain (Maryanoff, Santulli et al. 2001, Kawabata, Kanke et al. 2004, McGuire 2004). Quelques années après, d'autres études supplémentaires ont permis de potentialiser le peptide agoniste de PAR₂, en ajoutant un 7^{ème} voire un 8^{ème} acide aminé de type leucine (Barry, Suen et al. 2007). Ces peptides agonistes sont stables, mais ont une faible biodisponibilité et une faible solubilité.

Concernant PAR₃, des peptides ont également été générés. Cependant, **ces derniers** tels que TFRGAP-NH₂, activent plutôt PAR₄ et la voie de signalisation MAPK. **PAR₃ et PAR₄** se dimériseraient en réponse à la thrombine (activation détaillée ensuite, page 58) (Nakanishi-Matsui, Zheng et al. 2000, McLaughlin, Patterson et al. 2007).

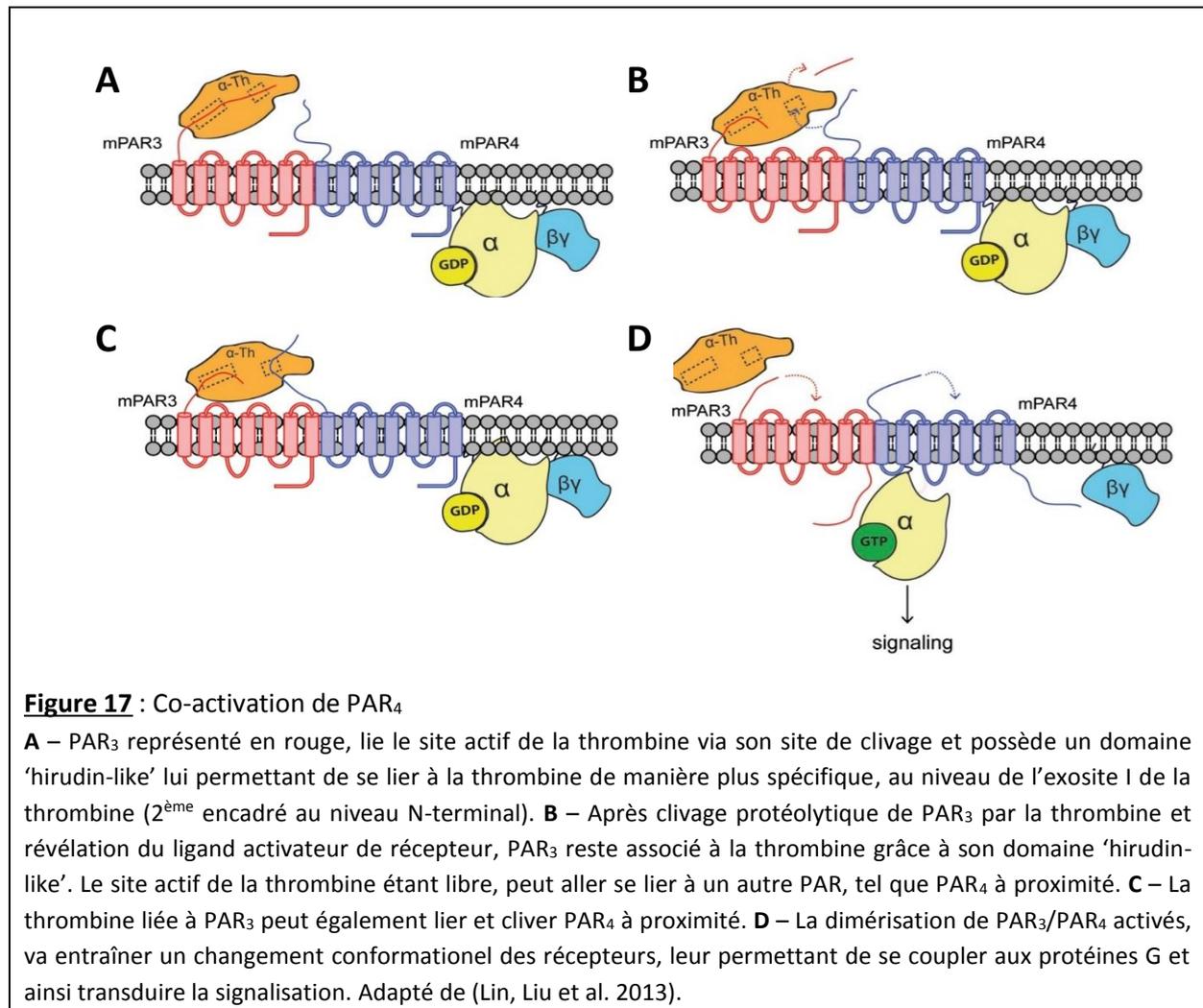
Pour activer spécifiquement PAR₄, le peptide agoniste identifié est **GYPGQV-NH₂**, engendrant une contractilité de l'aorte et des muscles longitudinaux gastriques chez le rat (Hollenberg, Saifeddine et al. 1999).

Désarmage

L'activation des PARs peut être inhibée par **désarmage**. En effet, certaines protéases peuvent prévenir le clivage protéolytique canonique par **un clivage protéolytique en amont de la séquence du ligand activateur du récepteur** pour le libérer. Le 2nd mécanisme fait intervenir un **clivage protéolytique dans la séquence du récepteur** pour empêcher l'induction de signalisation (Kawabata, Kuroda et al. 1999, Hansen, Oikonomopoulou et al. 2008, Ramachandran and Hollenberg 2008). Par exemple, la kallikréine 14 (KLK14) désarme PAR₁ des cellules plaquettaires de rat et d'humain (Oikonomopoulou, Hansen et al. 2006). Mais PAR₁ peut également être désarmé par la trypsine, la cathepsine G, l'élastase et la plasmine (Molino, Blanchard et al. 1995, Renesto, Si-Tahar et al. 1997, Kawabata, Kuroda et al. 1999, Kuliopulos, Covic et al. 1999). Le désarmage de PAR₂ peut être réalisé par la plasmine, la proteinase3 (PR3), l'élastase et la cathepsine G (Loew, Perrault et al. 2000, Dulon, Cande et al. 2003).

Co-activation des PARs

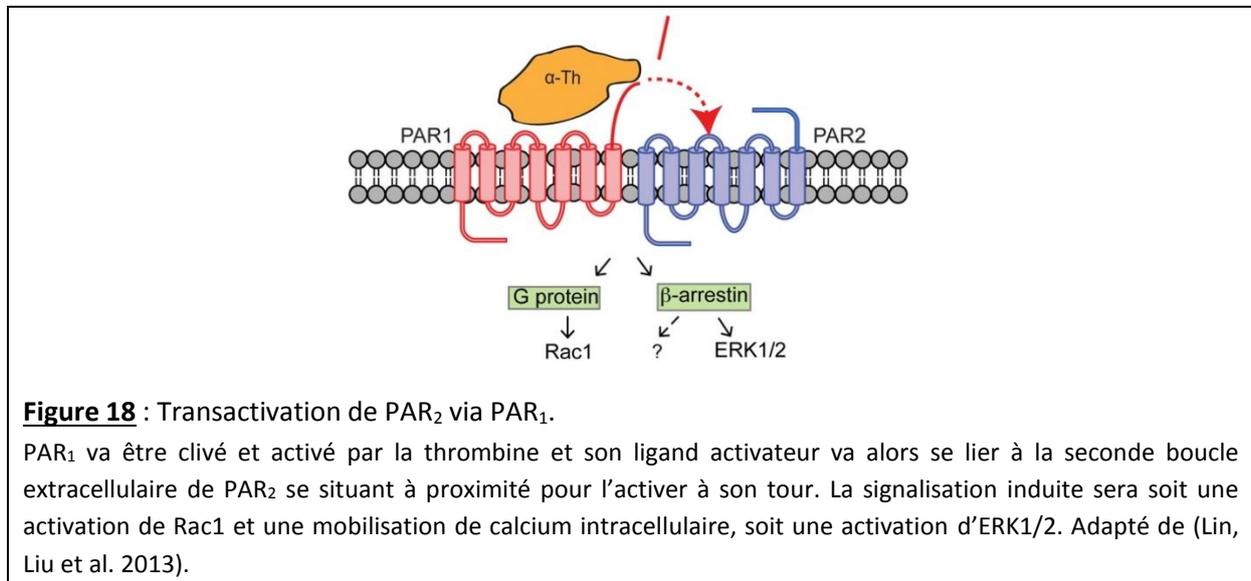
Les PARs peuvent également être activés grâce à une co-activation ou une transactivation. En effet, **le domaine 'hirudin-like'** présent sur la séquence de PAR₁ et de PAR₃, permet d'augmenter l'affinité de ces récepteurs pour la thrombine, mais également **d'activer PAR₄** (qui ne possède pas ce domaine) (Figure 17). En effet, une étude a mis en évidence que l'expression seule de PAR₃ dans des cellules COS7 (cellules fibroblastiques de rein de singe) n'induisait aucune signalisation (hydrolyse de phosphoinositide – PI et relargage calcique intracellulaire suivis) après administration de thrombine. Les mêmes cellules exprimant cette fois PAR₄, présentaient une signalisation d'IP₃ (Inositol triPhosphate₃), après activation par la thrombine (EC₅₀= 0,3nM). Ensuite, une transfection a permis à ces cellules d'exprimer à la fois PAR₃ et PAR₄, et déclenchaient la même signalisation, que si elles n'exprimaient que PAR₄, après stimulation à la thrombine, mais à une plus faible dose (EC₅₀=0,05nM). Ces résultats suggéraient une activation de PAR₄ plus importante, induite par PAR₃. **La co-activation de PAR₄ par PAR₃ a alors été confirmée** (Nakanishi-Matsui, Zheng et al. 2000). Plus précisément, PAR₃ va lier la thrombine au travers de son exosite I, permettant au site actif de la thrombine de rester libre et d'activer d'autres PARs. PAR₃ va alors changer la conformation de la thrombine et induire une meilleure affinité de celle-ci pour PAR₄. Ce mécanisme a été observé par cristallographie (Bah, Chen et al. 2007). **L'activation de PAR₄ via PAR₁ a également été confirmée**. En effet, une étude a mis en évidence par technique de FRET et de co-immunoprécipitation, l'hétérodimérisation de PAR₁ et PAR₄, induite par la thrombine, augmentant bien plus l'agrégation plaquettaire engendrée par PAR₄ seule (Leger, Jacques et al. 2006).



Transactivation

PAR₁ peut être activé par un autre mécanisme, appelé **transactivation**. La première étude à avoir mis en évidence ce phénomène date de 1996 (Blackhart, Emilsson et al. 1996). Blackhart et ses collaborateurs souhaitaient connaître la spécificité des ligands activateurs des récepteurs PAR₁ et PAR₂ (SFLLRN et SLIGKV) aux agonistes en analysant la réactivité croisée de ces récepteurs. Au vu des similarités de séquences, les auteurs ont regardé si le peptide agoniste de PAR₂ pouvait activer PAR₁ (dans un modèle d'étude exprimant ces récepteurs). Les résultats confirmaient leur hypothèse. La seconde étape a été de savoir **si la thrombine pouvait activer PAR₂ au travers de PAR₁**, comme c'est le cas avec le peptide agoniste de PAR₁. Pour cela, d'autres chercheurs ont muté PAR₁ afin qu'il soit toujours capable de se lier à la thrombine au niveau de l'exosite I, sans que la thrombine puisse cliver PAR₁ et engendrer une signalisation. PAR₁ muté était ensuite co-exprimé avec PAR₂ dans des cellules endothéliales humaines. **Cette co-expression provoquait une signalisation**, similaire à celle provoquée par l'expression individuelle de PAR₁ et de PAR₂ dans des cellules endothéliales, après stimulation par la thrombine (O'Brien, Prevost et al. 2000). Afin de confirmer l'activation de PAR₂ via PAR₁, un antagoniste de PAR₁ a été utilisé et déjouait à 75% la signalisation induite par PAR₁. La signalisation induite a pu être bloquée en totalité avec l'ajout supplémentaire d'un antagoniste de PAR₂, suggérant cette activation entre récepteurs.

De plus, cette transactivation entraîne une signalisation ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2) et semble d'autant plus présente lors d'événements pathologiques, tels que la septicémie dans les cellules endothéliales, l'inflammation chronique et la carcinogenèse (Shi, Gangadharan et al. 2004, Kaneider, Leger et al. 2007, Lin and Trejo 2013). Enfin **ce mécanisme de transactivation par hétérodimérisation a été confirmé** par technique de FRET et de co-immunoprécipitation (Kaneider, Leger et al. 2007) (Figure 18).

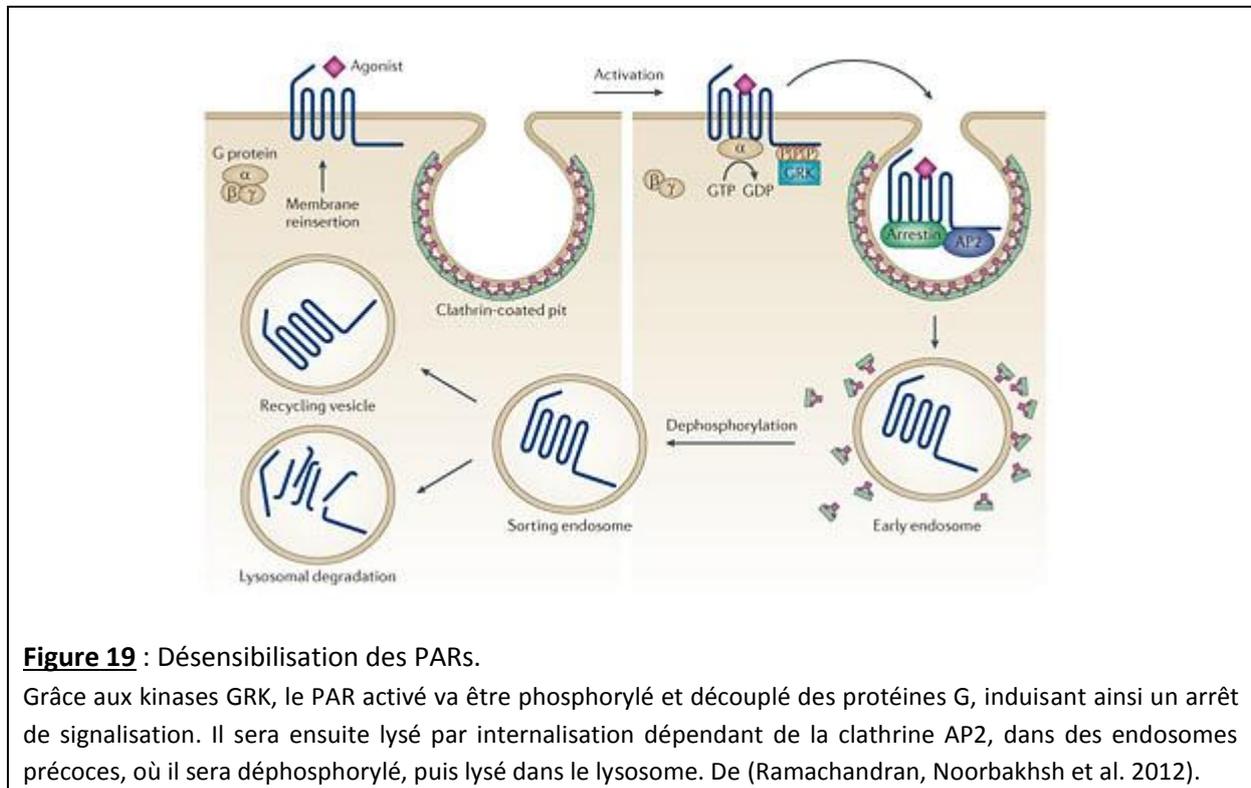


b) Transduction du signal

Comme mentionné précédemment, les **PARs sont des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques constituées de trois unités α , β et γ** . Chacune de ces unités possède plusieurs isoformes. **L'unité α est primordiale** pour le déclenchement de la signalisation. Les quatre isoformes de l'unité $G\alpha$ sont : **$G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12/13}$** . Quand un PAR est activé, il va subir un changement conformationnel, entraînant un couplage aux protéines G. Ainsi, la **Guanosine DiPhosphate (GDP)** associée à l'unité α , **va être échangée par une Guanosine TriPhosphate (GTP)** et ainsi provoquer la **dissociation du dimère $G\beta\gamma$** . Ceci permettra à l'unité α d'interagir avec des effecteurs de voie de signalisation. La **$G\alpha_s$** active l'adénylate cyclase (AdC) et l'accumulation de l'AMPC, **$G\alpha_{i/o}$** inhibe cette adénylate cyclase, **$G\alpha_q$** favorise l'hydrolyse de la phospholipase C (PLC) et **$G\alpha_{12/13}$** active la Rho GTPase (Oldham and Hamm 2008). PAR₁ et PAR₂ agissent majoritairement au travers de **$G\alpha_q$, $G\alpha_i$ et $G\alpha_{12/13}$** , alors que **PAR₄** interagit avec **$G\alpha_{i/o}$ et $G\alpha_q$** (Macfarlane, Seatter et al. 2001). Concernant PAR₃, la signalisation induite est indirecte et est la conséquence de la transactivation de PAR₄. Il semblerait toutefois que PAR₃ puisse induire une signalisation indépendamment de l'activation de PAR₄. En effet, une étude a révélé que PAR₃ pouvait promouvoir une réponse inflammatoire par la production et la sécrétion d'IL8, après stimulation par la thrombine dans des cellules humaines épithéliales de poumons, des cellules humaines embryonnaires de rein (HEK 293 - Human Embryonic Kidney) et des astrocytes cancéreux (Ostrowska and Reiser 2008).

c) *Terminaison du signal*

L'activation des PARs par clivage protéolytique est irréversible puisque le récepteur activé sera ensuite lysé par un mécanisme de désensibilisation. Cette **désensibilisation des PARs**, comme tout RCPG, est généralement induite par **phosphorylation** (Krupnick and Benovic 1998). En effet, la phosphorylation va être réalisée par une kinase 'GRK' (G protein Receptor Kinase) au niveau de la troisième boucle intracellulaire. Cette phosphorylation va alors **recruter la β -arrestine** jusqu'au récepteur, provoquant ainsi le **découplage entre le PAR et les protéines G**. Le récepteur désormais libre, va pouvoir être internalisé, par la voie majeure **d'internalisation dépendante de la clathrine AP2** (Activating Protein 2). Pour cela, l'adaptateur à la clathrine AP2 localisé sur la membrane va pouvoir recruter plusieurs clathrine AP2. Ce processus met en évidence des puits de clathrine. Dès lors que ces puits fusionnent, le récepteur phosphorylé sera endocyté par la **formation d'un endosome dit précoce, où il sera déphosphorylé, pour être dégradé dans le lysosome** (Ramachandran, Noorbakhsh et al. 2012). De plus, si le PAR n'est pas activé, il peut être internalisé de la même manière que pour la dégradation, mais sera recyclé à la membrane (Figure 19).

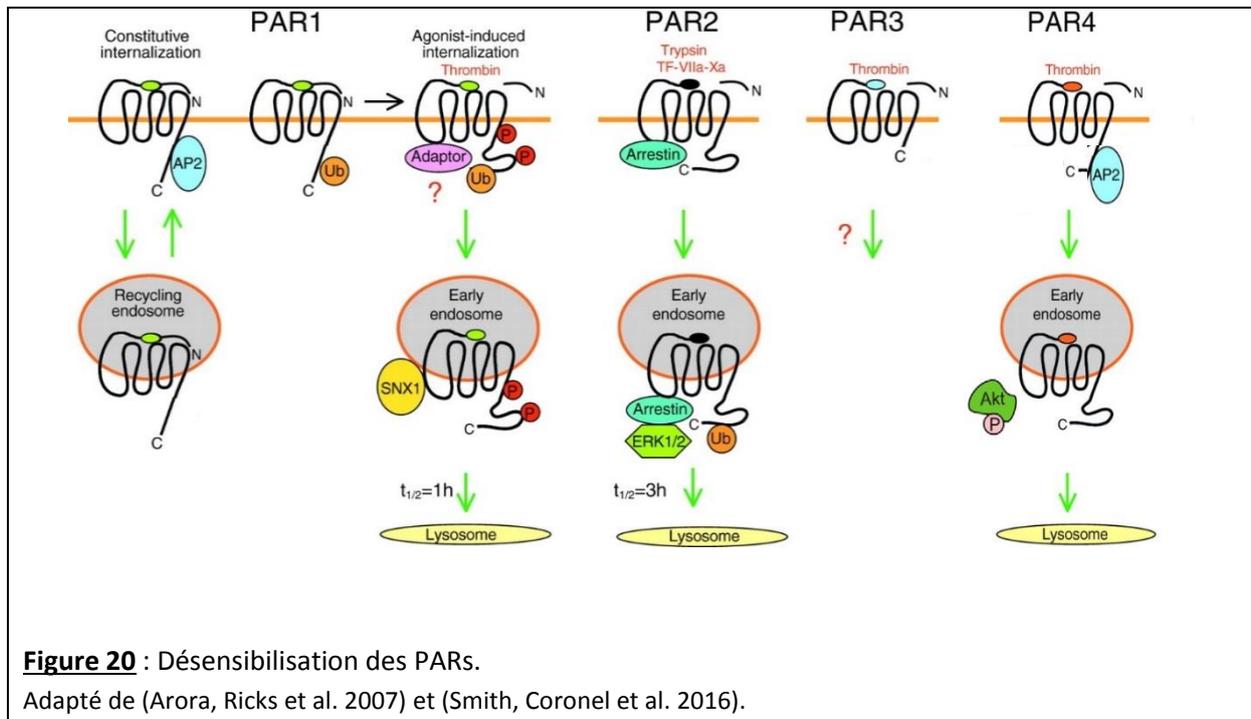


Concernant PAR₁, sa désensibilisation suit le même processus que celui décrit précédemment (Soh, Dores et al. 2010). Cependant, une étude a révélé que **PAR₁ inactivé serait ubiquitinylé** et que cette ubiquitination disparaîtrait une fois le récepteur activé. Ceci dans le but d'empêcher une internalisation constitutive (Wolfe, Marchese et al. 2007). De plus, son internalisation dans les endosomes provenant des puits de clathrine jusqu'aux lysosomes, fait intervenir la **SNX1** (Sorting NeXin 1), **acteur dans la dégradation des récepteurs membranaires**. Sans cette protéine, la dégradation de PAR₁ n'est pas réalisable (Gullapalli, Wolfe et al. 2006).

La dégradation de **PAR₂** se fait également par une primo-phosphorylation du récepteur par des kinases 'GRK', même si ces dernières n'ont pas encore été identifiées (Trejo 2003). La désensibilisation de PAR₂ est étroitement liée à la liaison avec la β -arrestine (Krupnick and Benovic 1998) et l'ubiquitination suivante permet le recrutement de la clathrine et la formation de l'endosome précoce pour la dégradation lysosomale (Hasdemir, Murphy et al. 2009). Il est à noter que la **liaison à la β -arrestine, entraîne la signalisation de la voie MAPK et plus précisément l'activation des ERK1/2**, qui sont retenus dans le cytosol et ne peuvent promouvoir la prolifération (DeFea, Zalevsky et al. 2000).

Concernant **PAR₃**, aucune étude à ce jour n'a mis en évidence sa désensibilisation. Cependant, il est possible d'envisager que PAR₃ serait également désensibilisé, tout comme les autres PARs.

Enfin, la dégradation de **PAR₄** n'était pas encore élucidée jusqu'à l'année dernière. En effet, une équipe a pu mettre en évidence **l'endocytose de ce récepteur dépendante de la clathrine** mais indépendamment de la β -arrestine. De plus, comme observée pour l'internalisation de PAR₂, la dégradation de PAR₄ entraîne une **accumulation cytosolique de ERK1/2** et une augmentation de la signalisation Akt (une sérine/thréonine kinase) (Smith, Coronel et al. 2016) (Figure 20).



3) Rôles physiologiques et pathologiques des PARs dans le côlon a) Implication des PARs dans les processus physiopathologiques

Comme mentionné précédemment, le **côlon est fortement exposé aux protéases**, que ce soit des protéases pancréatiques, bactériennes, issues des cellules résidentes du côlon ou encore des protéases produites et sécrétées par les cellules épithéliales (Bustos, Negri et al. 1998). Ces protéases interviennent dans une **multitude de processus physiologiques et pathologiques**, au travers de

l'activation de leurs récepteurs, les PARs (Bustos, Negri et al. 1998). Les rôles des protéases au niveau de l'épithélium colique ne sont pas entièrement élucidés, mais celui des PARs a largement été étudié au travers de l'utilisation de peptides agonistes, et comme cela l'a été mentionné précédemment, ces peptides ne reflètent pas toujours et de façon précise les fonctions des PARs dans la physiologie et la pathologie.

Dans le côlon, **PAR₁** est exprimé par les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les neurones entériques, les fibroblastes et les cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les lymphocytes et les macrophages. PAR₁ a tout d'abord été identifié dans les cellules épithéliales cancéreuses (Darmoul, Gratio et al. 2003), puis notre équipe a publié son **expression dans l'épithélium colique humain et murin normal** via immunomarquage (Nasri, Bonnet et al. 2016). L'expression de PAR₃ n'est que peu étudiée et n'a pas été démontrée au niveau du côlon. Quant à **PAR₄**, il est également exprimé **dans les cellules épithéliales coliques** (Vergnolle 2005). Au regard de ces résultats démontrant l'expression de PAR₁ et de PAR₄ dans les cellules épithéliales coliques humaines, ce projet de thèse a pour but d'élucider les rôles physiologiques de ces deux récepteurs, via l'activation de la thrombine.

Sécrétions intestinales et PARs

Une étude a démontré que **l'activation de PAR₁** sur des monocouches intactes de cellules épithéliales intestinales (**analyse réalisée en chambre de Ussing**) **entraînait une libération d'ions chlorure**, alors que dans les tissus intacts, l'activation de PAR₁ n'engendrait pas cette libération (Buresi, Schleihau et al. 2001). Cette différence de résultats obtenus sur monocouche cellulaire et sur tissu, soulignerait l'importance de la **localisation du récepteur sur la cellule**. En effet, il semblerait que **l'activation de PAR₁ du côté apical** (vers la lumière intestinale) aurait un **rôle protecteur**, engendrant une libération d'ions chlorure, permettant un transit plus rapide et l'élimination de pathogènes ou au moins de leurs toxines. **L'activation de PAR₂** favorise également **le relargage d'ions chlorure** et est corrélée avec la diarrhée en condition inflammatoire, comme retrouvé dans les tissus de patients atteints de MICI (Lau, Lytle et al. 2011). De plus, d'autres éléments sont sécrétés par l'activation de PAR₂, tels que l'amylase (impliquée dans le processus de digestion), et la mucine (composant majeur de la couche du mucus) (Kawabata, Kuroda et al. 1999).

Motricité intestinale et PARs

Une autre fonction du côlon est de permettre le passage du chyme et fait intervenir une régulation de la **motricité intestinale**. Le rôle des PARs dans la motricité a été démontré par des travaux utilisant des couches musculaires circulaires et longitudinales coliques de rat, pour lesquelles **l'activation de PAR₁ et PAR₂** (par la thrombine ou la trypsine et des peptides agonistes) provoquait une contraction et un relâchement musculaire (Mule, Baffi et al. 2002). Le système nerveux joue également un rôle dans cette régulation de la motricité par la sécrétion **de tachykinines** (Mule, Baffi et al. 2003).

Perméabilité intestinale

L'activation de PAR₁ augmente également la perméabilité intestinale via le processus apoptotique. En effet, sur des modèles murins, l'administration de peptide agoniste de PAR₁ entraîne une apoptose cellulaire par l'activation de la caspase 3 (acteur clé du processus apoptotique),

accompagnée d'une altération de la protéine de jonction ZO1 avec pour conséquence une augmentation de la perméabilité (Chin, Vergnolle et al. 2003). Les protéases du neutrophile, telles que l'élastase et la PR3, sont également impliquées dans la régulation de la perméabilité épithéliale. En effet, il est observé une augmentation de la perméabilité en présence de ces protéases, par l'activation basolatérale de PAR₁ et de PAR₂ des cellules épithéliales, confirmée par l'utilisation de peptides agonistes et d'inhibiteurs de ces protéases (Chin, Lee et al. 2008).

Inflammation intestinale

De plus, les modèles murins d'inflammation induite, ont permis de mettre à jour le rôle de PAR₁ et de PAR₂ dans ce processus. En effet, il a été établi que **l'activation de PAR₁ dans un modèle de colite, maintient cette inflammation** et que l'utilisation d'antagonistes de PAR₁, diminuait la sévérité de la colite, ainsi que la mortalité (Vergnolle 2005). **PAR₂** a, quant à lui, une implication dans le développement de la **colite aiguë**, activé par l'administration de protéases activatrices ou un peptide agoniste chez la souris, générant un recrutement massif de granulocytes et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (CXCL8, IL1 β et TNF α) (Cenac, Coelho et al. 2002). De plus, l'activation de **PAR₂** provoquait également **un recrutement de leucocytes**, permettant une infiltration des cellules immunitaires à travers les vaisseaux sanguins (Hyun, Andrade-Gordon et al. 2008). Toutefois, **PAR₂ semblerait avoir un rôle protecteur contre la colite chronique**, via la CGPR (Calcitonin Gene Related Peptide) (Fiorucci, Mencarelli et al. 2001).

Fonction sensorielle

PAR₁ et PAR₂ ont un rôle dans la nociception. Une étude de distension colrectale a été réalisée, après une administration intracolique de trypsine et de peptide agoniste de **PAR₂** chez le rat et provoquait une **douleur viscérale** (Coelho, Vergnolle et al. 2002). PAR₂ posséderait un **rôle pronociceptif**. Concernant **PAR₁**, il serait **anti-nociceptif**. En effet, une étude a montré que l'injection d'agoniste de PAR₁ dans la patte de souris, n'induit pas de réponse à un stimulus mécanique ou thermique, mais augmente tout de même de le seuil de sensibilité de la perception à la douleur (Asfaha, Brussee et al. 2002). De plus, PAR₁ inhiberait la transmission des signaux nociceptifs (Fang, Kovacs et al. 2003). L'administration intracolique de peptide agoniste de **PAR₄** diminue la motricité viscérale, après distension colrectale et **diminue la douleur induite par l'activation de PAR₂** (Auge, Balz-Hara et al. 2009).

Survie et prolifération

Dans un contexte pathologique et plus précisément au sein d'un cancer colrectal, il a été observé une prolifération importante de cellules cancéreuses de côlon, stimulées par l'ajout de trypsine et de peptide agoniste de PAR₂ (Darmoul, Marie et al. 2001). **PAR₁ était aussi associé à la prolifération des cellules cancéreuses de côlon** (Darmoul, Gratio et al. 2003). De plus, l'activation de **PAR₂** entraîne une réduction de l'apoptose des cellules épithéliales coliques, en activant MEK1/2 et PI3K (Iablokov, Hirota et al. 2014). Ce rôle pro-survie de PAR₂ a également été confirmé par notre équipe, qui démontre que son activation régule la survie des cellules souches coliques dans le modèle organoïde, via la voie GSK3 β (Nasri, Bonnet et al. 2016).

b) Fonctions physiopathologiques de la thrombine au travers de l'activation des PARs

Comme mentionné précédemment, un domaine 'hirudin-like' est présent sur PAR₁ (et PAR₃), en aval de la séquence du domaine activateur de ces récepteurs, et est responsable de la capacité de ces récepteurs à s'ancrer dans l'exosite I de la thrombine, en supplément de la liaison au site actif (Vu, Hung et al. 1991, Ishihara, Connolly et al. 1997). PAR₄ ne possède pas ce domaine 'hirudin-like' et ne peut donc s'ancrer à l'exosite I, c'est pourquoi son affinité envers la thrombine est moins importante que celle de PAR₁. Il faut donc une plus forte concentration de thrombine (40x) pour activer PAR₄, que pour activer PAR₁ (Ayala, Cantwell et al. 2001). Cette présence ou absence de domaine 'hirudin-like' permet ainsi d'expliquer les rôles prépondérants de PAR₁, via la thrombine.

L'agrégation plaquettaire

Dans un contexte de coagulation, PAR₁ activé par la thrombine **promeut l'agrégation plaquettaire**, en initiant le **changement morphologique, la motilité et la signalisation p38/MAPK** des cellules plaquettaires, afin de résorber la plaie (Blackburn and Brinckerhoff 2008). PAR₁ peut également être activé par la protéine C active. En effet, Riewald et ses collaborateurs, mettaient en évidence le **rôle cytoprotecteur de PAR₁ activé par la protéine C activée**, sur des cellules endothéliales et dans un contexte de septicémie (Riewald, Petrovan et al. 2002). Cependant, le fait que ce soit la protéine C activée qui clive et active indirectement PAR₁ est surprenant, puisque cette activation est 10 000 fois moins efficace qu'une activation directe par la thrombine (Ludeman, Kataoka et al. 2005). Ceci suggère donc que la thrombine intervient dans des effets opposés, mais par différents effecteurs.

L'inflammation

La thrombine est également impliquée dans le **processus inflammatoire** et notamment dans le développement de MICI. En effet, une **augmentation de l'incidence de thrombose** a été observée pour les **patients atteints de MICI** (Thompson, Wakefield et al. 1995). De plus, dans les MICI, il est observé une **augmentation de la perméabilité intestinale et une apoptose cellulaire** (Hollander, Vadheim et al. 1986, Sun, Wang et al. 1998). Une étude a été menée afin de savoir si PAR₁ pouvait être responsable de cette inflammation, en augmentant la perméabilité épithéliale par le processus d'apoptose (Chin, Vergnolle et al. 2003). Pour cela, les auteurs ont incubé des cellules épithéliales intestinales avec des peptides agonistes de PAR₁ et ont observé **l'induction d'apoptose et une fonction de barrière diminuée**. Ces résultats ont ensuite été confirmés par des travaux *in vivo*, avec une administration intracolique de peptides agonistes de PAR₁.

La carcinogénèse

De façon intéressante, il a été mis en évidence que PAR₁ pouvait avoir des **effets pro- et anti-apoptotiques**, selon la dose utilisée de thrombine ou de peptides agonistes (Flynn and Buret 2004). En effet, la thrombine possède un fort potentiel mitogène dans un contexte de carcinogénèse. La preuve que la **thrombine potentialisait la croissance tumorale et le processus métastatique *in vivo*** a été obtenue en 1991. Nierodzik et ses collaborateurs ont traité des lignées cellulaires cancéreuses, dont la lignée CT26 (cellules murines de carcinome) avec de la thrombine (0,5-1U/mL). Ils ont ensuite injecté

ces cellules par voie intraveineuse chez la souris et ont observé une augmentation (413x) du pouvoir métastatique de ces cellules (Nierodzik, Kajumo et al. 1992). Néanmoins, une étude a démontré que la concentration de la thrombine pouvait avoir des effets opposés sur les cellules tumorales (Zain, Huang et al. 2000). Effectivement, **à faible dose de thrombine, 0,1 à 0,5U/mL, PAR₁ activé entraînait la croissance des cellules tumorales** (dont la lignée humaine de carcinome colique, HCT8). Alors qu'à **plus forte dose de thrombine, 0,5 à 1U/mL, la croissance était diminuée au profit de l'apoptose cellulaire**. Il est donc intéressant de connaître le rôle physiologique de la thrombine à faible et forte dose, et ainsi expliquer les effets opposés de la thrombine observés sur la croissance tumorale.

D'autre part, les **patients atteints de MICI ont 10 à 20 fois plus de risque de développer un CCR** (Dyson and Rutter 2012). Une étude a révélé **le rôle de la thrombine dans le développement de cancer du côlon à partir d'un contexte inflammatoire**. A partir de modèle de colite (chimio-induite via le DSS) et de cancer associé à la colite (via l'AOM) chez la souris (C57BL/6 consanguine), les auteurs ont observé la formation d'adénomes. Le résultat obtenu était un développement uniforme d'adénomes à partir de cryptes aberrantes chez les souris contrôles (FII^{+/+}) et une diminution de ces lésions précancéreuses, ainsi que du nombre d'adénomes chez les souris FII^{+/-} (Turpin, Miller et al. 2014). Le fait que la thrombine induise la carcinogenèse à partir d'un état inflammatoire a été validé par l'utilisation d'un inhibiteur de la thrombine, l'hirudine (développement ralenti d'adénomes).

Au vu de ces quelques données concernant le rôle de la thrombine sur l'inflammation et la carcinogenèse dans le côlon, la thrombine semble être un acteur évident dont les effets physiologiques doivent être élucidés. Au travers de l'activation de PAR₁, notamment, la thrombine semble intervenir dans une multitude de processus cellulaires qui varient selon le contexte pathophysiologique. Afin de connaître les mécanismes impliqués, des antagonistes de PAR₁ et PAR₄ ont été développés, dans le but de cibler ces effecteurs en thérapie.

4) Modulation de l'activation de PAR₁ et de PAR₄

a) Modulation de l'activation de PAR₁

Le fait de moduler les effets de la thrombine au travers de l'activation des PARs est une stratégie de choix pour l'industrie pharmaceutique. Ainsi plusieurs **antagonistes de PAR₁** ont été développés et un seul a déjà fait l'objet d'essais cliniques et est **maintenant indiqué dans la prise en charge des infarctus du myocarde et des maladies artérielles**. Il s'agit du **Voparax**, ou SCH530348, développé par Schering-Plough et Merck et commercialisé depuis 2014. Un autre antagoniste de PAR₁, le **F16357** ou 3-(2-chlorophényl)-1-[4-(4-fluorobenzyl)-pipérazinyl]-propénone est un **antagoniste sélectif de PAR₁** (Figure 21). Sa puissance (pK_b=5,6) et sa sélectivité (pK_b=4,4), lui confèrent une **spécificité** marquée pour ce récepteur (Perez, Lamothe et al. 2009). Cet antagoniste a été développé par les laboratoires Pierre Fabre pour des traiter les troubles vasculaires, mais a également été testé et validé pour la cystite interstitielle dans un modèle de rat (Monjotin, Gillespie et al. 2016). Son action résulte dans le **blocage du changement conformationnel du récepteur** et de son couplage aux protéines G, inhibant la transduction du signal. Enfin, cet antagoniste est facile à synthétiser et semble limiter les effets indésirables.

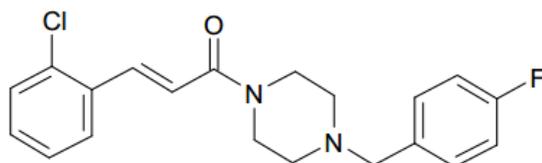


Figure 21 : Structure chimique du F16357

b) Modulation de l'activation de PAR₄

Concernant **PAR₄**, le développement d'antagonistes pour ce récepteur a été plus tardif et les **antagonistes produits ne sont, souvent, pas spécifiques à PAR₄**. Le **ML354** ou (1-méthyl-5-nitro-3-phényl-1H-indol-2-yl)-méthanol est issu de la recherche Vanderbilt (Young, Duvernay et al. 2010, Wen, Young et al. 2014) (Figure 22). Comparé aux autres antagonistes de PAR₄ qui se lient à la 2nde boucle extracellulaire du récepteur, celui-ci **lie la séquence du ligand activateur**.

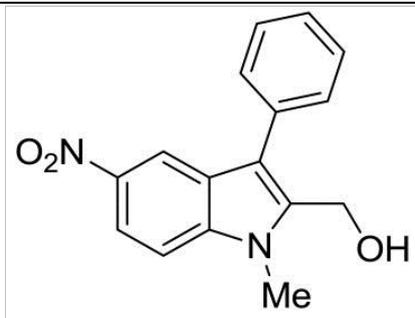


Figure 22 : Structure chimique du ML354.

Les protéases sont impliquées dans de **nombreux processus cellulaires** au travers de l'activation des PARs, et c'est notamment le cas de la **thrombine**. Au-delà de ses fonctions coagulantes, elle semble jouer un rôle dans le côlon au travers de **PAR₁ et PAR₄**. Pour élucider leurs rôles au sein de l'épithélium colique, plus particulièrement, il est aujourd'hui possible d'utiliser un nouveau modèle cellulaire d'étude qui représente plus finement la complexité physiologique de cet épithélium. C'est le modèle que nous avons utilisé dans nos approches expérimentales et qui est décrit ci-après : **le modèle de culture d'organoïdes intestinaux**.

Chapitre IV / Le modèle d'étude *ex vivo* – les organoïdes de côlon humain

Pendant longtemps, les études de l'épithélium intestinal ou colique ont été réalisées sur des lignées cancéreuses ou des modèles animaux. Or, même si ces études ont fait avancer notre connaissance de la biologie normale ou pathologique de cet épithélium, elles ne reflètent pas exactement les pathologies humaines. En particulier, les études fonctionnelles des cellules souches épithéliales peuvent nécessiter une approche *ex vivo*. Ainsi, reconstituer à partir de cellules primaires de la crypte intestinale ou colique un mini-intestin ('mini-gut') *in vitro*, grâce aux propriétés de ces cellules souches, représenta au début du XXI siècle un formidable challenge.

I/ Généralités

Un **organoïde** se définit comme étant une structure cellulaire reconstituant le **tissu** dont il est issu, cultivé en **trois dimensions (3D)** dans une matrice. L'organoïde s'établit à partir d'une ou plusieurs **cellule(s) souche(s)** isolée(s), qui grâce à leurs capacités d'auto-renouvellement et de différenciation reproduisent une architecture complexe, proche de celle du tissu d'origine. Les **caractéristiques** physiques, cellulaires, moléculaires et génétiques de ce modèle *ex vivo* sont **similaires** voire identiques **à celles du tissu** (Sato, Vries et al. 2009, Hynds and Giangreco 2013, Lancaster and Knoblich 2014, Date and Sato 2015). Le modèle organoïde est à distinguer du modèle sphéroïde, qui est un amas cellulaire ne représentant pas une architecture tissulaire.

1) Evolution du modèle organoïde

Le modèle organoïde est apparu en se basant sur une **expérience de dissociation et de réagrégation cellulaire**, à partir d'une espèce d'éponge, *Stylocella* (Wilson 1907). Cette éponge était placée dans un tube vide recouvert de verre et chaque jour ce tube était rempli d'eau durant quelques minutes seulement. Après deux jours, l'**osculum** de l'éponge (c'est-à-dire l'ouverture permettant le passage de l'eau) devenait de plus en plus lisse, **disparaissait** petit à petit et la morphologie de l'exosquelette se simplifiait. A l'inverse, quand ces **éponges 'altérées'** étaient placées **dans des conditions propices** à leur développement, les cellules de l'animal se **réorganisaient** afin de générer un organisme entier. A la suite de cette observation, plusieurs expériences de dissociation et de réagrégation cellulaire ont été réalisées, sur des pronephros d'amphibiens (Holtfreter 1944), des cellules de peau embryonnaire de poulet (Moscona and Moscona 1952), des cellules de rein, de foie et de peau d'embryons de poulet de 8 à 14 jours (Weiss and Taylor 1960) et ont abouti à la même observation de réorganisation. Ce phénomène de dissociation et de réagrégation cellulaire était supporté par l'**hypothèse d'adhésion différentielle** proposée en 1964 par Steinberg (Steinberg 1964). Cette adhésion s'appuie sur des principes **thermodynamiques et morphogénétiques** (Steinberg 1970). Les contraintes spatiales et l'orientation de la division cellulaire placent les progéniteurs dans une position **favorable à leur différenciation** (Lancaster and Knoblich 2014).

La recherche s'est poursuivie afin de mieux comprendre cette organisation tissulaire. Les études se sont alors focalisées sur le **développement des tératomes**. Stevens et ses collaborateurs ont démontré que l'origine de tératocarcinome des souris provenait des cellules germinales durant le

développement embryonnaire. Ils ont transplanté des crêtes germinales d'embryons de 11 à 12 jours dans des testicules de souris adultes et ont observé une croissance rapide de tératocarcinome. Pour Stevens, les **cellules souches** étaient donc à **l'origine de la formation du tératome** (Stevens 1967). Une autre étude a été réalisée sur des blastocystes de 3 jours et demi où la couche cellulaire supérieure étaitensemencée sur une couche de fibroblastes. Après 2 jours de culture, cette couche cellulaire était détachée, désagrégée et les cellules isolées résultantes étaient alorsensemencées de nouveau. Des **clones se sont alors mis à croître et sept morphologies différentes** ont été observées. C'est ainsi qu'ont été obtenues des cellules embryonnaires pluripotentes en culture à partir d'un embryon de souris (Evans 1981). D'autres travaux ont confirmé ce résultat et Martin proposa alors le terme de '**cellules souches embryonnaires**' en 1981 (Martin 1981).

En parallèle des expériences de dissociation et de réagrégation, des travaux ont été menés sur les conditions de culture. En effet, la **composition matricielle** du milieu de culture en 3D va jouer un rôle clé dans la **spécification des interactions adhésives**. Le **collagène** étant un composant majeur des tissus conjonctifs, Ehrmann et Gey ont établi une méthode afin de reconstituer du collagène extrait à partir de tendons de la queue de rat dans le but de l'utiliser pour la culture cellulaire (Ehrmann and Gey 1956). Dans cette étude, 29 lignées cellulaires ont été cultivées sur un support en verre ou sur une couche de collagène séchée. **Ces cellules avaient une meilleure croissance sur le collagène** que sur le support en verre. Une autre étude a également mis en évidence le rôle nourricier du collagène dans la génération de sphéroïdes mammaires à partir de glandes mammaires adultes de souris, en l'absence de fibroblastes et d'adipocytes (Lasfargues 1957). De plus, les hépatocytes embryonnaires et adultes présentaient une meilleure croissance cultivés sur du collagène, mais **perdaient souvent la capacité de se différencier** après plusieurs jours de culture (Bissell and Tilles 1971). Il était alors possible de déclencher le processus de différenciation des cellules épithéliales en exerçant une pression sur la couche de collagène. Cette pression avait pour effet de détacher le collagène du support et **d'influencer la différenciation cellulaire en suspension**. Les auteurs de cette étude ont confirmé cette différenciation en analysant les marqueurs spécifiques de différenciation sur des hépatocytes embryonnaires (Michalopoulos and Pitot 1975). Ceci a également été confirmé sur un autre type cellulaire, les cellules épithéliales mammaires isolées de souris gestantes. Ces **cellules cultivées dans du collagène en suspension exprimaient plusieurs protéines de lait** pendant un mois, comparé à la culture sur un support plastique, verre ou de collagène fixé (Emerman and Pitelka 1977). Ces études confirment alors que **l'organisation du réseau matriciel** de culture 3D est **cruciale**.

Pour refléter la composition complexe de la matrice extracellulaire *in vivo*, un gel extrait du sarcome murin **EHS** (Engelbreth-Holm et Swarm), ayant les caractéristiques de la membrane basale, est souvent utilisé (Swarm 1963, Orkin, Gehron et al. 1977). Ce gel est aujourd'hui connu sous le nom de **Matrigel** (Kleinman and Martin 2005). Il est principalement composé de **collagène de type IV**, de **laminine** et de **fibronectine** (Gahmberg and Hakomori 1973, Stenman and Vaheri 1978, Timpl, Rohde et al. 1979). L'utilisation du matrigel est commune pour l'étude de divers processus, tels que la **croissance, la différenciation, l'interaction entre la membrane basale et les cellules souches ou les cellules tumorales et l'angiogenèse** (Kleinman and Martin 2005). Ainsi, le matrigel est essentiel pour la génération d'organoïdes de côlon humain, à partir de cellules souches présentes dans les cryptes coliques, et ce sans apport de cellules mésenchymateuses. Le matrigel est alors utilisé pour mimer le microenvironnement physiologique (Sato, Vries et al. 2009).

2) Première exploitation du modèle pour comprendre les mécanismes de morphogénèse

Etant donné que les chercheurs possédaient maintenant le modèle et le concept, il était alors possible de s'intéresser aux **mécanismes morphologiques et aux fonctions tissulaires**. En 1982, Bissell et ses collaborateurs se focalisaient sur les rôles de la MEC (Matrice ExtraCellulaire) dans la régulation génique (Bissell, Hall et al. 1982). Dans cette étude, les cellules de tubules distaux de rein ou les cellules de glandes mammaires murines cultivées sur du collagène de type I et recouvertes d'une autre couche de collagène, possédaient la capacité de **se réorganiser et de former une structure similaire au tissu d'origine**. Cette observation a ensuite été confirmée avec la formation de follicules à partir de cellules isolées de thyroïde de souris (Chambard, Gabrion et al. 1981). Afin de confirmer le rôle de la MEC sur l'expression génique, Li et ses collègues ont cultivé des cellules épithéliales mammaires de souris sur un support en plastique, sur des gels de collagène et dans du matrigel (Li, Aggeler et al. 1987). Ces cellules ne possédaient pas la même capacité de sécrétion de protéines de lait, en fonction du support de culture sur lesquelles elles étaient cultivées. En effet, seules 2 à 6% d'entre elles possédaient une capacité de sécrétion sur du plastique, contre 30 à 40% sur des gels de collagène de type I et **90% sur du matrigel**. Plus précisément, **la laminine et les héparan sulfates** contenus dans ce matrigel, favorisaient l'expression d'ARNm de la β caséine. De plus, les cellules se réorganisaient pour former des canaux mammaires, ainsi que des alvéoles sécrétrices. D'autres types cellulaires tels que les cellules de Sertoli de rat (Hadley, Byers et al. 1985), les hépatocytes de rat (Bissell, Arenson et al. 1987), les cellules pulmonaires murines (Shannon, Mason et al. 1987), les cellules de crêtes neurales de poulet (Maxwell and Forbes 1987), les cellules épithéliales exocrines d'acini (Oliver, Waters et al. 1987), ou bien les cellules prostatiques humaines (Fong, Sherwood et al. 1991), cultivées sur ou dans du matrigel, formaient des structures tissulaires fonctionnelles. Ceci souligne donc **l'importance de la MEC dans la différenciation tissulaire**, mais également le début d'une recherche basée sur un modèle cellulaire tridimensionnel. Après cela, des études utilisant des cellules pluripotentes humaines ont été réalisées, la première étant sur des blastocystes (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998). Les auteurs ont maintenu des **cellules isolées** à partir de blastocystes humains pendant plus de 5 mois dans un état indifférencié. Ensuite, ces cellules étaient **capables de reprendre le processus de développement** en générant des tératomes, une fois qu'elles étaient implantées chez la souris.

Depuis, la recherche utilisant des organoïdes s'est intensifiée de façon exponentielle. **Les milieux de culture ont été adaptés et optimisés** pour permettre le développement des structures en 3D. Ainsi, un **milieu pauvre en sérum, nommé 'SFEB'** pour *Serum-Free, floating culture of embryoid body-like aggregates* a été utilisé pour générer une différenciation neuronale à partir de cellules souches embryonnaires de souris (Watanabe, Kamiya et al. 2005). Ceci a ensuite été confirmé, avec l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines qui reformaient un épithélium neuronal cortical entier (Eiraku, Watanabe et al. 2008).

3) Les organoïdes intestinaux et coliques

En **2009**, les équipes de Hans Clevers et de Toshiro Sato, démontraient que **les cellules souches intestinales murines LGR5⁺** isolées et cultivées en 3D avaient la **capacité de reconstituer ex vivo la crypte intestinale normale** avec toutes les caractéristiques architecturales et fonctionnelles. De plus,

la culture de ces structures pouvait être maintenue plus d'un an, après passage toutes les semaines (Sato, Vries et al. 2009).

Cette étude était alors la première démonstration de la génération d'organoïdes intestinaux à partir de cellules souches isolées dans du matrigel. De plus, **les protocoles d'isolement de cryptes coliques humaines** à partir de résections ou de biopsies de patients, **ont été optimisés** au fil du temps et ont permis à la communauté scientifique d'établir de meilleures conditions de culture. Ainsi, en 2015, un nouveau protocole de mise en culture de cryptes coliques humaines et de maintien de culture d'organoïdes a ainsi été publié (Mahe, Sundaram et al. 2015). En effet, l'extraction des cryptes épithéliales est possible grâce à l'utilisation d'agent réducteur des ponts disulfures et d'un chélateur, ainsi qu'une séparation mécanique des cryptes de la sous-muqueuse.

II/ Culture *ex vivo* d'organoïdes coliques

1) *Reconstitution du microenvironnement des cellules souches*

Le 1^{er} modèle de culture 3D d'organoïdes intestinaux maintenu sur le long terme, par l'équipe de Clevers, a été établi à partir de milieu de culture adapté. En effet, la **compréhension progressive du rôle de la MEC** sur le devenir des cellules souches a permis **d'optimiser le modèle** en influençant les voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal (Sato, Vries et al. 2009). Cette culture 3D d'organoïdes intestinaux, ou 'mini-gut', était établie à partir d'un milieu dépourvu de sérum et sans cellules mésenchymateuses, mais en présence de facteurs issus du microenvironnement (EGF, Noggin et R-spondin). Ces facteurs étaient alors sélectionnés par rapport à leur importance dans la régulation de l'homéostasie épithéliale (mentionné dans le chapitre I, partie III, 2), page 22). De plus, le matrigel est crucial pour assurer l'organisation tissulaire par le maintien des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules souches. Cependant, il n'est pas suffisant pour fournir tous les facteurs et ligands impliqués dans la régulation des voies de signalisation contrôlant l'homéostasie des cellules souches. C'est pourquoi, il est **nécessaire d'ajouter au milieu de culture ces différents éléments**.

a) Régulation de la survie des cellules souches

La voie **BMP/TGF β** est responsable de la différenciation cellulaire en inhibant l'auto-renouvellement induite par la voie Wnt. Il est donc nécessaire d'ajouter **son antagoniste** naturel, la **Noggin**, afin de **promouvoir la survie et l'auto-renouvellement des cellules souches** les premiers jours de culture (Kosinski, Li et al. 2007). Sans cet antagoniste, les organoïdes intestinaux cessent de proliférer après 1 à 2 semaines (Sato, Vries et al. 2009). De plus, lors des premiers jours de culture, un antagoniste du récepteur de TGF β , **LY2157299**, **prévient** la phosphorylation de Smad2/3 et **l'inhibition de la prolifération des cellules souches** (Matano, Date et al. 2015). Afin de faire face au stress de l'isolation et de la mise en culture, **l'Y27632** est utilisé dans le but **d'inhiber la rho-kinase qui induit l'apoptose**. Le **SB202190** est quant à lui, efficace pour **inhiber** la MAPK/p38 responsable de **l'apoptose** (Sato, Stange et al. 2011).

b) Régulation de la prolifération des cellules souches

Une voie de signalisation élémentaire pour la génération d'organoïdes coliques est **la voie Wnt**. Cette dernière régule la **prolifération des cellules souches coliques** (Gregorieff, Pinto et al. 2005, van Es, Sato et al. 2012). Dans ce modèle 3D, il est nécessaire d'ajouter un **apport en Wnt3a et de R-spondin**, ligands qui sont initialement sécrétés par les cellules stromales (notamment les fibroblastes) (Farin, Van Es et al. 2012). De plus, afin d'augmenter l'efficacité de l'initiation de la culture d'organoïdes et de son amplification, plusieurs facteurs sont utilisés.

- Le **supplément B27**, augmente l'efficacité de la formation des sphères, puisqu'il s'agit d'un cocktail de facteurs comprenant antioxydants, insuline, biotine, progestérone, transferrine, galactose, glutathion,... (Chen 2011).
- **La nicotinamide** est également ajoutée. Il s'agit d'un amide d'acide nicotinique (vitamine B3) qui est requis dans la synthèse des co-enzymes NAD⁺ et NADP⁺, sources d'énergie des processus métaboliques (Jung, Sato et al. 2011).
- Contrairement au B27, qui est requis pour une culture sur le long-terme, le **N2** est requis en début de culture, dans un milieu pauvre en sérum pour la survie cellulaire. En effet, le N2 est un cocktail de facteurs, comprenant BSA (Bovin Serum Albumin), insuline, transferrine, progestérone, putrescine, et sélénite de sodium (Wachs, Couillard-Despres et al. 2003).
- La **PGE2** (prostaglandine 2) est également requise dans l'activation de la voie Wnt et maintient la viabilité et la prolifération de la culture d'organoïdes (Goessling, North et al. 2009, Fan, Davidson et al. 2014).
- Enfin, la **gastrine** permet le renouvellement épithélial (Jain and Samuelson 2006).
- Un autre facteur est également **responsable de la croissance et de la prolifération** cellulaire au sein de l'épithélium colique, il s'agit de **l'EGF**. Ce facteur est requis pour le maintien de la culture d'organoïdes sur le long terme (Sato, Vries et al. 2009). L'inhibition des récepteurs à l'EGF exprimés par les cellules épithéliales intestinales humaines provoque une prolifération plus lente après une semaine de culture (Matano, Date et al. 2015).

c) Régulation de la différenciation des cellules souches

La voie Notch joue un rôle crucial dans le **maintien des cellules souches** et leur différenciation (Barker 2014). Les cellules épithéliales expriment des récepteurs Notch permettant le contact avec les cellules adjacentes, via leurs ligands Dll et ainsi influence le type de différenciation entérocytaire (van Es and Clevers 2005).

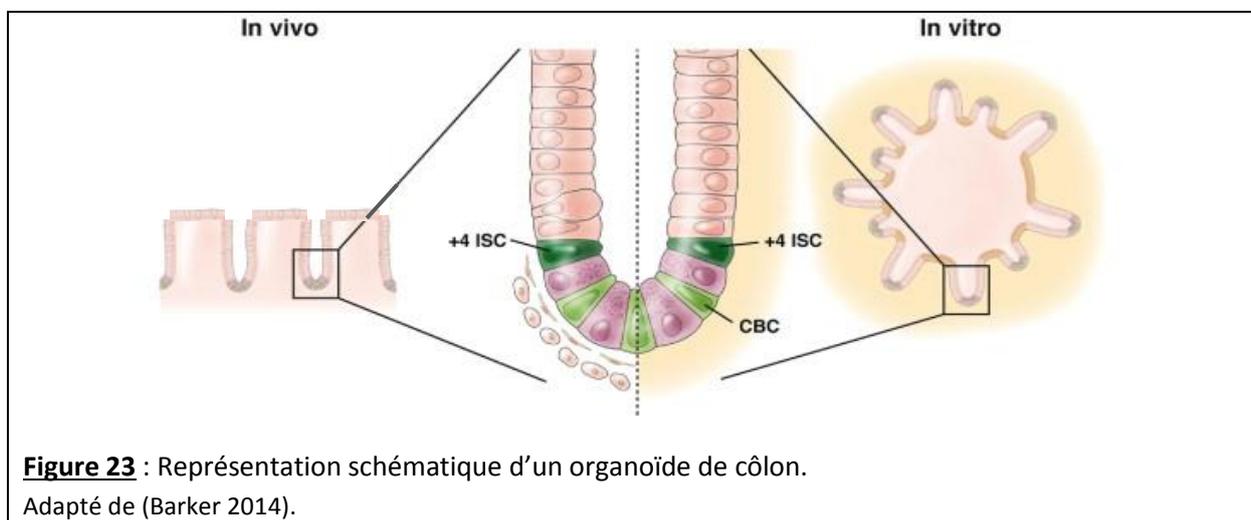
De plus, l'inhibition de MAPK/p38 par le **SB202190** **promeut la différenciation**, en inhibant l'apoptose (Sato, Stange et al. 2011).

La **N-acétylcystéine** est également ajoutée au milieu, puisqu'il s'agit d'un antioxydant qui capture les ROS et génère des antioxydants glutathions. De plus, elle possède des **propriétés mucolytiques** (Zhang, Lau et al. 2011).

Cette complexité de milieu de culture confirme que les cellules épithéliales et les cellules du microenvironnement de la crypte coopèrent et régulent l'homéostasie épithéliale.

2) Génération d'un épithélium colique humain

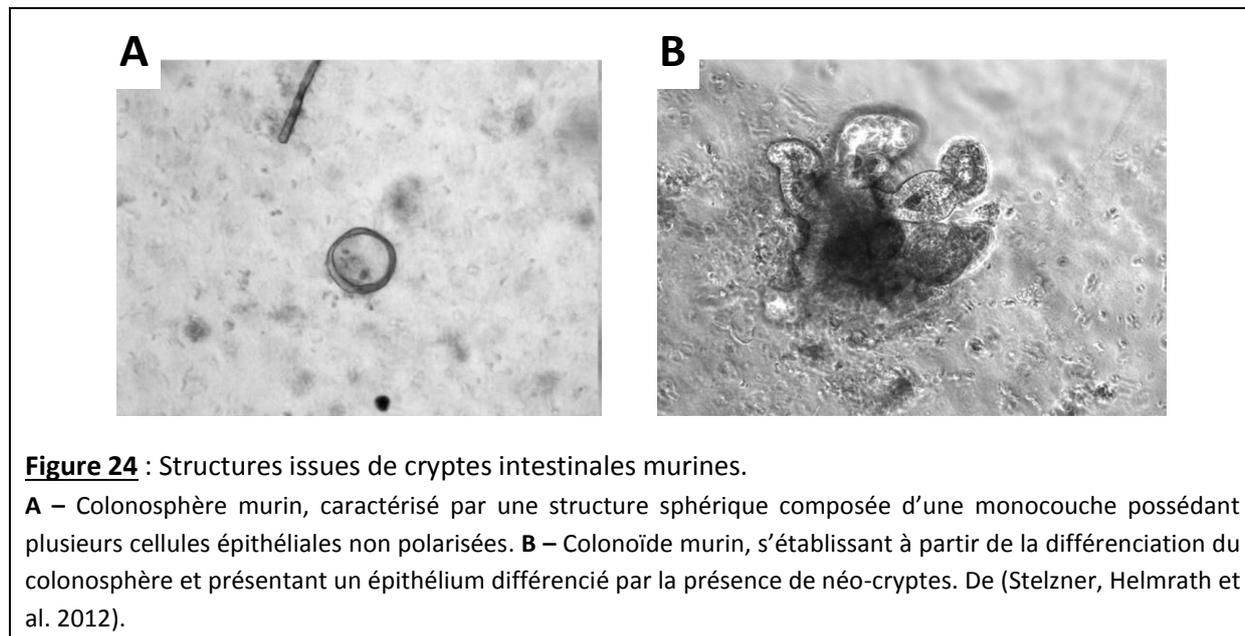
Les **cellules souches** initient le modèle organoïde grâce à leurs **capacités d'auto-renouvellement et de multipotence** qui permettent d'établir les lignages cellulaires propres à l'épithélium colique (Barker 2014) (Figure 23). La première étape de formation des organoïdes est la production de structures à monocouche épithéliale, fine et non polarisée, avec une lumière centrale. Ces structures sont formées après fermeture des cryptes isolées ou après prolifération des cellules souches isolées individuellement. Au fur et à mesure de la mise en place de la **différenciation**, cet épithélium se polarise et des cellules apoptotiques apparaissent dans la lumière centrale. La polarité des cellules est alors identique à celles du côlon, avec un **pôle apical** au niveau de la lumière centrale et un **pôle basal** vers l'extérieur de l'organoïde. De plus, des **néo-cryptes**, formés à partir d'une prolifération des cellules souches dans un axe différent de celui de la monocouche cellulaire, vont apparaître après plusieurs jours de culture. Les organoïdes coliques représentent alors les différents types cellulaires et les fonctions de l'épithélium d'origine (Middendorp et al. 2014).



Une **nomenclature** a été proposée par un consortium d'étude des cellules souches intestinales 'NIH Intestinal Stem Cell Consortium' en 2012 (Stelzner, Helmrath et al. 2012). Concernant le côlon, trois structures sont décrites. Les colonosphères, les colonoïdes et les organoïdes coliques (Figure 24). Les **colonosphères** se caractérisent par une structure sphérique composée d'une monocouche possédant plusieurs cellules épithéliales non polarisées. Ces structures apparaissent entre 3 et 24 heures de culture. Les **colonoïdes** sont le résultat de l'évolution des colonosphères qui suivent le processus de différenciation et présentent des néo-cryptes, avec une monocouche cellulaire polarisée. Enfin, **les organoïdes coliques** se caractérisent par des structures multicellulaires composées d'amas de cellules épithéliales et de cellules du microenvironnement.

Cette nomenclature n'est pas encore connue et assimilée par tous les laboratoires, utilisant le modèle organoïde. Pour essayer de résoudre ce problème, Bissell et Clevers ont discuté de cette **nomenclature lors d'une conférence intitulée 'Organoids'**, organisée par l'Organisation Européenne de Biologie Moléculaire en **octobre 2016**. L'objectif était de redéfinir cette nomenclature de façon claire, mais également de redéfinir les conditions de culture et les différents types de structures

générés et maintenus sur le long terme. Etant donné que ce modèle d'étude est en plein essor, il sera donc nécessaire de communiquer plus largement et régulièrement sur sa définition.



3) Intérêts et limites du modèle *ex vivo* 'organoïde'

a) Avantages et limites des lignées cellulaires tumorales

Il existe actuellement environ 1000 lignées cellulaires tumorales humaines utilisées en cancérologie et en pharmacologie. Ces **lignées cellulaires**, cultivées en **2D**, sont **faciles d'utilisation et peu coûteuses** et ont abouti à de grandes découvertes dans la compréhension de la carcinogenèse et dans le développement de thérapies. Par exemple, les lignées cellulaires ont contribué au développement clinique d'un inhibiteur de l'EGFR, le géfitinib, utilisé dans le traitement des cancers du poumon (Lynch, Bell et al. 2004), ou bien les inhibiteurs de BRAF dans les mélanomes (Chapman, Hauschild et al. 2011). En dépit de leur utilité, les lignées cellulaires sont souvent critiquées pour leurs défauts. En effet, elles **ne représentent pas l'architecture tissulaire et/ou tumorale** présente dans l'organisme, ni **l'hétérogénéité tissulaire, et ne possèdent pas les interactions cellules-cellules et cellules-stroma** (excepté si elles sont co-cultivées avec des cellules mésenchymateuses).

b) Avantages et limites des PDX (Patient-Derived Xenografts)

Les modèles PDX (Patient-Derived Xenograft) sont générés, comme précédemment décrits, par une implantation sous-cutanée de sections tumorales issues de patients, chez des souris immuno-déficientes, ou bien sont implantés directement dans l'organe d'origine (orthotopique). Les PDX présentent les **mêmes caractéristiques que la tumeur originelle** (histologie, altérations génétiques et expression différentielle génique) (Bertotti, Migliardi et al. 2011). Ces modèles récapitulent assez bien les **réponses cliniques aux thérapies de ce qui est observé dans la tumeur du patient**, de laquelle ils dérivent (détaillée dans le chapitre II, partie II). Ils sont alors utilisés pour déterminer les stratégies thérapeutiques à envisager pour chaque patient (Hidalgo, Bruckheimer et al. 2011). Tout comme les

lignées cellulaires, ces modèles PDX ont des limites d’utilisation. **L’absence d’un système immunitaire** dû à l’utilisation de souris immuno-déficientes et **l’utilisation de souris** pour implanter des tumeurs humaines limitent la compréhension des mécanismes moléculaires de la carcinogenèse. De plus, **le taux de prise de greffe dépend** du type de tumeur et de la souche de souris utilisée, allant de 10% à 90%, suggérant des mécanismes encore inconnus responsables de cette prise de greffe. L’implantation de tumeurs **sélectionne également les clones cellulaires** les plus résistants, ayant un sous-type moléculaire particulier, qui n’est alors pas représentatif de l’hétérogénéité de la tumeur, mais qui peut toutefois être utile dans le ciblage d’un type cellulaire en particulier (Eirew, Steif et al. 2015). Ce modèle prend **beaucoup de temps à mettre en place et est coûteux**, il n’est donc pas utilisé pour un screening thérapeutique, mais commence à être utilisé en vue d’une thérapie personnalisée.

c) Avantages et limites du modèle organoïde

Etant donné que les lignées cellulaires ne permettent pas de former un tissu et acquièrent des mutations au cours des nombreux passages en culture, et que les modèles murins prennent du temps à mettre en place et ne reflètent pas les caractéristiques tissulaires humaines, les organoïdes issus de tissus de patients sont d’un grand intérêt pour la recherche fondamentale et les études pharmacologiques.

En effet, à partir de biopsies ou de résections, un épithélium adulte, reflet de la normalité ou de la pathologie tissulaire, peut être généré *ex vivo*. La **culture d’organoïdes peut ainsi être corrélée aux données cliniques et pathologiques du patient**. Clevers et ses collaborateurs à l’Institut Hubrecht, ont dérivé 22 cultures d’organoïdes de tissus coliques normaux et cancéreux de patients avec un taux de succès de 90% (van de Wetering, Francies et al. 2015). Les organoïdes étaient ensuite caractérisés via immunohistochimie, séquençage du génome entier et analyse d’expression génique. **Les mutations retrouvées, la présence de variants d’épissage et les altérations du nombre de copies étaient hautement corrélés avec les biopsies d’origine** dont étaient issus ces organoïdes. La plupart des cultures présentaient des structures polyclonales observées dans les biopsies, avec une **morphologie similaire**. Ces résultats ont été confirmés par une autre étude à partir de biopsies humaines de métastases de CCR (Weeber, van de Wetering et al. 2015). **Des approches pharmacologiques sont donc réalisables sur ce modèle**, au vu des similarités de caractéristiques avec le tissu originel, la facilité d’isolation et de culture, ainsi que le maintien au long-terme en culture.

De plus, un autre avantage de la culture d’organoïdes est la possibilité de **pouvoir étudier l’impact de différents systèmes biologiques en cocultures**. De récentes études ont démontré que des cocultures entre organoïdes et des **lymphocytes, des myofibroblastes ou des neurones entériques**, étaient possibles et similaires aux interactions tissulaires observées *in vivo* (Nozaki, Mochizuki et al. 2016, Pastula, Middelhoff et al. 2016).

Enfin, concernant les avantages, de nouvelles techniques se développent de plus en plus afin de répondre aux problématiques que soulève le tissu cancéreux. En effet, **lors de la carcinogenèse**, l’épithélium colique est soumis à des **forces mécaniques influençant l’organisation cellulaire**. Pour comprendre ces mécanismes de réorganisation, une équipe française a **développé un système permettant de générer des capsules d’alginate**, contenant des cellules souches de n’importe quel tissu. Les organoïdes cultivés à l’intérieur sont donc soumis à une force mécanique similaire à ce qui est observé *in vivo* ; c’est-à-dire un confinement spatial favorisant un cœur cellulaire hypoxique

présentant des débris cellulaires, bordé par des cellules prolifératives ayant une forte capacité migratoire (Alessandri, Sarangi et al. 2013).

La culture des organoïdes, basée sur l'utilisation du matrigel **possède, néanmoins, quelques limites**. En effet, il existe une **variabilité de la reproductibilité** des essais due aux **différents lots de matrigel** (Kleinman and Martin 2005). De plus, le matrigel est dense et **n'offre pas une diffusion aisée des grosses molécules**. Le côté apical des cellules au sein des organoïdes n'est pas facile d'accès et les études d'interactions avec le microbiote ne sont pas courantes, même si la micro-injection est possible (Bartfeld and Clevers 2015).

Etant donné que les organoïdes représentent l'hétérogénéité tissulaire, la quantité de données obtenue est plus importante et leur **interprétation est plus complexe**. Pour analyser les cultures 2D, l'utilisation de système à haut débit est couramment employée. Cependant, la transposition de cette utilisation aux cultures 3D, n'est pas encore optimisée au vu de sa nouveauté. Les procédures doivent alors être développées et optimisées pour l'analyse de culture 3D. C'est sur ces aspects analytiques et thérapeutiques, que le chapitre suivant se focalisera.

III/ Applications thérapeutiques pour les pathologies coliques

1) *Utilisation thérapeutique du modèle organoïde colique*

Depuis quelques années, le screening pharmacologique basé sur les organoïdes a commencé à se développer. Il a notamment été démontré que la culture 3D permet de mieux ajuster le criblage thérapeutique de certaines cibles dont la régulation est différente en 2D versus 3D. Par exemple, le récepteur du facteur de croissance épidermal humain (**HER2**) **s'hétérodimérise** dans des lignées cancéreuses de sein, alors qu'il **s'homodimérise dans un système en 3D** (Pickl and Ries 2009).

La première application en vue d'une médecine personnalisée à partir du protocole de génération d'organoïdes intestinaux, fut un **modèle de fibrose cystique** (ou mucoviscidose) (Dekkers, Wiegerinck et al. 2013). La **mucoviscidose** est une pathologie héréditaire, causée par la **mutation du gène CFTR** (Cystic Fibrosis Transmembranar conductance Regulator gene) codant pour des canaux ioniques à chlorure épithéliaux. Cette étude a montré que l'augmentation des taux d'AMPC, induit par la forskoline, provoque un **gonflement des organoïdes colorectaux normaux** via le CFTR, mais n'engendrait aucune réponse dans les organoïdes colorectaux issus de patients atteints de mucoviscidose. **Des modulateurs de CFTR ont alors été utilisés** afin de restaurer son effet et ont abouti à la première application préclinique. Quelques années plus tard, la même équipe utilisait des organoïdes colorectaux issus de patients atteints de mucoviscidose, et utilisait ensuite **le système d'édition du génome CRISPR-Cas9** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated 9) afin de **corriger le locus de CFTR par recombinaison homologue** (Schwank, Koo et al. 2013). L'allèle corrigé permettait alors une expression génique fonctionnelle de CFTR et provoquait ainsi l'entrée d'ions chlorure, une augmentation du taux d'AMPC induit par la forskoline, et un gonflement des organoïdes. La différence quantitative de gonflement induit par la forskoline entre les organoïdes intestinaux issus de patients atteints de mucoviscidose était en réalité associée avec les marqueurs pronostiques (tels que la localisation de la mutation du gène ou la perte de fonction des canaux chlorure) (Dekkers, Berkers et al. 2016). Cette étude fournit alors la **preuve de concept de la**

correction génique par recombinaison homologue dans des cellules souches primaires intestinales adultes, issues de patients.

L'utilisation d'organoïdes tumoraux peut également être un atout pour comprendre les mécanismes de carcinogenèse et effectuer un ciblage thérapeutique personnalisé. En effet, le **CCR** est une pathologie complexe définie en plusieurs phénotypes selon la **succession de hits mutationnels** dans l'épithélium intestinal. Matano et ses collaborateurs, ont **introduit 5 mutations (APC, K-RAS, SMAD4, TP53 et PI3KCA)** dans des organoïdes intestinaux humains normaux en utilisant le système d'édition de génome **CRISPR-Cas9** (Matano, Date et al. 2015). Ces organoïdes mutants générés pouvaient alors croître avec du milieu de culture pauvre en facteurs de croissance et montrent des **capacités invasive et métastatique**, une fois implantés en sous-cutanée chez la souris.

2) Systèmes à haut débit pour l'analyse des organoïdes

La culture d'organoïdes permet d'envisager une analyse à grande échelle du type criblage thérapeutique. Ceci à condition d'établir au préalable et de façon rigoureuse les paramètres d'analyse. Or, le fait que les organoïdes soient hétérogènes à un instant *t* de la culture et qu'ils se superposent dans une matrice en 3D, complique l'analyse réalisée de façon classique. Cependant, l'analyse à haut débit présente l'avantage de la **rapidité d'analyse, de la reproductibilité, et de l'établissement de concentrations efficaces médianes (EC50), à partir de peu d'échantillons de patients, telles que les biopsies** (Young and Reed 2016).

Lorsque ce projet de thèse a débuté en février 2015, il n'y avait alors aucune publication sur l'utilisation d'une approche par high-content screening – HCS, appliquée au modèle organoïde. Les approches de HCS permettent, à partir d'images acquises sur les cultures en lumière transmise ou après marquage des protéines ou organites d'intérêt, la mesure simultanée de **plusieurs paramètres moléculaires et cellulaires, de les analyser et de les stocker**. Ces techniques sont basées sur une **microscopie automatisée à haute résolution** (confocale), couplée à une **analyse d'images multiparamétrique** permettant d'obtenir des **données quantitatives** sur les changements phénotypiques d'une population cellulaire ou la localisation ou l'activation d'une protéine d'intérêt par exemple. Les premières études de HCS étaient focalisées sur des cultures de sphéroïdes et non sur des cultures d'organoïdes, **afin de quantifier les changements phénotypiques des sphéroïdes cancéreux humains** (issus de lignées cellulaires) en réponse à des traitements anti-cancéreux dans des plaques 96 et 384 puits. Grâce à des **algorithmes multiparamétriques développés** et l'utilisation de marqueurs de survie, il était alors possible de suivre la **viabilité et l'apoptose cellulaire**, mais également de **caractériser les structures par leur forme et leur taille**. Ainsi, **119 molécules anticancéreuses** ont été **testées** sur des sphéroïdes issus de lignée cellulaire de carcinome de côlon humain (HCT116). Cette étude mettait en avant le développement de l'analyse de modèle 3D afin d'obtenir des données physiologiques (Sirenko, Mitlo et al. 2015).

A partir de ces essais avec les sphéroïdes, il était primordial **d'établir un état des lieux des technologies disponibles et de leurs applications possibles concernant le modèle 3D organoïde**. Ainsi, Li et ses collaborateurs ont généré ce travail, début **2016**, en comparant les **caractéristiques de toutes les technologies** de microscopie optique existantes capables d'imager ces structures 3D, et **des fonctionnalités des logiciels d'analyses** (Li, Zhou et al. 2016). Chacune des technologies d'imagerie avait des points forts et des points faibles en fonction de la question scientifique posée. En effet,

certaines comme le **LSFM** (Light Sheet based Fluorescence Microscopy) proposaient une très haute définition et **résolution d'acquisition**, même pour **des organoïdes de taille importante** (mm), mais **sans vitesse d'acquisition suffisante pour des études de screening**. Cependant, des **systèmes générés pour le screening**, couplant un lecteur de plaque à de la microscopie confocale (tels que l'IncuCyte de BioSciences, l'ArrayScan de ThermoFisher ou Imaxpress Micro confocal de Molecular Devices), **offraient cette vitesse d'acquisition, mais ne proposaient pas une analyse 3D des structures avec une résolution suffisante** dans la profondeur de l'organoïde. Concernant les **logiciels d'analyses des acquisitions** réalisées via ces différentes technologies, la comparaison des fonctionnalités proposées a également été réalisée. Le but étant de gérer et d'exploiter toutes les données complexes générées de cette culture d'organoïdes. Certains logiciels sont libres de droit, tels que Fiji, BioImageXD, TANGO et d'autres sont commercialisés, tels que MetaMorph, Volocity et Imaris, mais **offrent une analyse 3D des organoïdes plus ou moins performante, selon les fonctionnalités proposées**.

Au vu de la complexité du modèle *sphéroïde*, certaines équipes ont décidé de **créer des supports de culture favorisant le screening** et également des supports permettant l'utilisation de la microscopie. Ainsi, i) des **plaques 96 puits possédant des micro-puits** ont été générées avec pour caractéristiques, une surface apolaire, des propriétés optiques similaires au polystyrène pour l'utilisation de la plaque en imagerie et de faible diamètre équivalent à la taille maximale atteinte par des sphéroïdes (Vrij, Espinoza et al. 2016) ;

ii) Une **plateforme de 384 puits a été générée** afin de cultiver des *organoïdes* cancéreux de côlon humain (Boehnke, Iversen et al. 2016). L'ensemencement des cellules souches isolées, une à une et l'ajout de traitement au bout de 4 jours de culture étaient **automatiques**. Cette plateforme a alors été validée comme étant **robuste et reproductible** dans les réplicas des expériences ;

iii) Le dernier développement connu à ce jour est la **création d'un support** permettant à la fois le suivi d'organoïdes encapsulés et la caractérisation de ces derniers par microscopie à haute résolution. Le support, nommé **UniverSlide**, est utilisable pour un **screening à moyen et haut débit**, avec des **acquisitions automatisées**, sur un microscope droit ou inversé et pour des organoïdes vivants ou fixés (Alessandri, Andrique et al. 2017).

3) Pathologies intestinales, organoïdes et analyse à haut débit

Très récemment, une étude a été publiée sur le **développement et l'utilisation d'une bio-banque d'organoïdes cancéreux de côlon de patients**, caractérisée par séquençage du génome entier (Pauli, Hopkins et al. 2017). 56 cultures d'organoïdes issus de patients et 19 modèles PDX ont été générés à partir de 769 patients. Les données génétiques étant insuffisantes pour orienter le traitement à suivre pour ces patients, **les systèmes HTS et HCS** ont été utilisés et des **combinaisons de traitements ont été proposées**. Cette étude a alors permis l'identification d'une nouvelle approche en vue d'une médecine personnalisée au travers du séquençage entier du génome mais également par l'utilisation de ce modèle organoïde permettant un screening ciblé et efficace. Il serait ensuite intéressant de suivre l'évolution de cette étude.

Enfin, la dernière étude publiée à ce jour, concernant les avancées de ce modèle organoïde dans la compréhension des mécanismes de carcinogenèse provient d'une équipe américaine

(Yan, Konstorum et al. 2017). Les auteurs de cette étude ont réussi à **établir une approche mathématique modélisant les organoïdes cancéreux de côlon de façon spatiotemporelle**. Cette modélisation permet alors de prédire le **devenir morphologique de la tumeur via la régulation des cellules souches** par des signaux provenant du microenvironnement (tels que BMP et HGF). Les données générées sont en accord avec les résultats générés par les études réalisées sur des organoïdes cancéreux issus de patients atteints de CCR. Cette étude permet donc de confirmer le fait que les cellules souches soient primordiales à la carcinogenèse, mais permet également d’établir un modèle mathématique afin de prédire son évolution. Ce qui ouvre la voie d’une perspective nouvelle quant à l’application de médecine personnalisée.

Les organoïdes représentent l’un des meilleurs modèles d’étude à l’heure actuelle pour comprendre les mécanismes impliqués dans la **physiopathologie intestinale**. La création de **bio-banques d’organoïdes pathologiques** issus de patients permettrait de **caractériser ces mécanismes, d’identifier de nouvelles cibles thérapeutiques** et de proposer ainsi une **médecine personnalisée** dans plusieurs années. Pour cela, l’adaptation des technologies d’analyse actuelles ou le développement de technologies spécifiques devront être nécessaires pour répondre à ces questions pharmacologiques. Un autre point est alors en train d’émerger, celui du **devenir des ‘big data’** générés par ces technologies, qui seront dans un premier temps trop nombreux et complexes pour être traités.

La **thrombine**, une protéase à sérine connue pour être l'acteur clé de la cascade de coagulation est augmentée en quantités importantes dans des tissus intestinaux pathologiques inflammatoires ou cancéreux, sans que l'on ne connaisse réellement les conséquences de cette présence augmentée sur la biologie de l'épithélium intestinal. De rares articles ont décrit les effets de la thrombine sur la prolifération ou l'apoptose de lignées cancéreuses de cellules intestinales. Cependant, **les effets de la thrombine sur la cellule épithéliale colique non-transformée ne sont pas connus**. Les conséquences d'une exposition à différentes doses de thrombine sur un épithélium complexe, composés de différents types cellulaires plus ou moins différenciés n'ont jamais été étudiés. Un nouveau modèle cellulaire, nommé **organoïde**, permet de reconstituer un épithélium colique fonctionnel en 3-dimensions (3D) à partir de résections ou de biopsies humaines, et ce, grâce aux capacités d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules souches issues des cryptes coliques. L'utilisation de ce modèle est pertinente, puisqu'il permet d'observer et de **quantifier les différences phénotypiques** entre les organoïdes pathologiques et normaux, de pouvoir les **caractériser** et enfin **d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques**. Cependant, les systèmes d'analyse actuels à haut débit, ne permettent pas de faire cela de manière fiable et reproductible.

C'est pourquoi, les objectifs de ma thèse se sont focalisés en trois parties :

- Evaluer les **effets de la thrombine** sur l'épithélium colique humain, grâce au modèle *ex vivo* organoïde. Puis, évaluer les **effets pharmacologiques d'une modulation de PAR₁ et de PAR₄**, les deux récepteurs fonctionnels connus de la thrombine, en utilisant ce même modèle d'étude, afin d'appréhender les mécanismes d'action de la thrombine.
- Evaluer **l'activité métabolique des organoïdes inflammatoires** issus de côlon de patients atteints de MICI, afin de mieux comprendre les différences phénotypiques observées, comparé à un épithélium colique sain.
- **Et développer une approche de screening à haut contenu robuste et reproductible**, appliquée aux organoïdes, dans le but de caractériser ce modèle, de valider de nouvelles cibles thérapeutiques (telles que la thrombine ou les PARs) et de proposer une médecine personnalisée à terme.

RESULTATS

I/ La thrombine modifie la croissance, la prolifération et l'apoptose des organoïdes de côlon humain : un mécanisme PAR₁ et PAR₄ dépendant

Préambule

La **thrombine**, une protéase à sérine connue pour être l'acteur clé de la cascade de coagulation, a été décrite pour réguler les processus apoptotiques au niveau du côlon via l'activation de récepteurs activés par des protéases ou PARs (Protease-Activated Receptors). Cependant, les effets de la thrombine sur la cellule épithéliale colique n'ont été étudiés qu'en utilisant des lignées cellulaires. Les conséquences d'une exposition à différentes doses de thrombine sur un épithélium complexe, composés de différents types cellulaires plus ou moins différenciés sont inconnues à ce jour. Un nouveau modèle cellulaire, nommé **organoïde**, permet de reconstituer un épithélium colique fonctionnel en 3-dimensions (3D) à partir de résections ou de biopsies humaines, et ce, grâce aux capacités d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules souches issues des cryptes coliques.

Le 1^{er} objectif de ma thèse a été d'évaluer les **effets de la thrombine sur la survie, la prolifération, l'apoptose et la différenciation** de l'épithélium colique humain, en utilisant le modèle organoïde. Puis, de déterminer l'implication des récepteurs PAR₁ et PAR₄ activés par la thrombine dans ces effets. Ainsi, l'ajout de thrombine (à faible dose : 10mU/mL et à forte dose : 50mU/mL) sur une culture d'organoïdes établis à partir de tissus colorectaux normaux entraîne une **diminution de moitié de l'activité métabolique** et de la **prolifération cellulaire**. Ces effets sont bloqués en présence d'un antagoniste de PAR₁. Le **processus apoptotique** est, cependant, **augmenté d'un facteur 8** en réponse à la thrombine (aux deux doses). Ce processus est inhibé en présence d'antagoniste de PAR₁ ou de PAR₄. Concernant la différenciation épithéliale, la thrombine **diminue le nombre de colonosphères** (structures immatures), au profit d'une **augmentation du nombre de structures apoptotiques et de colonoïdes** (structures plus matures présentant des néo-cryptes). Cet effet est dû à **l'activation à la fois de PAR₁ et de PAR₄** dans les cellules épithéliales coliques. Mes résultats démontrent que la thrombine exogène agit sur les processus d'apoptose, de prolifération et de différenciation sur un épithélium complexe, issu de la culture de tissus humains.

Pour conclure, ces travaux de thèse, **soumis à *British Journal of Pharmacology*** ont permis de mettre en évidence les effets de la thrombine sur l'état métabolique, l'apoptose et la différenciation de l'épithélium colique humain, grâce au modèle 3D *ex vivo* d'organoïdes colorectaux. L'utilisation de ce modèle complète les approches jusque-là effectuées dans des modèles de lignées de cellules épithéliales, proposant une vision intégrée du comportement d'un épithélium complexe humain.

Thrombin modifies growth, proliferation and apoptosis of human colon organoids: a PAR1- and PAR4-dependent mechanism

Morgane Sébert¹, Alexandre Denadai-Souza¹, Muriel Quaranta¹, Claire Racaud-Sultan¹, Sophie Chabot², Philippe Lluet², Nicolas Monjotin³, Laurent Alric⁴, Guillaume Portier⁵, Sylvain Kirzin⁵, Delphine Bonnet¹, Audrey Ferrand^{1,5} and Nathalie Vergnolle^{1,5}.

¹IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, Toulouse, France

²UROsphere, Ramonville, France

³Institut de Recherche Pierre Fabre, Castres, France

⁴Département de Médecine Interne, CHU Purpan, Toulouse, France

⁴Département de Chirurgie Digestive, CHU Purpan, Toulouse, France

⁵Department of Physiology and Pharmacology, University of Calgary, Calgary, AB, Canada

⁵Equal contribution

* Correspondance: Dr. Nathalie Vergnolle, Inserm UMR-1220, Institut de Recherche en Santé Digestive, CS60039 CHU Purpan, 31024 Toulouse, Cedex-3, France. E-mail address: nathalie.vergnolle@inserm.fr

Acknowledgements: The authors thank Astrid Canivet and Sophie Allart from the Imaging core facility of Toulouse-Purpan for their help with 3D imaging and analysis. This work was supported by a grant from the European Research Council (ERC- 310973 PIPE) to NV. Tissue collection was originally sponsored by the University Hospital of Toulouse for regulatory and ethic submission, and by a grant from the delegation régionale à la recherche clinique des hôpitaux de Toulouse, through the MICILIP project. The COLIC collection (DC-2015-2443) was used in the present study. This project was also supported through a “Fond Unique Interministeriel” (FUI) program, by the Région Midi-Pyrénées (now Occitanie), Toulouse Métropole, the Banque Publique d’Investissement (BPI) de France. Equipments obtained from the use of Fonds Européens de Développement Régional, (FEDER), and the region Occitanie were used in the present research program.

Conflict of interest statement: The authors declare no conflict of interest.

Authors’ contribution to the manuscript: MS have performed experiments, analyzed data, contributed to manuscript drafting. LA, GP and DB have provided material, and contributed to manuscript editing. ADS, SC, PL, CRS, AF and NV have analyzed and critically reviewed data, obtained funding and contributed to manuscript editing. Study design, concept and supervision were performed by ADS, AF and NV. NV wrote the manuscript and editing was performed by all authors.

Keywords: Organoids, colonoids, proteases, epithelial cells, thrombin, protease-activated receptors, PAR1 and PAR4.

ABSTRACT

Background and purpose- Thrombin is massively released upon tissue damage associated with bleeding or chronic inflammation. The question of the effects of such thrombin on tissue regrowth and repair has been scarcely addressed, and only in cancer cell lines. The purpose of the present study was to determine thrombin's pharmacological effects on human intestinal epithelium growth, proliferation and apoptosis, using 3-dimensional cultures of human colon organoids.

Experimental design- Crypts were isolated from human colonic resections and cultured for 6 days, forming human colon organoids. Cultured organoids were exposed to 10 and 50 mUmL⁻¹ of thrombin, in the presence or not of Protease-Activated Receptor (PAR) antagonists. Organoid morphology, metabolism, proliferation and apoptosis were followed.

Key results- Thrombin favored organoid maturation leading to a decreased number of immature cystic structures and a concomitant increased number of larger structures releasing cell debris and apoptotic cells. Size of budding structures, metabolic activity and proliferation were significantly reduced in organoid cultures exposed to thrombin, while apoptosis was dramatically increased. Both PAR1 and PAR4 antagonists inhibited apoptosis regardless of thrombin doses. Thrombin-induced inhibition of proliferation and metabolic activity were reversed by PAR4 antagonist for thrombin's lowest dose and by PAR1 antagonist for thrombin's highest dose.

Conclusion and implications- Overall, our data suggest that the presence of thrombin in the vicinity of human colon epithelial cells favors their maturation at the expense of their regenerative capacities. Our data point to thrombin and its two receptors PAR1 and PAR4, as potential molecular targets for epithelial repair therapies.

INTRODUCTION

New paradigm has been set up for the treatment of Inflammatory Bowel Diseases (IBD), shifting from resolving symptoms and inflammation *per se* (i.e. infiltration and activation of inflammatory cells), toward the objective of tissue repair and mucosal healing (Iacucci & Ghosh, 2016). Indeed, mucosal healing and epithelial repair is increasingly incorporated in the outcome measures of clinical trials (Shah, Colombel, Sands & Narula, 2016). This new focus on epithelial regeneration and healing has shed new light on intestinal epithelial cell biology and drives new area of research for the development of therapeutic approaches in IBD. The study of mediators that are released in the course of chronic intestinal inflammation and their effects on epithelial biology has become a major focus of research for drug development.

In that setting, thrombin appears as a most important candidate, since IBD patients exhibit abnormalities in coagulation and fibrinolysis, an increased thrombin generation and a significant presence of the protease in colonic tissues (de Jong, Porte, Knot, Verheijen & Dees, 1989; Senchenkova, Seifert & Granger, 2015). Therefore, the effects of thrombin on human epithelial tissues have to be carefully considered. Previous studies have investigated the effects of thrombin on intestinal cancer cell lines (Darmoul, Gratio, Devaud, Lehy & Laburthe, 2003), demonstrating that thrombin provoked dramatic mitogenic responses, proliferation, and increased cell migration. These studies suggested that thrombin could be a growth factor for human colon cancer. However, the effects of thrombin on intestinal epithelium have only been studied in cancer cells, which are known to overexpress thrombin receptors (Darmoul, Gratio, Devaud, Lehy & Laburthe, 2003; Gratio, Walker, Lehy, Laburthe & Darmoul, 2009). What are the effects of thrombin chronic exposure on non-transformed and non-cancerous human intestinal epithelial cells? Would thrombin modify epithelial proliferation, apoptosis of non-cancerous cells or regeneration in intestinal tissues? Would the presence of thrombin modify epithelial repair in the context of IBD?

The recent development of human colon organoid cultures allows pharmacological testing of compounds in 3-dimensional primary cell cultures in complex human epithelia (Crespo et al., 2017; Sato et al., 2011). Indeed, organoid cultures are representative of the complex composition of intestinal epithelium since within the same organoid, after few days of culture, stem cells, progenitors and differentiated cells are detected (Sato et al., 2011). In the present study, we took advantage of this model, to test the effects of thrombin on human healthy epithelium. Since renewal of damaged epithelium and epithelial repair implicate cell survival, growth and proliferation, our aim was to determine the effects thrombin could have such parameters in human colon organoid cultures, and to study the potential involvement of the two active thrombin receptors: Protease-Activated Receptors (PAR)-1 and -4.

METHODS

Human samples

Biological samples were obtained from patients treated at the Toulouse University Hospital. Patients gave informed consent, and were included in the registered COLIC study (DC-2015-2443). Colonic samples were obtained from surgical resections of patients suffering from colorectal cancer. Tissues that were used were harvested in healthy zones at the margin of the resection, and at least 10 cm away from the tumor. Characteristics and treatments of patients are provided in supplementary Table 1.

Organoids culture

Tissue obtained was opened longitudinally and washed with Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS, Sigma-Aldrich #D8537). Then, the mucosa was removed and incubated in an antibiotic solution (Gentamicin Sigma-Aldrich # G1397, 1000x; normocin InvivoGen #ANT-NR-1, 500x; fungizone Gibco #15290-018, 100x) for 5 min at room temperature (RT), 4 times. The mucosa was cut into 0.2–0.5 cm long pieces and placed in a petri dish containing cold DPBS before a series of 3 incubations in a 10mM Dithiothreitol (DTT, Roche #10197777001) solution, for 5-min at RT. Pieces of tissue were transferred into a 8mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Ambion #L/N.1408029) solution and were left under gentle rocking for 1h at 4°C. Supernatants were removed and replaced by 10mL of DPBS. Mucosa fragments were then re-suspended by vigorous manual up and down shaking (at least 15 repeated movements). Supernatants were recovered into a new 15mL falcon tube and centrifuged for 2 min, 40g at 4°C. Ten mL of Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12 (DMEM/F12, Invitrogen #12634-010) supplemented with 100x Glutamax-CTS (Invitrogen #A1286001), 100x HEPES (Gibco #15630-056) and 5% Fetal Bovine Serum (FBS), was added to the pellets and centrifuged again for 2 min, 40g at 4°C. This step was repeated twice. Then, crypts were counted by 20µL drop and centrifuged once again for 2 min, 40g at 4°C. Supernatants were removed and fresh hES matrigel (Corning #354277) was added to the pellets, carefully avoiding air bubbles. Ten µL of matrigel was plated in each well of a pre-warmed 96-well plate (Ibidi, µ-angiogenesis). Once the matrigel polymerized for 20 min, 70 µL of culture medium was added to each well. The culture medium was composed of ½ advanced DMEM/F12, ½ Wnt3a conditioned medium (supernatants from L Wnt-3A cells (ATCC® CRL-2647™)), 100x Glutamax-CTS, 100x HEPES, serum-free B27 (Life Technologies #12587-010, 50x), N2 (Invitrogen #17502-048, 100x), N-acetylcysteine (NAC, Sigma #A9165-5G, 500x), nicotinamide (Sigma #N0636, 10mM), recombinant human epithelial growth factor (EGF, Gibco #PHG0314, 50ng/mL), human Noggin (Tebu #120-10C, 100ng/mL), human R-Spondin (R&D #4645RS, 1µg/mL), gastrin (Sigma G9145, 10nM), SB202190 (Sigma 57067, 10µM), LY2157299 (Axon MedChem #1941, 0.5µM) and PGE2 (Sigma #P0409, 0.01µM). The cultures were finally incubated in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. The culture medium was changed every 3 days, but without NAC and LY2157599.

Treatments with Thrombin and antagonists

Thrombin diluted in 0.1% Bovine Serum Albumin (BSA) was added to culture media daily starting from day 3 and until day 6, at two different doses: 10 and 50 mU.ml⁻¹. Forty-five minutes before each

addition of thrombin to culture media, PAR1 antagonist F16357 (Pierre Fabre Medicaments), PAR4 antagonist ML354 (Tocris #5387) or their vehicle (0.02% DMSO) was added to the media, according to the protocol described in Supplementary Figure 1. The doses of thrombin used were selected according to previously published studies investigating the effects of thrombin in cell culture systems (Harmon, Tandon, Hoeg & Jamieson, 1986; Morganti et al., 2010). Similarly, at the doses selected, PAR1 (10 μ M), and PAR4 (140 nM) antagonists were proven to specifically inhibit these receptors in cell culture models (Monjotin, Gillespie, Farrie, Le Grand, Junquero & Vergnolle, 2016; Planty et al., 2010; Wen et al., 2014; Young et al., 2010). All cultures were stopped at day 6 for analysis.

Images of cultures and analysis

Structures were imaged using an apotome microscope (HXP120; Zeiss Axio-observer; x10, 0.45 NA) from the Toulouse-Purpan Imaging Core facility directed by Sophie Allart. Images were analyzed using the image J software from Fiji. For immunostaining, organoids were analyzed with an inverted confocal microscope, Spinning Disk (Flash4 CSU 1x, 234 z 0.5 μ m, with stream, x20 NA 0.75, 234 z-planes and 1.5 μ m spacing). 3D reconstruction and analysis for each acquired organoid were done with Imaris software (8.2, Bitplane).

Metabolic activity assay

The CellTiter-Glo[®] 3D reagent (Promega, #9683) kit was used to measure extracellular ATP, as an indication of mitochondrial metabolic activity within the cultures. The reagent was added to culture medium of each well (volume 1:1) and incubated for 30 min at RT, protected from light, as per the indications of the manufacturer. Luminescence was measured with a luminometer (Varioskan Flash – Thermo Scientific). A minimum of 3 wells per condition were analyzed and the metabolic activity was calculated using an ATP standard curve. Data were then normalized to the total surface area occupied by cultured cell structures, as observed by microscopic analysis using brightfield imaging using an apotome microscope.

Apoptosis assay

Apoptosis was quantified using the NucView 488 caspase-3 kit (Ozyme, 1mM in 1x PBS #BTM10403), at day 6, where active caspase-3 is detected as a measure of apoptotic cells. As per the manufacturer's instructions, the NucView 488 reagent was added to culture medium of each well (volume 1:1) and incubated for 30 min at RT, protected from light. Nucleus were stained using DAPI, as previously described (Gobbetti et al., 2015). The emitted fluorescence was measured with a confocal microscope (Spinning Disk – CSU-X1 – Flash4 camera – 20x, 0.75 NA). At least 10 organoids were analyzed by condition with 234 z-planes and 1.5 μ m spacing. 3D reconstruction and analysis of caspase-3 activity positive cells on total cells (stained by DAPI as previously described (Cenac et al., 2010)) by organoid were done with Imaris software 8.2, Bitplane.

Proliferation's measures

Organoids were fixed with 3.7% paraformaldehyde (PFA, Sigma Aldrich) in PBS at 37°C for 20 min. Organoids were permeabilized with 0.5 % triton X-100 (Sigma Aldrich) in PBS at RT for 20 minutes and

were incubated with a blocking buffer at 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich) in PBS 1.5 hour at 37°C. Organoids were then incubated for 2 hours at 37°C with primary antibody anti-Ki67, mouse IgG1 (Dako, #M7240, 1/100). Next, the primary antibody was washed 3 times 5 minutes and organoids were incubated with the secondary antibody, AlexaFluor 568 donkey anti-mouse (Life Technologies, #A10038, 1/500) 1.5 hour at 37°C and then stained for 20 minutes with DAPI (Invitrogen). Plates were mounted with Vectashield mounting medium (Eurobio) and organoids were analyzed with an inverted confocal microscope, Spinning Disk (Flash4 sCMOS, 234 z 0.5µm, with stream, x20 NA 0.75). At least 5 organoids were analyzed per condition with 234 z-planes and 1.5 µm spacing. Three-D reconstruction and analysis of Ki67 positive cells per total cells (stained by DAPI) in individual organoid were performed with Imaris software 8.2, Bitplane.

Statistical analysis

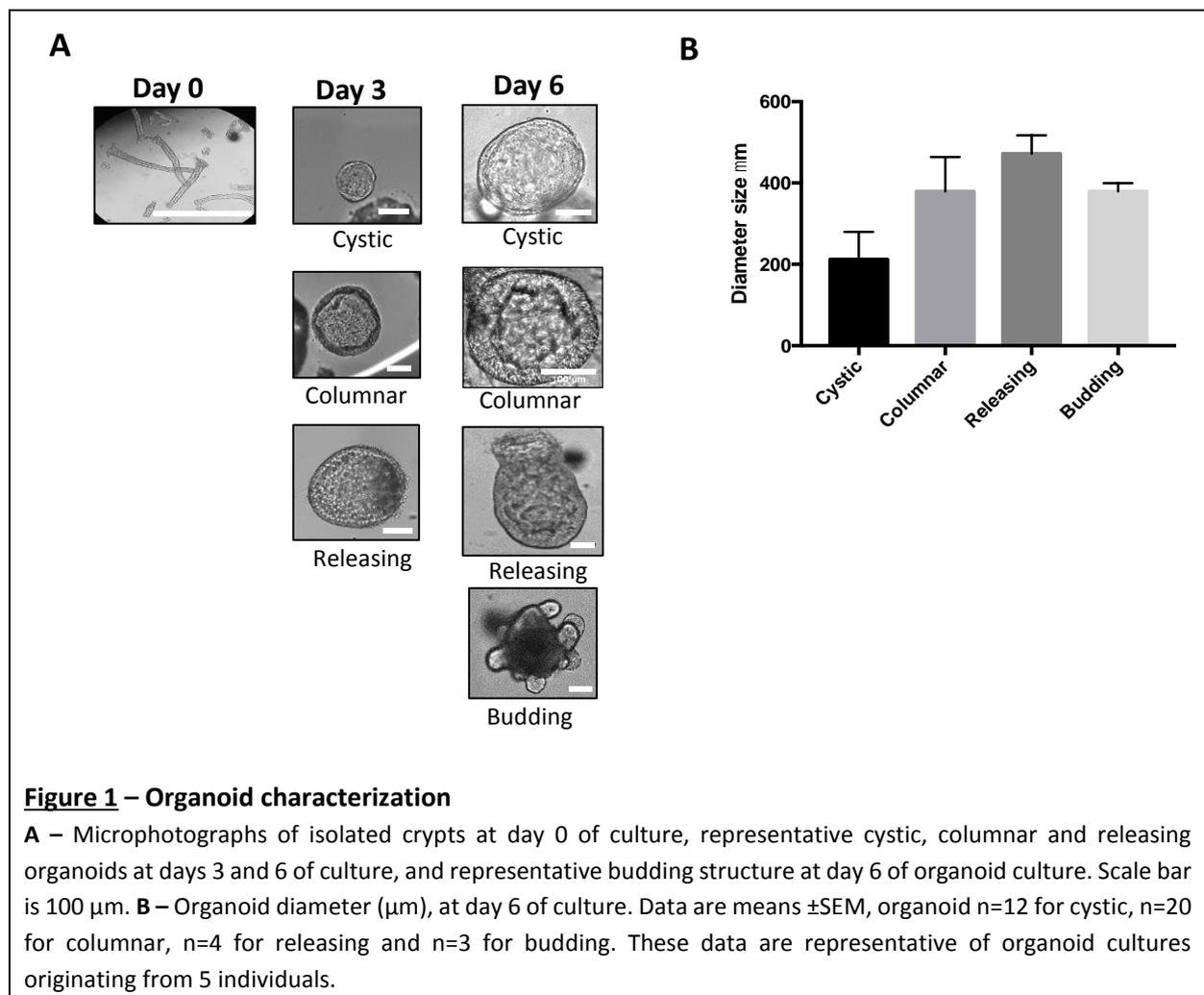
Data are expressed as mean ± SEM. Analyses were performed using the GraphPad Prism 6 software. Statistical significance was determined by One-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison's test. Significance was accepted for $P < 0.05$.

RESULTS

Characterization of organoid cultures

Human colon crypts were purified from fresh tissue samples obtained from colectomies harvested in healthy zones of tissues from patients diagnosed with colorectal cancer (Supplementary Table 1). Isolated crypt fragments (Figure 1A Day 0 panel) were cultured in three-dimensional Matrigel matrix for 3 and 6 days. Within the first day, the crypt architecture disappeared (not shown) to form organoid structures composed of an epithelial cell monolayer and a central lumen. At day 3 of culture, three types of structures were observed: “Cystic”, “Columnar”, and “Releasing” structures (Figure 1A, Day 3 panel). Cystic structures were characterized by flat epithelial cells organized to delineate a clear lumen (Figure 1A). Epithelial cells composing cystic organoids are typically immature and undifferentiated with high proliferative and self-renewal capacities. Columnar structures were characterized by thicker epithelial cells, still mono-layered, but with a columnar shape for all epithelial cells, similar to the shape of cells found in the native crypts (Figure 1A). Nuclei in columnar cells were stained on the basal portion of the cells. Epithelial cells from columnar structures typically undergo both proliferation and limited differentiation. The lumen of these structures could appear clear, or containing cellular debris. Releasing structures were characterized by their large size, the columnarity of the cells composing their shape, and the presence of a crater that seems to allow the release of intraluminal debris (Figure 1A). At day 6 of culture, the same 3 types of structure were observed (Figure 1A 6-days panel), and in addition, “Budding” structures were present. Budding structures are characterized by excrescences of new crypts and exemplify fully mature and differentiated organoids with both proliferative and differentiation capacities. These types of structures are called colonoids and were rare in our culture conditions (6-days of culture).

The size of each type of structure was measured at day 6 of culture (Figure 1B), and showed a trend of increasing size from the most immature structures (cystic) to the most mature structures (releasing and budding).



Effects of Thrombin exposure on human colon organoid cultures

Thrombin was added to the human organoid cultures daily from day 3 to day 6 of the culture (supplementary Figure 1). For the two doses of thrombin used (10 and 50 $\text{mU}\cdot\text{ml}^{-1}$), no difference in the total number of organoids was observed (not shown). Similarly, the size of cystic, columnar or releasing organoids was not changed by the addition of thrombin (Figure 2A). However, at the dose of 10 $\text{mU}\cdot\text{ml}^{-1}$, the addition of thrombin to human colon organoid cultures caused a significant decrease in the size of budding organoids, while the higher dose of 50 $\text{mU}\cdot\text{ml}^{-1}$ had no effect (Figure 2A).

While chronic incubation of human colon organoid cultures with thrombin had no effect on the percentage of columnar organoids present in the culture, thrombin (both 10 and 50 $\text{mU}\cdot\text{ml}^{-1}$) significantly affected the number of cystic organoids and increased the proportion of releasing organoids (Figure 2B). No significant effect was observed on the proportion of budding organoids in the presence of thrombin, but a trend towards an increased number of budding structures in the presence of thrombin could be noticed (Figure 2B). Taken together, these data suggest that thrombin exposure pushes colon organoid cultures towards maturation.

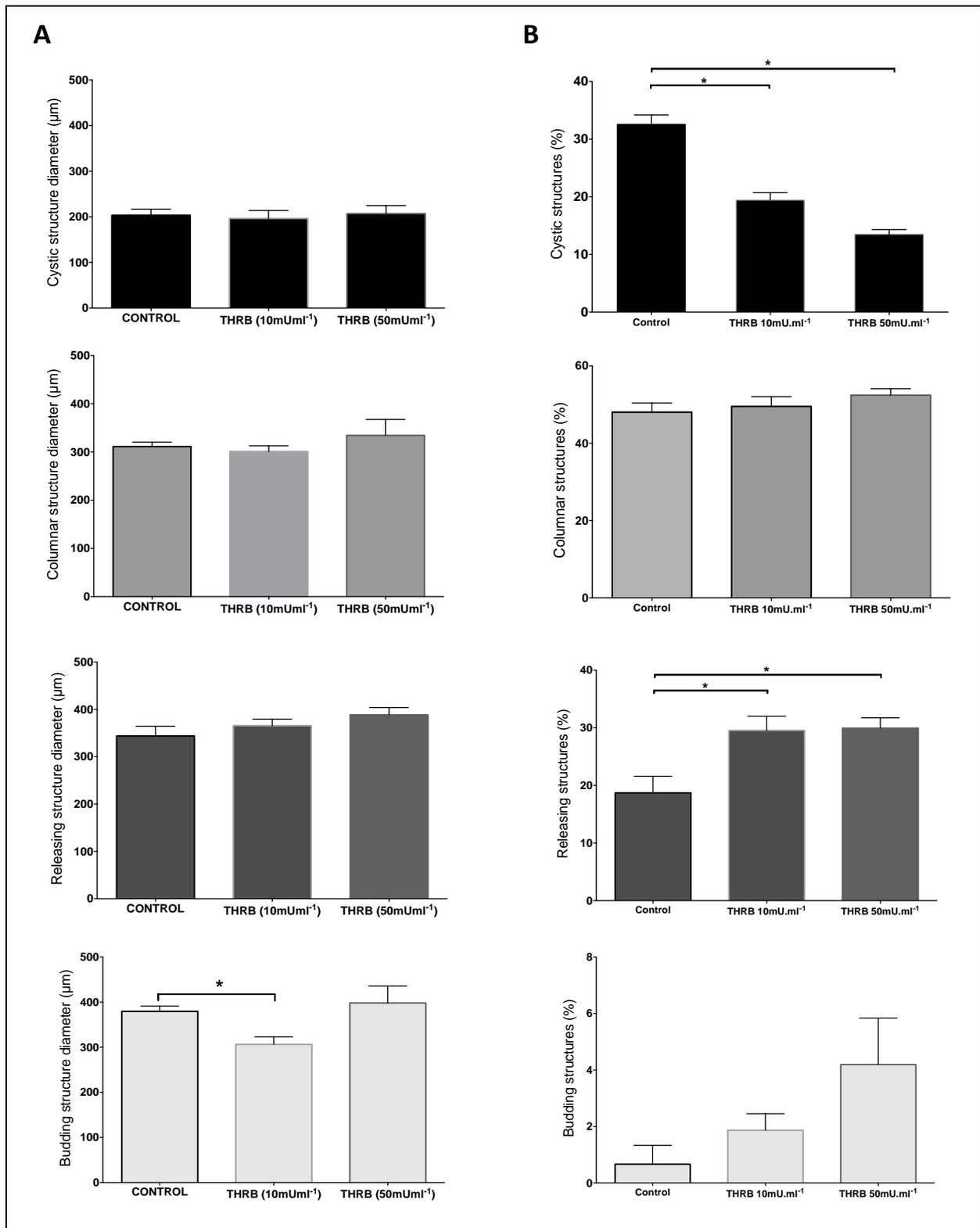
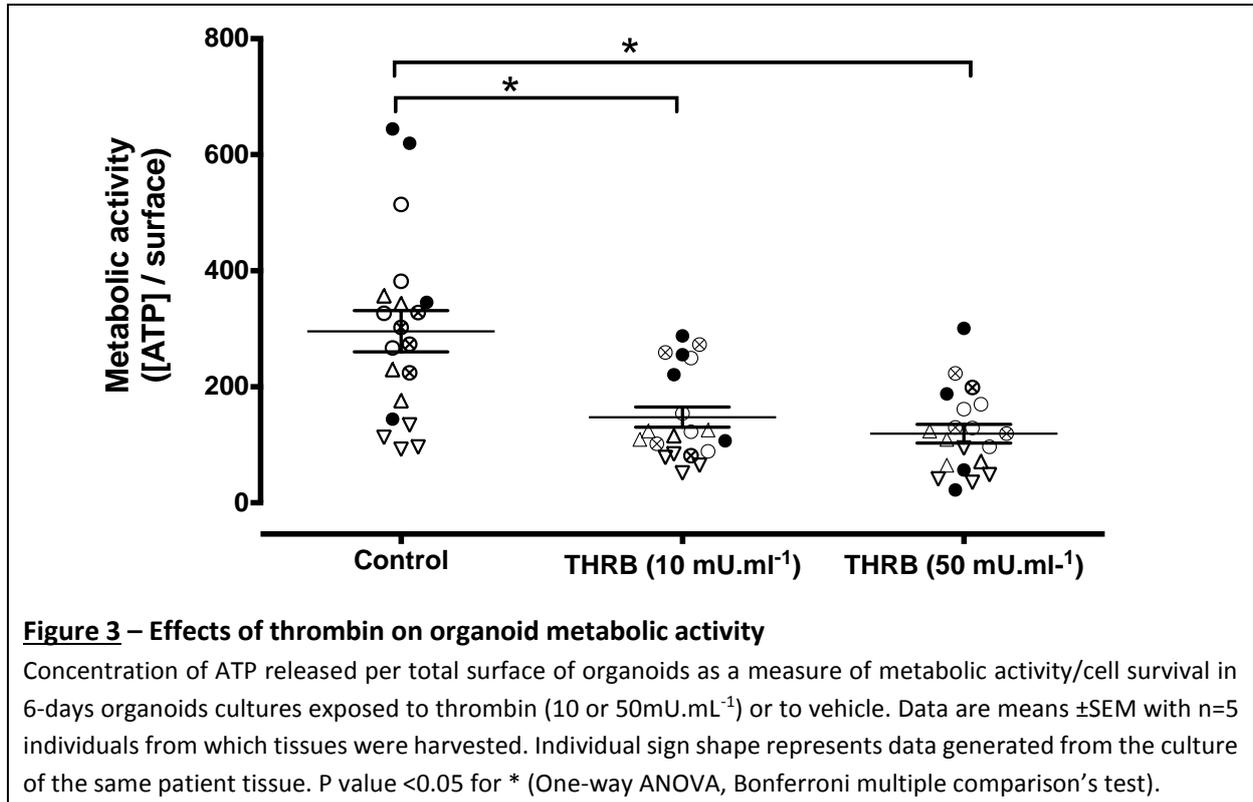
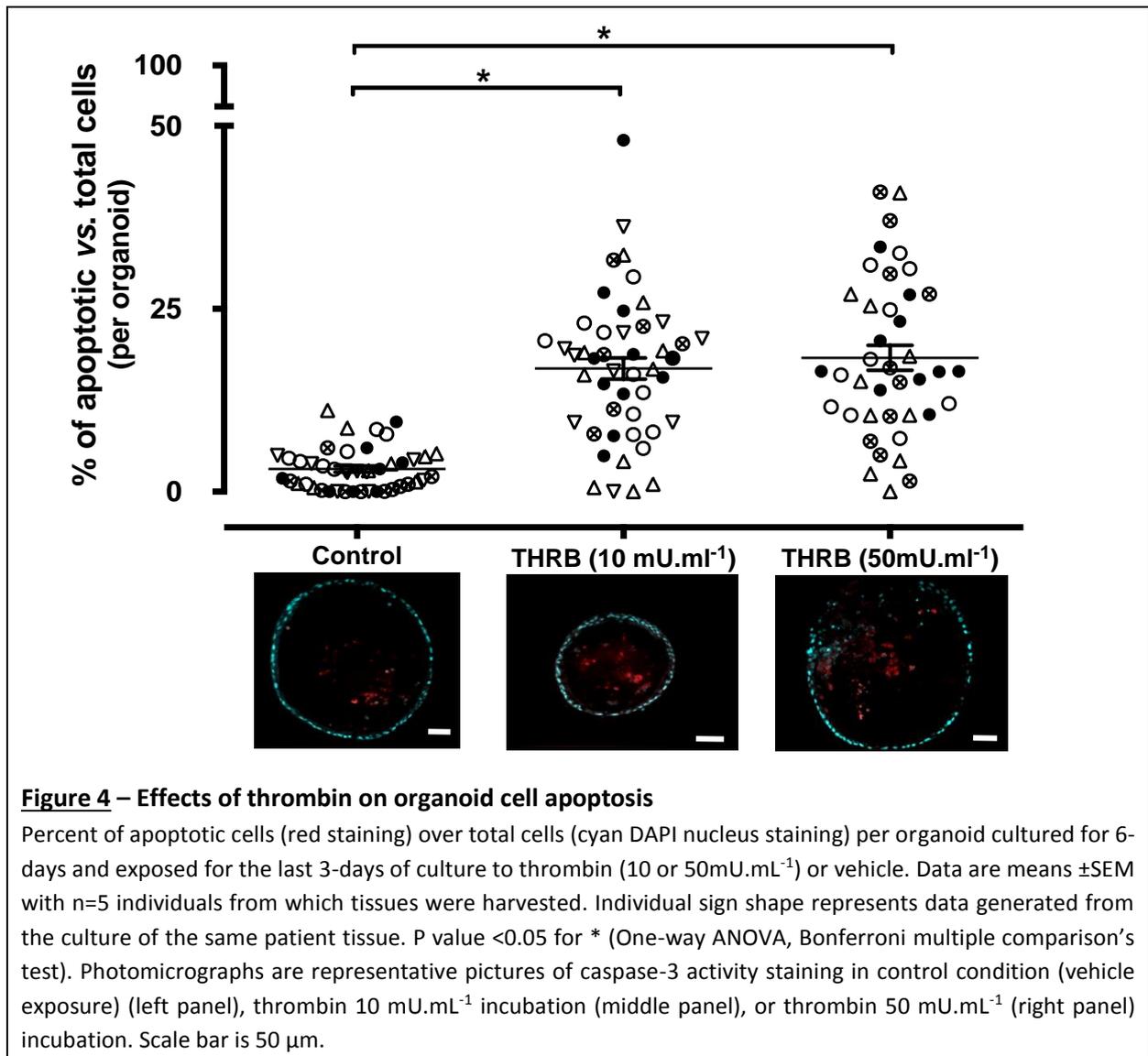


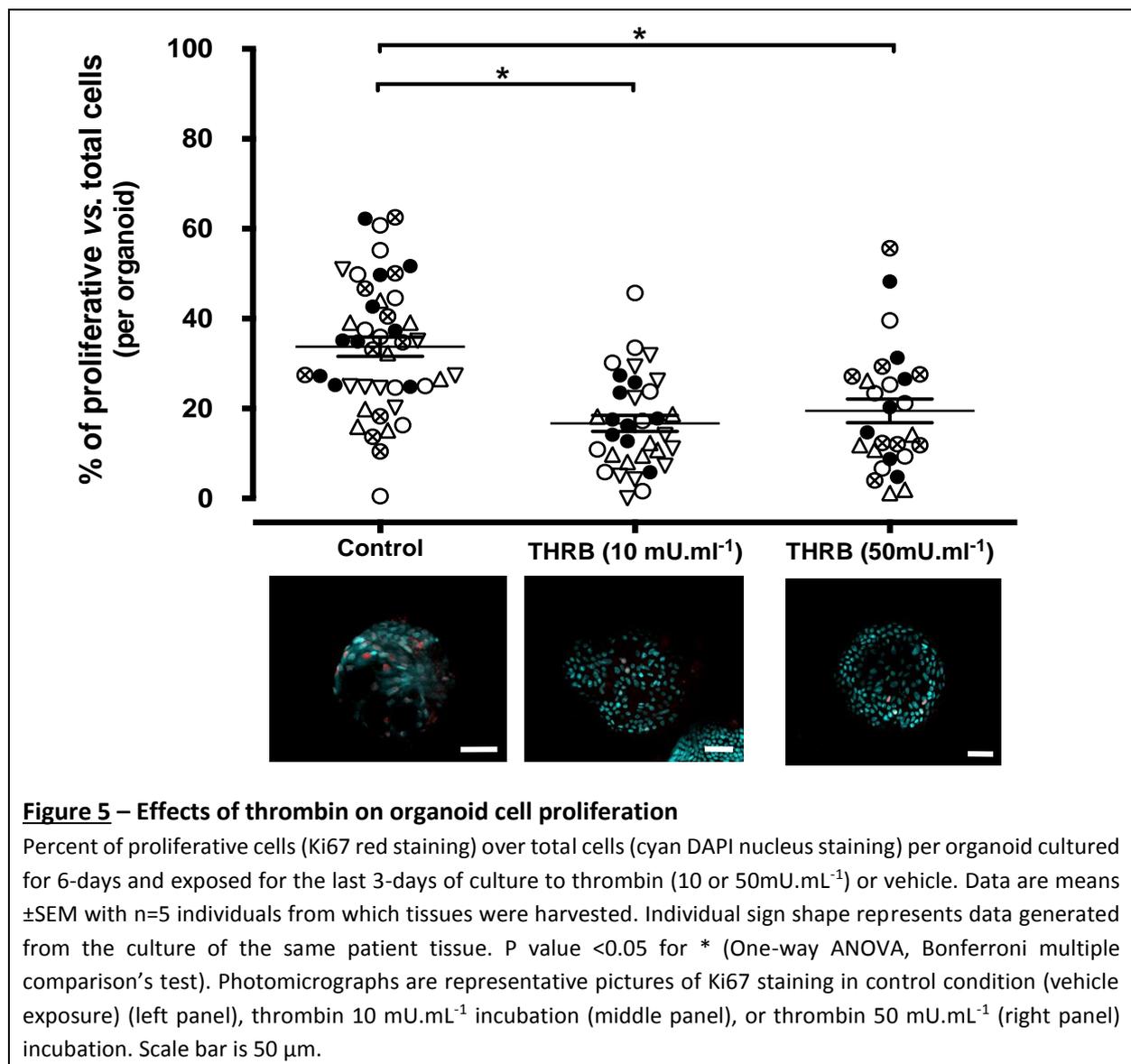
Figure 2 – Effects of thrombin on organoid characteristics

A – Organoid diameter (µm) of cystic, columnar, releasing and budding organoids at 6-days of culture and after 3 days of exposure to thrombin at 10 or 50mU.mL⁻¹ or to vehicle. **B** – Repartition of the different types of structures, at 6-days of culture and after 3 days of exposure to thrombin at 10 or 50mU.mL⁻¹ or to vehicle. Data are means ±SEM with n=5 individuals tissues were harvested from, and at least 70 organoids analyzed per condition. P value <0.05 for * (One-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison’s test).

The concentration of ATP release per surface of total organoids was used as a measure of metabolic activity/cell survival in organoids cultures. Thrombin incubation (both at 10 and 50 $\text{mU}\cdot\text{ml}^{-1}$) significantly reduced the metabolic activity of human colon organoid cultures (Figure 3). Apoptosis was significantly increased in organoid cultures exposed to both doses of thrombin (Figure 4). Immunostaining for apoptotic cells was particularly strong in the lumen of the structures (microphotographs on the panel), suggesting that apoptotic cells are expelled in the lumen of organoids. The percentage of proliferative cells (Ki67-positive cells) was significantly diminished in the presence of thrombin (both doses) (Figure 5).

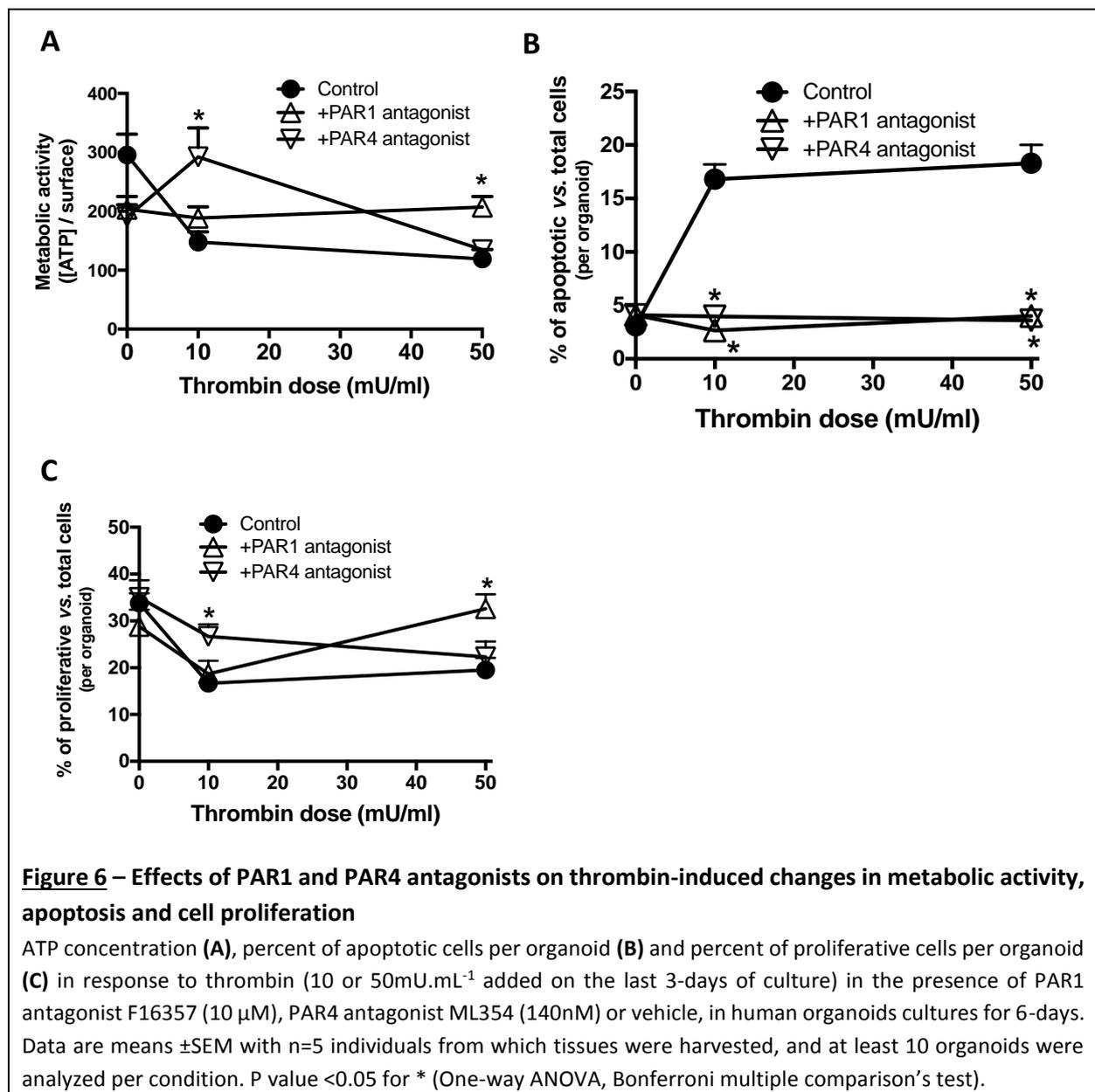






Thrombin-induced effects on human colon organoid cultures are mediated by the activation of both PAR1 and PAR4

The decreased metabolic activity induced by the lowest dose of thrombin was inhibited by a pre-incubation with the PAR4 antagonist ML354, but not by the PAR1 antagonist F16357. In contrast, the effect of the highest dose of thrombin (50 mU.mL⁻¹) was only inhibited by the PAR1 antagonist, and not by the PAR4 antagonist (Figure 6A). The effects of all doses of thrombin on apoptosis were completely abolished by both the PAR1 and the PAR4 antagonist, indicating that both receptors play a role in thrombin-induced apoptosis, regardless of the dose (Figure 6B). Thrombin-induced decrease in percentage of proliferative cells was inhibited by the PAR4 antagonist for the low dose of thrombin (10 mU.mL⁻¹), but not by the PAR1 antagonist (Figure 6C). The effects of the highest dose of thrombin (50 mU.mL⁻¹) on the percentage of proliferative cells in organoid cultures were inhibited by the PAR1, but not by the PAR4 antagonist (Figure 6C).



DISCUSSION

The present study investigated the effects of thrombin on human intestinal epithelium biology, with the aim of determining whether exogenous thrombin could eventually modify epithelial growth and/or renewal. We demonstrated that exogenous thrombin favored organoid maturation, but also induced severe apoptosis, reduced metabolic activity and proliferation of human intestinal epithelial cells. Overall, our data suggest that the presence of thrombin in the vicinity of epithelial cells is detrimental to epithelial renewal. Further, we have demonstrated that these detrimental effects of thrombin are mediated by the activation of both PAR1 and PAR4, the two functional thrombin receptors. We have previously demonstrated that PAR1 is expressed in human and mouse colon crypts and organoids (Nasri et al., 2016). The presence of PAR4 in stem cells/progenitors was not previously described, but our results revealed an active role for PAR4 in these cells. These findings are particularly

relevant in the context of IBD, where large amounts of thrombin are present in patient's intestinal tissues (de Jong, Porte, Knot, Verheijen & Dees, 1989). Our data point to thrombin and its two receptors PAR1 and PAR4, as potential molecular targets for epithelial repair therapies.

Most importantly, the model we used is a model originating from the human colon, and recapitulating at its best, a human intestinal epithelial organ. This technology is based on the isolation of fresh intestinal crypts, which are then cultured in 3-dimensions. The intestinal stem cells present in the isolated crypts proliferate and enter into a differentiation process, recreating a complex epithelium, containing possibly all the cell types that compose the colonic epithelium (enteroendocrine cells, goblet cells, enterocytes, etc.) (Sato et al., 2011). This model is nowadays considered as the best model to assess the effects of pharmacological treatments on human intestinal epithelium growth and regeneration (Cruz-Acuna et al., 2017). Indeed, cultured organoids are proposed for regenerative therapies as their transplantation can contribute to tissue repair and regeneration after injury (Fordham et al., 2013). Above all, this model offers an unparalleled strategy for recapitulating important features of human epithelial tissues, and for testing pharmacological approaches.

Thrombin is massively present in the vicinity of intestinal epithelium in patients suffering from IBD. Indeed, bleeding is often associated with tissue injury, and bloody diarrhea is a common symptom in IBD patients. In addition, studies have reported that IBD patients exhibit a threefold higher risk for development of systemic thrombosis than the general population. Enhanced platelet aggregates and enhanced thrombin generation has been measured in IBD patients (Senchenkova, Seifert & Granger, 2015). The concentration of thrombin that has been measured in tissues and blood from IBD patients are in the same range of concentrations we used in the present study, and the same concentrations of thrombin are classically used in *in vitro* models of platelet activation (de Jong, Porte, Knot, Verheijen & Dees, 1989; Morganti et al., 2010). Therefore, the effects of thrombin on human intestinal organoid cultures we have observed could well be informative of the endogenous effects of thrombin in pathological situations such as IBD. In addition, by using the organoid model, we can speculate that the level of expression of thrombin receptors in intestinal epithelial cells is closer to physiological relevance than cancer intestinal epithelial cell lines, which are known to overexpress PARs (Darmoul, Gratio, Devaud, Lehy & Laburthe, 2003; Gratio, Walker, Lehy, Laburthe & Darmoul, 2009). Therefore, thrombin's effects on human intestinal organoid cultures could be considered as representative of physiological or pathophysiological effects.

Incubation of organoid cultures in the presence of thrombin concomitantly reduced the percentage of cystic structures and increased the percentage of releasing structures. The squamous shape of cells in cystic structures is indicative of early immature structures, which have not yet acquired the columnar cell shape characteristic of mature colonic epithelium. Our data thus suggest that thrombin is able to push organoid cultures towards a more mature phenotype. Although not significant, there was a trend towards an increased proportion of budding structures after thrombin exposure (Figure 2B), in agreement with a pro-maturation effect of thrombin. The low number of budding structures at 6-days of culture might explain this lack of significance for thrombin's effects. Interestingly, concomitant to the pro-maturation effect, increased apoptosis was observed in organoid cultures in response to thrombin exposure. This was evidenced both by an increased staining for caspase-3 activity (Figure 4) and by an increased number of releasing organoids: i.e. structures full of apoptotic cells that are expelled from the organoid (Figure 2B). Although thrombin could favor the acquisition of a more mature intestinal epithelium phenotype, overall thrombin did not favor organoid growth, as the size of cystic, columnar and releasing organoids was not modified by thrombin

exposure. On the contrary, thrombin reduced the diameter of budding organoid structures (Figure 2A). These structures are considered as the most mature organoid structures. Indeed, they present undifferentiated budding zones that correspond to the crypts and more differentiated zones at the top of those neo-formed crypts. The fact that thrombin exposure reduced the diameter of budding structures but not of cysts or columnar structures, could suggest that thrombin inhibits the proliferation of a specific population of progenitors present in the developing buds. Indeed, we observed that thrombin exposure reduced the number of proliferative cells. Interestingly, at the lowest dose of thrombin used (10 mU.ml^{-1} , the same dose that lowered the diameter of budding structures), the anti-proliferative effect of thrombin was dependent on PAR4 activation. This could suggest that PAR4 activation slows organoid growth by inhibiting proliferation. However, at a higher dose of thrombin (50 mU.ml^{-1}), which had no effect on budding structure diameters, proliferation was still inhibited, but this time by a mechanism involving PAR1 activation, and not PAR4 activation. This suggests that a compensatory mechanism might maintain the size of budding organoids in the presence of this high dose of thrombin, despite the anti-proliferative effects induced by PAR1 activation. In a previous study, we observed that PAR1-activating peptides increase the size of murine organoids in part by pushing differentiation processes (Nasri et al., 2016). This could constitute the compensatory mechanism maintaining the size of budding organoids exposed to high doses of thrombin. Taken together, these data provided evidence that thrombin has an anti-proliferative effect that involves both PAR1 and PAR4, but differentially depending on the dose of thrombin.

The same differential involvement of PAR1 and PAR4 was observed for the effects of thrombin on metabolic activity measured in organoid cultures. At low doses of thrombin, PAR4 activation seemed to be involved, while at higher doses of thrombin, PAR1 activation seemed to be responsible for thrombin's effects. It is well known that not the same concentrations of thrombin are required to activate PAR1 and PAR4 on platelets (Kahn et al., 1998; Ramachandran & Hollenberg, 2008). However, in contrast to our findings, higher concentrations of thrombin are necessary to activate PAR4 because of the lack of hirudin-like thrombin binding sequence on PAR4, while lower concentrations of thrombin are sufficient to activate PAR1, which possesses this binding sequence (Xu et al., 1998). This apparent contradiction could be explained by the forms of thrombin that are present in the culture. While we add to the organoid cultures alpha-thrombin re-suspended from lyophilized powder, this form of thrombin might not remain stable in organoid cultures, and depending on the presence of epithelial proteases, alpha-thrombin could be degraded to a certain extent in beta- and/or gamma-thrombin. Alpha-thrombin preferably binds and cleaves PAR1, but gamma-thrombin, is much less potent for PAR1, and more potent for PAR4 activation (Xu et al., 1998). Thus, depending on the concentration of thrombin we add, but also depending on the presence of thrombin-cleaving proteases in our culture conditions, different forms of thrombin at different concentrations could be present and activate differentially PAR1 and PAR4. Indeed, in previous studies, we have demonstrated that human intestinal epithelium is a major source of proteases (Motta et al., 2012; Motta et al., 2011; Rolland-Fourcade et al., 2017), and these proteases, if released by organoid cultures, could cleave thrombin. Another potential explanation could be the occurrence of crosstalks with other members of the PAR family. For instance, PAR3 has been shown to act as a co-factor for PAR4 activation (Nakanishi-Matsui, Zheng, Sulciner, Weiss, Ludeman & Coughlin, 2000). Depending on the expression of PAR3 together or not with PAR4 at the cell surface or intestinal epithelial cells, PAR1 or PAR4 activation might be favored. Although PAR2 is not considered as a thrombin receptor, recent work from the Hollenberg's laboratory has demonstrated that thrombin can signal through PAR2 (Mihara et al., 2016). We have previously shown that activated PAR2 strongly reduced the proliferation

of immature cells, although without inducing apoptosis or decreasing stem cell capacities in mouse cultured organoids (Nasri et al., 2016). Thus, PAR2 could be another player, activated at high concentrations of thrombin, interfering with proliferation and metabolic activity.

The most striking effect of thrombin on human colon organoid cultures was on the induction of apoptosis. Apoptosis is a physiological process in intestinal epithelium, where highly differentiated cells at the top of the crypt undergo apoptosis in order to be renewed. However, excess of apoptosis could be harmful to the mucosa, leading to an increased permeability and an increased presence of immature cells (Blander, 2016). It has been shown that IBD is associated with increased epithelial cell apoptosis and increased permeability, the aberrant epithelial cell death being responsible at least in part, for the delayed mucosal healing (Blander, 2016). Considering the high amounts of thrombin present in tissues from IBD patients, and the pro-apoptotic effects we observed for thrombin in human intestinal organoid cultures, it is plausible to think that in IBD patients, the presence of thrombin in the vicinity of the epithelium participates to the increased apoptosis. Further, we demonstrated that both PAR1 and PAR4 activation are involved in the mechanism of thrombin-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. In previous studies, we have demonstrated that PAR1 activation provoked an increased permeability due to aberrant apoptosis. This was demonstrated both *in vitro* in epithelial cancer cell line cultures and *in vivo* in a mouse model (Chin, Vergnolle, MacNaughton, Wallace, Hollenberg & Buret, 2003). The results from the present study definitively point to the possible same mechanism in non-transformed complex human epithelium, and add to the mechanism the possible involvement of PAR4.

CONCLUSIONS

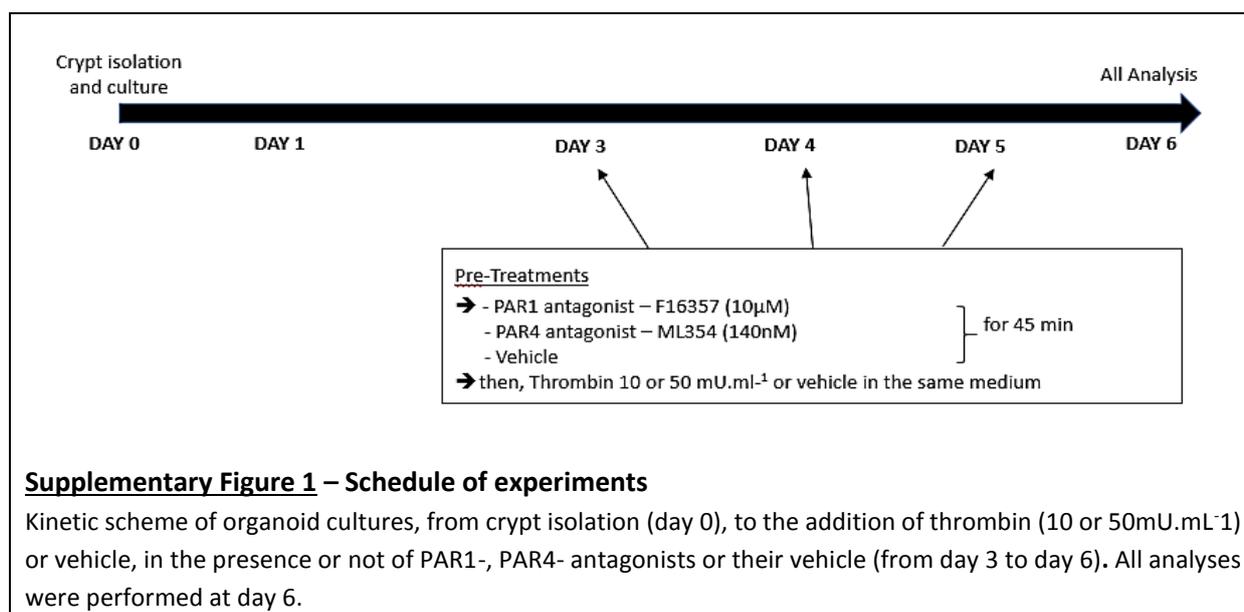
The present study demonstrated the multiple effects of thrombin in human intestinal epithelium, identifying PAR1 and PAR4 as important receptors mediating these effects. While the pharmacological approach used here suggests that the regulation of PAR1 and PAR4 activation by thrombin could be subtle in human intestinal epithelial cells, depending on the concentration of surrounding thrombin, all our data point to a detrimental effect for thrombin and its receptors on epithelial growth and potential healing. These findings seem particularly relevant in the context of IBD, where thrombin is largely present in the vicinity of epithelial cells, and suggest that thrombin inhibition, PAR1 and PAR4 blockade could constitute possible therapeutic intervention in IBD to favor epithelial regrowth and barrier function. Further studies would be necessary to investigate the effects of thrombin and PAR activation in organoid cultures from IBD patients.

Supplementary Data

Sexe	Age	Surgery	Treatments (drug classes)	SMOKER
Male	66	left colectomy	Serotonin reuptake inhibitors; proton pump inhibitors; Benzodiazepines; Angiotensin-2 receptor inhibitors; beta-blockers	no
Male	73	transverse colectomy	Anti-hypertensive; Statins; alpha-1 blockers, proton pump inhibitors, diuretics, ACE inhibitors; NSAIDs	yes
Female	89	right colectomy	Levothyroxine; Glucocorticoids	no
Female	60	right colectomy		NS
Male	64	rectum resection	Statins; Benzodiazepines; ACE inhibitors; Xanthine oxidase inhibitors	no

Supplementary Table 1: Characteristics and outcomes of control patients

(NS: not-specified; NSAIDs: non-steroidal anti-inflammatory drugs).



References

- Blander JM (2016). Death in the intestinal epithelium-basic biology and implications for inflammatory bowel disease. *FEBS J* 283: 2720-2730.
- Cenac N, Altier C, Motta JP, d'Aldebert E, Galeano S, Zamponi GW, *et al.* (2010). Potentiation of TRPV4 signalling by histamine and serotonin: an important mechanism for visceral hypersensitivity. *Gut* 59: 481-488.
- Chin AC, Vergnolle N, MacNaughton WK, Wallace JL, Hollenberg MD, & Buret AG (2003). Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11104-11109.
- Crespo M, Vilar E, Tsai SY, Chang K, Amin S, Srinivasan T, *et al.* (2017). Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. *Nat Med* 23: 878-884.
- Cruz-Acuna R, Quiros M, Farkas AE, Dedhia PH, Huang S, Siuda D, *et al.* (2017). Synthetic hydrogels for human intestinal organoid generation and colonic wound repair. *Nat Cell Biol* 19: 1326-1335.
- Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, & Laburthe M (2003). Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am J Pathol* 162: 1503-1513.
- de Jong E, Porte RJ, Knot EA, Verheijen JH, & Dees J (1989). Disturbed fibrinolysis in patients with inflammatory bowel disease. A study in blood plasma, colon mucosa, and faeces. *Gut* 30: 188-194.
- Fordham RP, Yui S, Hannan NR, Soendergaard C, Madgwick A, Schweiger PJ, *et al.* (2013). Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury. *Cell Stem Cell* 13: 734-744.
- Gobbetti T, Ducheix S, le Faouder P, Perez T, Riols F, Boue J, *et al.* (2015). Protective effects of n-6 fatty acids-enriched diet on intestinal ischaemia/reperfusion injury involve lipoxin A4 and its receptor. *Br J Pharmacol* 172: 910-923.
- Gratio V, Walker F, Lehy T, Laburthe M, & Darmoul D (2009). Aberrant expression of proteinase-activated receptor 4 promotes colon cancer cell proliferation through a persistent signaling that involves Src and ErbB-2 kinase. *Int J Cancer* 124: 1517-1525.
- Harmon JT, Tandon NN, Hoeg JM, & Jamieson GA (1986). Thrombin binding and response in platelets from patients with dyslipoproteinemias: increased stimulus-response coupling in type II hyperlipoproteinemia. *Blood* 68: 498-505.
- Iacucci M, & Ghosh S (2016). Mucosal Healing - How Deep Is Enough? *Dig Dis* 34: 160-164.
- Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, *et al.* (1998). A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394: 690-694.
- Mihara K, Ramachandran R, Saifeddine M, Hansen KK, Renaux B, Polley D, *et al.* (2016). Thrombin-Mediated Direct Activation of Proteinase-Activated Receptor-2: Another Target for Thrombin Signaling. *Mol Pharmacol* 89: 606-614.
- Monjotin N, Gillespie J, Farrie M, Le Grand B, Junquero D, & Vergnolle N (2016). F16357, a novel protease-activated receptor 1 antagonist, improves urodynamic parameters in a rat model of interstitial cystitis. *Br J Pharmacol* 173: 2224-2236.
- Morganti RP, Cardoso MH, Pereira FG, Lorand-Metze I, De Nucci G, Marcondes S, *et al.* (2010). Mechanisms underlying the inhibitory effects of lipopolysaccharide on human platelet adhesion. *Platelets* 21: 260-269.
- Motta JP, Bermudez-Humaran LG, Deraison C, Martin L, Rolland C, Rousset P, *et al.* (2012). Food-grade bacteria expressing elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis. *Sci Transl Med* 4: 158ra144.
- Motta JP, Magne L, Descamps D, Rolland C, Squarzoni-Dale C, Rousset P, *et al.* (2011). Modifying the protease, antiprotease pattern by elafin overexpression protects mice from colitis. *Gastroenterology* 140: 1272-1282.
- Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, & Coughlin SR (2000). PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 404: 609-613.

- Nasri I, Bonnet D, Zwarycz B, d'Aldebert E, Khou S, Mezghani-Jarraya R, *et al.* (2016). PAR2-dependent activation of GSK3beta regulates the survival of colon stem/progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 311: G221-236.
- Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, & Sundelin J (1994). Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9208-9212.
- Planty B, Pujol C, Lamothe M, Maraval C, Horn C, Le Grand B, *et al.* (2010). Exploration of a new series of PAR1 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 1735-1739.
- Ramachandran R, & Hollenberg MD (2008). Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S263-282.
- Rolland-Fourcade C, Denadai-Souza A, Cirillo C, Lopez C, Jaramillo JO, Desormeaux C, *et al.* (2017). Epithelial expression and function of trypsin-3 in irritable bowel syndrome. *Gut* 66: 1767-1778.
- Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, *et al.* (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141: 1762-1772.
- Senchenkova E, Seifert H, & Granger DN (2015). Hypercoagulability and Platelet Abnormalities in Inflammatory Bowel Disease. *Semin Thromb Hemost* 41: 582-589.
- Shah SC, Colombel JF, Sands BE, & Narula N (2016). Mucosal Healing Is Associated With Improved Long-term Outcomes of Patients With Ulcerative Colitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 14: 1245-1255 e1248.
- Wen W, Young SE, Duvernay MT, Schulte ML, Nance KD, Melancon BJ, *et al.* (2014). Substituted indoles as selective protease activated receptor 4 (PAR-4) antagonists: Discovery and SAR of ML354. *Bioorg Med Chem Lett* 24: 4708-4713.
- Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, *et al.* (1998). Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6642-6646.
- Young SE, Duvernay MT, Schulte ML, Nance KD, Melancon BJ, Engers J, *et al.* (2010). A Novel and Selective PAR4 Antagonist: ML354. In *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*. Bethesda (MD).

II/ Activité métabolique dans les organoïdes inflammatoires issus de côlon de patients atteints de MICI

A/ Introduction

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), comprenant la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), se caractérisent par une exacerbation de la réponse immunitaire engendrant une altération de la muqueuse intestinale avec notamment une perte de la fonction de barrière (Baumgart and Carding 2007). Les MICI possèdent une origine multifactorielle composée de facteurs génétiques, bactériens et environnementaux qui établissent l'inflammation chronique (Koutroubakis, Manousos et al. 1996). Les MICI altèrent fortement la qualité de vie des patients et les traitements actuels ne sont pas curatifs, mais contrôlent cependant les symptômes de la pathologie en traitant la phase de poussée inflammatoire ou en maintenant la phase de rémission (Pithadia and Jain 2011). Ainsi, si l'inflammation est à ce jour relativement bien contrôlée, il reste important de caractériser les altérations de l'épithélium intestinal, les conditions de sa réparation tant physique que fonctionnelle. Ceci afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques permettant notamment la régénération de cet épithélium.

Un modèle d'étude 3D *ex vivo*, nommé modèle organoïde, permet d'établir un épithélium intestinal fonctionnel à partir de cryptes isolées (Sato, Vries et al. 2009). Ainsi, les cryptes isolées, incluses en matrigel et cultivées grâce à un milieu riche en facteurs essentiels à l'auto-renouvellement et la prolifération des cellules souches présentes en fond de crypte, se referment et restaurent les lignages cellulaires de l'épithélium intestinal (Date and Sato 2015). À mon arrivée au sein du laboratoire, il avait été observé que les organoïdes issus de patients atteints de MICI présentaient une morphologie différente de celles des organoïdes issus de patients contrôles. En effet, dans les cultures d'organoïdes issus de patients atteints de MICI, il était observé une taille plus faible, moins de différenciation cellulaire et plus de cellules apoptotiques, et une majorité d'inversion de polarisation cellulaire.

Le but de ma contribution était de corrélérer le phénotype morphologique et fonctionnel des organoïdes issus de patients contrôles et issus de patients atteints de MICI avec l'activité métabolique. De plus, les effets pro-inflammatoires sur la culture d'organoïdes contrôles ont été évalués. Ainsi, les cryptes étaient isolées de la muqueuse de côlon de patients contrôles ou atteints de MICI et cultivées 9 à 12 jours. L'activité métabolique était analysée par l'utilisation d'un kit de suivi quantifiant l'ATP relargué dans le milieu de culture. Les effets d'un cocktail pro-inflammatoire étaient analysés sur les cultures d'organoïdes contrôles. Les mêmes types de structures après 9 à 12 jours de culture sont présentes quelle que soit l'origine (contrôle ou MICI) du tissu. Cependant, les organoïdes issus de patients atteints de MICI possédaient un phénotype inflammatoire avec une taille plus faible et une activité métabolique diminuée. En conclusion, l'imprégnation inflammatoire altère l'épithélium colique des patients atteints de MICI et peut être étudiée dans un modèle *ex vivo*, organoïde. Ce modèle représente un bon outil préclinique dans l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour la régénération de l'épithélium.

Les résultats présentés ci-après ont été générés dans le cadre de cette thèse, mais font partie d'un article de recherche présentant de nombreux autres résultats générés au laboratoire et soumis pour publication dans le journal 'Gastroenterology'. Cet article soumis est présenté en annexe.

B/ Méthodologie

Echantillon coliques humains

Les échantillons sont obtenus de patients suivis au CHU de Toulouse ayant donné leur consentement. Le comité d'éthique (#NCT01990716) a approuvé le protocole d'étude, pour les collections d'échantillons nommées 'MICILIP' et 'COLIC'. Les 'échantillons inflammatoires' sont obtenus à partir de résections ou de biopsies coliques de patients atteints de MICI, en zone non-inflammatoire. Les 'échantillons contrôles' proviennent de résections coliques macroscopiquement normales de patients atteints de cancer colorectal.

Isolement et culture de cryptes coliques

A partir des résections coliques de patients, les tissus sont ouverts longitudinalement et lavés avec du DPBS (Sigma-Aldrich #D8537). La muqueuse est décollée et incubée dans une solution d'antibiotiques et d'antifongique pendant 5 minutes à température ambiante (RT), 4 fois (Gentamicin Sigma-Aldrich # G1397, 50µg/mL; normocin InvivoGen #ANT-NR-1, 100µg/mL; fungizone Gibco #15290-018, 2,5µg/mL). La muqueuse est ensuite découpée en fragments de 2 mm incubés dans une solution filtrée de DTT à 10 mM (Roche #10197777001), 3 fois durant 5 minutes à RT puis transférés dans une solution d'EDTA à 8 mM (Ambion #L/N.1408029) et enfin mis sous agitation pendant 1h à 4°C. Le surnageant est ensuite remplacé par 10mL de DPBS. Les fragments sont agités fortement manuellement et le surnageant récupéré dans un falcon 15 mL et centrifugé pendant 2 min à 40g à 4°C. Le surnageant est alors éliminé et l'échantillon repris dans 10 mL de DMEM/F12 (Invitrogen #12634-010) supplémenté avec Glutamax-CTS (Invitrogen #A1286001, 200mM), Hepes (Gibco #15630-056, 1M) et 5% SVF, suivis d'une même centrifugation. Cette étape est répétée 2 fois. Les cryptes isolées sont ensuite comptées par goutte de 20µL et la quantité nécessaire reprise après centrifugation. La quantité de hES Matrigel froid (Corning #354277) est ajoutée au culot de cryptes. 10 µL de matrigel contenant 25 cryptes sont ensuiteensemencés dans chaque puits d'une plaque 96 puits (Ibidi, µ-angiogenesis). Après 20 minutes de polymérisation, le milieu de culture est ajouté (70 µL/puits), composé de ½ advanced DMEM/F12, supplémenté avec ½ Wnt3a reconditionné (surnageant de L Wnt-3A (ATCC® CRL-2647™), Glutamax-CTS, Hepes, serum-free B27 (Life Technologies #12587-010), N2 (Invitrogen #17502-048), N-acetylcysteine (NAC, Sigma #A9165-5G), nicotinamide (Sigma #N0636, 10mM), recombinant human epithelial growth factor (EGF, Gibco #PHG0314, 50ng/mL), human Noggin (tebu #120-10C, 100ng/mL), human R-Spondin (R&D #4645RS, 1µg/mL), gastrine (Sigma G9145, 10nM), SB202190 (Sigma 57067, 10µM), LY2157299 (Axon MedChem #1941, 0,5µM) et PGE2 (Sigma #P0409, 0,01µM). Les cultures sont placées dans un incubateur humidifié à 37°C et 5% CO₂. Le milieu est changé tous les 3 jours, sans NAC, ni LY215799.

Traitements

Lorsqu'indiqué, les cultures d'organoïdes 'contrôles' sont traitées avec un cocktail de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, TNF-α, à 10ng/mL - Peprotech) dès le 3^{ème} jour de culture et à chaque changement de milieu.

Suivi des cultures

Le lendemain de l'ensemencement des cryptes, l'évolution de la culture est suivie tous les 2 jours à l'aide d'un microscope Apotome (HXP120; Zeiss Axio-observer; x10 ; 0.45 NA).

Analyse de l'activité métabolique

Après 6 ou 9 jours de culture, CellTiter-Glo®3D reagent (Promega, France) était ajouté à chaque puits (volume 1 :1) et incubé 30 minutes à température ambiante, protégé de la lumière. Chaque condition était réalisée en triplicata. La luminescence était mesurée via un Varioskan Flash (Thermo Scientific) et les acquisitions de chacun des puits prises via l'apotome, permettaient d'évaluer l'aire occupée par tous les organoïdes dans un puits (Fiji). Les résultats étaient normalisés grâce à une courbe étalon d'ATP et étaient exprimés en concentration d'ATP extracellulaire sur l'aire totale des organoïdes.

Analyse statistique

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses étaient réalisées via GraphPad Prism 6 et les significativités statistiques déterminées par une analyse One-way Anova, test de Kruskal Wallis. La significativité était acceptée pour $P < 0,05$.

C/ Résultats

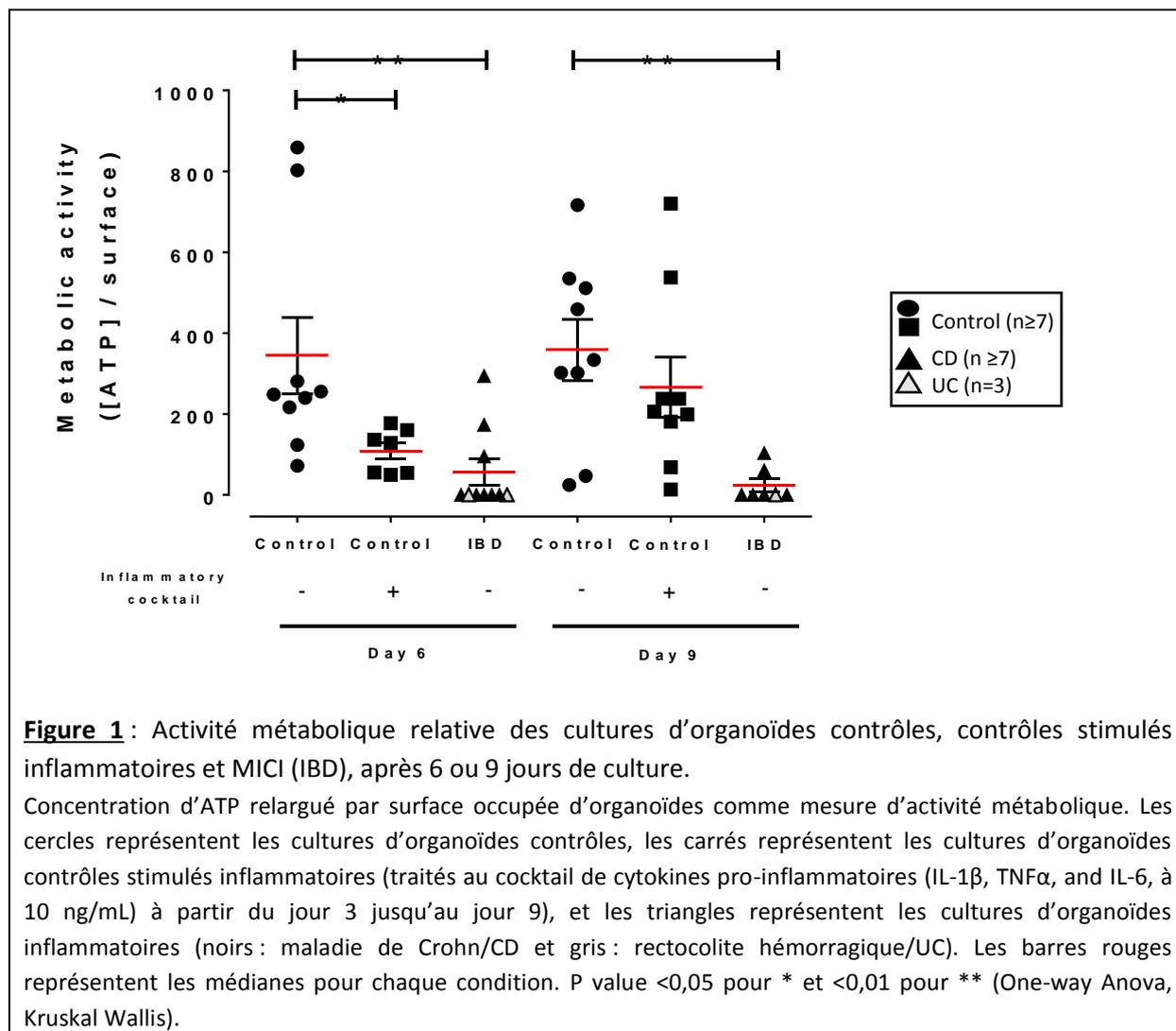
Les organoïdes issus de patients atteints de MICI présentent une diminution d'activité métabolique.

Au vu de la taille réduite des organoïdes issus de patients atteints de MICI comparés aux organoïdes contrôles et d'une différenciation moins prononcée (D'Aldebert et al., soumis à *Gastroenterology*), l'hypothèse était que les cellules épithéliales coliques présentaient une activité métabolique diminuée. Pour vérifier cela, l'activité métabolique des organoïdes a été analysée en dosant l'ATP (Adénosine TriPhosphate), source d'énergie quantifiable. Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus entre les puits et entre les conditions (contrôles, contrôles stimulés inflammatoires et MICI), le dosage de l'ATP devrait être normalisé selon le nombre de cellules présentes dans la culture. Or, la culture d'organoïdes est hétérogène, présentant des structures en 3D différentes (cystiques, columnaires, columnaires pseudo-stratifiés, colonoïdes et mixtes) avec une composition cellulaire différente et une activité métabolique potentiellement différente selon les types cellulaires. Pour ces raisons, une autre approche de normalisation a été choisie. En effet, l'approche consiste à déterminer l'aire occupée par les organoïdes dans chaque puits. Pour cela, grâce aux acquisitions prises par l'Apotome, une macro a été réalisée sur le logiciel Fiji à l'aide de l'ingénieur du plateau d'imagerie, afin d'obtenir une analyse reproductible et rapide. Cette macro détermine le contour du puits, l'aire totale du puits, applique un filtre Gaussian Blur (sigma = 200 et threshold = 137) et détermine l'aire totale des organoïdes du puits. Les résultats sont ainsi exprimés en un ratio de l'aire occupée par les organoïdes sur l'aire totale du puits. La normalisation du dosage de l'ATP se fait donc par ce ratio, et moyennée sur 3 puits. L'équation obtenue est :

$$x = [\text{ATP}] \times \frac{\text{aire des organoïdes d'un puits}}{\text{aire totale du puits}}$$

x est alors la valeur arbitraire d'ATP dans un puits.

Ainsi, les organoïdes issus de patients atteints de MICI présentent une activité métabolique nettement diminuée (facteur 3) comparés aux organoïdes contrôles, que ce soit après 6 ou 9 jours de culture (Figure 1). Ceci corrèle avec l'observation d'une taille réduite des organoïdes inflammatoires (voir article de recherche en annexe).



Le cocktail de cytokines pro-inflammatoires permet d'induire un phénotype inflammatoire pour des organoïdes contrôles.

Dans un deuxième temps, nous voulions savoir si des organoïdes contrôles cultivés dans des conditions inflammatoires pouvaient présenter un phénotype inflammatoire similaire aux organoïdes issus de patients atteints de MICI. Les organoïdes contrôles étaient alors stimulés pendant 1, 3 ou 6

jours avec un cocktail de cytokines pro-inflammatoires, composé de IL-1, TNF α and IL-6 (à 10 ng/mL chacun). Cette stimulation n'affectait en rien l'évolution de la culture en termes de différenciation. De plus, le traitement d'un jour, n'avait aucun effet sur le phénotype et l'activité métabolique (donnée non montrée). Toutefois, cette stimulation de 3 ou 6 jours, avait pour effet de réduire la taille des organoïdes, de diminuer le nombre de colonoïdes et d'augmenter le nombre d'organoïdes possédant une polarité inversée. L'activité métabolique analysée était bien réduite après 3 jours de stimulation (jour 6 de culture), mais n'était pas significative après 6 jours de stimulation (jour 9 de culture). Ces résultats suggèrent donc que les organoïdes contrôles mis en présence d'un cocktail de cytokines pro-inflammatoires durant 3 jours, présentent un même profil inflammatoire et ont les mêmes capacités de prolifération et de différenciation que les organoïdes issus de patients atteints de MICI. Le différentiel d'activité métabolique entre les organoïdes contrôles et les organoïdes inflammatoires, pourrait alors expliquer les différences morphologiques et fonctionnelles étudiées.

D/ Discussion

Cette étude apporte de nouvelles informations concernant la culture d'organoïdes inflammatoires issus de patients atteints de MICI. Tout d'abord les cryptes coliques issues de patients atteints de MICI ont la capacité de reformer un épithélium inflammatoire similaire à l'épithélium d'origine. Pour rappel, les résections étaient prélevées à distance de la zone inflammatoire, afin d'isoler de façon reproductible des cryptes entières et intactes (d'autant que les cryptes isolées de zone inflammatoire parviennent difficilement à se refermer et à former des organoïdes ensuite). Ceci suggère que les cryptes isolées aient été imprégnées par le contexte inflammatoire *in vivo*, induisant des modifications épigénétiques conservées dans la culture d'organoïdes. En effet, de telles modifications ont été retrouvées dans des tissus de patients atteints de MICI (Kellermayer 2012, McGovern, Kugathasan et al. 2015). Une autre explication serait que les cellules souches elles-mêmes participeraient au contexte inflammatoire, avec une expression différentielle de certains gènes impliqués dans la fonction de barrière, de capacité antimicrobienne, de production de mucus et de fonction de transport d'eau, retrouvée dans des cultures d'organoïdes issus de patients atteints de RCH (Dotti, Mora-Buch et al. 2016). De plus, l'expression de MUC2, gène responsable de la production de mucus, est altérée dans les organoïdes issus de patients atteints de MICI et plus particulièrement des MC, comparés aux organoïdes contrôles (Noben, Verstockt et al. 2017). Ces données confirment l'imprégnation inflammatoire au long-terme contribuant au développement et au maintien de la pathologie. Une autre explication serait que les mutations génétiques impliquées dans l'organisation épithéliale participent à l'altération du phénotype de l'épithélium colique. Ceci est suggéré par la diminution de l'expression de protéines de jonctions observée dans les organoïdes MICI (donnée non montrée). En effet, des études ont identifié plus de 200 loci affectés et associés aux MICI impliqués dans la réponse immunitaire innée, la phagocytose et l'autophagie, mais également la fonction de barrière épithéliale (Liu, van Sommeren et al. 2015, Prager, Buettner et al. 2015). Par exemple, le gène OSMR codant pour le récepteur Oncostatine M, favorise la prolifération cellulaire. Cependant, il est connu pour être muté chez les patients atteints de MICI, ce qui expliquerait une taille plus faible des organoïdes issus de ces patients comparés aux organoïdes contrôles (Beigel, Friedrich et al. 2014, Bianco, Girardelli et al. 2015). Des études supplémentaires devront être réalisées afin de mettre en

évidence le polymorphisme génétique associé aux MICI, selon le phénotype observé des cultures d'organoïdes.

D'autre part, concernant la baisse significative d'activité métabolique (d'un facteur 3) au sein des organoïdes inflammatoires comparés aux organoïdes contrôles, l'explication serait qu'il y ait bien moins de cellules dans les cultures d'organoïdes inflammatoires à cause d'une mortalité et donc moins d'ATP relargué. Cependant, au vu de la taille des organoïdes inflammatoires, comparés aux organoïdes contrôles (environ 380 µm et 300 µm respectivement), les organoïdes inflammatoires ne possèdent pas trois fois moins de cellules que les organoïdes contrôles, pouvant expliquer la diminution du relargage d'ATP, caractéristique d'une activité métabolique diminuée. L'explication envisagée serait que les cellules épithéliales réagissent face au stress inflammatoire en résistant au processus d'apoptose et en diminuant son processus de prolifération. En effet, il est également établi que la dérégulation de la balance ATP/AMP au profit de l'AMP, active l'AMPK (AMP-activated protein Kinase) par inhibition de sa déphosphorylation (alors que l'ATP promeut sa déphosphorylation) (Oakhill, Steel et al. 2011, Hardie, Ross et al. 2012). Ainsi, face à un stress énergétique, l'AMPK inhibe les processus métaboliques et favorise la résistance à l'apoptose. Une autre étude a mis en évidence le rôle des cellules apoptotiques dans la régulation de la prolifération des cellules voisines via un changement métabolique. A partir de cellules épithéliales de tubules proximaux de rein (PTEC), les cellules apoptotiques activent l'AMPK des cellules adjacentes, sans affecter la balance ATP/AMP. Ceci a pour conséquence de diminuer l'activité ribosomale et d'inhiber la croissance cellulaire de ces cellules viables. Ainsi, les cellules apoptotiques permettraient aux cellules viables de faire face au stress local (Patel, Massenburg et al. 2015). Dans notre étude, le relargage d'ATP est significativement diminué et induirait l'activation de l'AMPK. Or, au regard de la précédente étude décrite, l'AMPK aurait un effet positif sur la résistance à l'apoptose (sans modification métabolique). Il est donc possible de penser que la dérégulation de la balance ATP/AMP et les signaux apoptotiques des cellules adjacentes, déclencheraient simultanément une résistance à l'apoptose, mais ceci reste à être étudié.

E/ Conclusion

Cette étude a permis de démontrer que des organoïdes contrôles soumis à des conditions inflammatoires pouvaient acquérir un phénotype inflammatoire et présenter les mêmes caractéristiques que les organoïdes issus de patients atteints de MICI (réduction de la taille, polarité inversée, moins de colonoïdes, diminution d'expression de protéines de jonctions et réduction de l'activité métabolique). Ce modèle d'étude d'organoïdes stimulés apparaît comme un nouvel outil pour mieux comprendre la régulation génique épithéliale et la pathophysiologie, et pourrait être utilisé pour des approches thérapeutiques. En effet, cet aspect est supporté par une récente étude ayant créé et utilisé une bio-banque d'organoïdes coliques tumoraux issus de patients, qui ont été caractérisés par séquençage du génome entier et pour lesquels des combinaisons de traitements ont été proposés (Pauli, Hopkins et al. 2017). Pour conclure, la caractérisation des organoïdes contrôles et des organoïdes issus de patients atteints de MICI permet de proposer un nouveau modèle d'étude dans la compréhension des altérations épithéliales, ainsi que dans l'approche thérapeutique ciblant la régénération de l'épithélium intestinal.

III/ Développement d'une analyse par High Content Screening (HCS) appliquée au modèle *ex vivo* organoïde

A/ Introduction

Les lignées cellulaires cultivées en monocouches (2D) sont couramment utilisées afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques et découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Leur utilisation, simple et peu coûteuse, a contribué au développement de différentes drogues comme par exemple, les inhibiteurs de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) proposés dans le traitement des cancers du poumon (Lynch, Bell et al. 2004), ou encore un inhibiteur de B-raf utilisé dans le traitement des mélanomes (Chapman, Hauschild et al. 2011). Cependant, les lignées cellulaires ne reflètent pas l'architecture et l'hétérogénéité tissulaire et/ou tumorale rencontrées *in vivo*, et acquièrent des mutations au cours des nombreux passages en culture.

Les cultures organotypiques en trois dimensions (3D) permettent de reconstituer l'intégralité de l'épithélium fonctionnel grâce aux capacités d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules souches issues de cet épithélium ou tissu, représentant donc un modèle plus relevant. Concernant l'intestin, les premiers organoïdes, décrits dans les chapitres précédents (chapitre IV, page 69), ont été générés par l'équipe de Hans Clevers en 2009 (Sato, Vries et al. 2009). Ce modèle a récemment fait l'objet d'études pharmacologiques dans le but d'applications thérapeutiques pour les pathologies coliques. Par exemple, un modèle de fibrose cystique (ou mucoviscidose) a été développé à partir d'organoïdes issus de tissus de patients présentant la mutation du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) (Dekkers, Wiegerinck et al. 2013). Ce modèle a permis de mettre en évidence des modulateurs de ces canaux ioniques (ions chlore) épithéliaux, comme cibles thérapeutiques dans la mucoviscidose.

Les récentes avancées technologiques en microscopie et en informatique ont permis de développer des techniques d'analyses d'images appelées **HCS (High-Content Screening)**. Les approches de HCS permettent, à partir d'images acquises en lumière transmise de cultures ou après marquage des protéines ou organites d'intérêt, la mesure simultanée de **plusieurs paramètres moléculaires et cellulaires**, de **les analyser et de les stocker**. Elles apportent des informations dans un contexte cellulaire fonctionnel qui apparaît plus prédictif que les données biochimiques classiques. Ces techniques sont basées sur une **microscopie automatisée à haute résolution** (confocale), couplée à une **analyse d'images multiparamétrique** permettant d'obtenir des **données quantitatives** sur les changements phénotypiques d'une population cellulaire ou la localisation ou l'activation d'une protéine d'intérêt, par exemple. Les techniques HCS permettent donc également des études pharmacologiques favorisant l'identification de protéines ou d'autres biomarqueurs, altérant le phénotype cellulaire dans un contexte pathophysiologique. Cependant, ces techniques sont jusqu'à maintenant principalement développées pour l'analyse de monocouches cellulaires 2D et sont encore peu utilisées pour l'analyse des cultures en 3D. Quelques études rapportent des analyses HCS sur des sphéroïdes (Wenzel, Riefke et al. 2014, Sirenko, Mitlo et al. 2015). Les sphéroïdes sont à différencier des organoïdes, puisqu'il s'agit d'amas cellulaires mesurant moins de 100 µm de diamètre, ne représentant pas l'architecture tissulaire et/ou tumorale *in vivo* et principalement établis à partir de lignées cellulaires tumorales (Kunz-Schughart, Freyer et al. 2004). Ils sont principalement utilisés pour étudier l'hypoxie tumorale et la pénétrance de la réponse aux drogues. En se basant sur ces cultures de sphéroïdes, une équipe a comparé différentes approches d'imagerie automatisée (confocal ou non-confocal) et leurs solutions d'analyses pour suivre la croissance des sphéroïdes. Les auteurs ont alors optimisé un protocole de suivi pour confirmer l'utilisation de molécules anti-tumorales, telles que

l'inhibiteur de la DNA topoisomerase I, la camptothecine, ou l'inhibiteur de MEK, PD0325901 (Krausz, de Hoogt et al. 2013). Une seconde étude présentait pour la 1^{ère} fois l'utilisation de HCS par immunomarquage, basée sur des sphéroïdes tumoraux afin d'identifier des molécules anti-tumorales induisant la mort cellulaire au cœur du sphéroïde (Wenzel, Riefke et al. 2014). Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'utilité des approches HCS sur des modèles 3D pour les tests pharmacologiques. Une 3^{ème} étude est apparue sur le développement d'une approche HCS afin de quantifier des changements phénotypiques de sphéroïdes (issus de lignées humaines de côlon), en réponse à des traitements anti-tumoraux dans des plaques de 96 et 384 puits. Dans cette étude, des algorithmes multiparamétriques d'analyses ont été développés afin de suivre la forme et la taille des sphéroïdes mais également la survie et l'apoptose cellulaire de ces structures. Grâce à cela, 119 molécules anti-tumorales ont pu être analysées sur ce modèle 3D (Sirenko, Mitlo et al. 2015).

Au vu des avantages qu'offre la culture d'organoïdes issus de patients pour les applications thérapeutiques, un objectif de notre institut est d'appliquer des analyses HCS sur les cultures d'organoïdes colorectaux issus de tissus sains, inflammatoires ou tumoraux afin de mieux comprendre la physiopathologie de l'épithélium intestinal et, dans un second temps, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et d'en tester les effets pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et le cancer colorectal. En effet, à l'heure actuelle, les différentes études phénotypiques réalisées sur les organoïdes intestinaux utilisent la microscopie en lumière blanche à champ large ou confocale, après marquages immunofluorescents. Cependant, cette approche est chronophage au vu de la faible vitesse d'acquisition des microscopes conventionnels couplée à une analyse manuelle. De plus, cette dernière est très dépendante de l'expérimentateur.

Durant ma thèse, j'ai participé à la mise en place de l'approche de HCS sur les cultures d'organoïdes colorectaux en mettant au point les conditions de culture permettant d'acquérir des images répondant aux critères prérequis pour une analyse par HCS, notamment une homogénéité d'arrière-plan sur l'ensemble de l'image, et en testant différents appareils d'HCS.

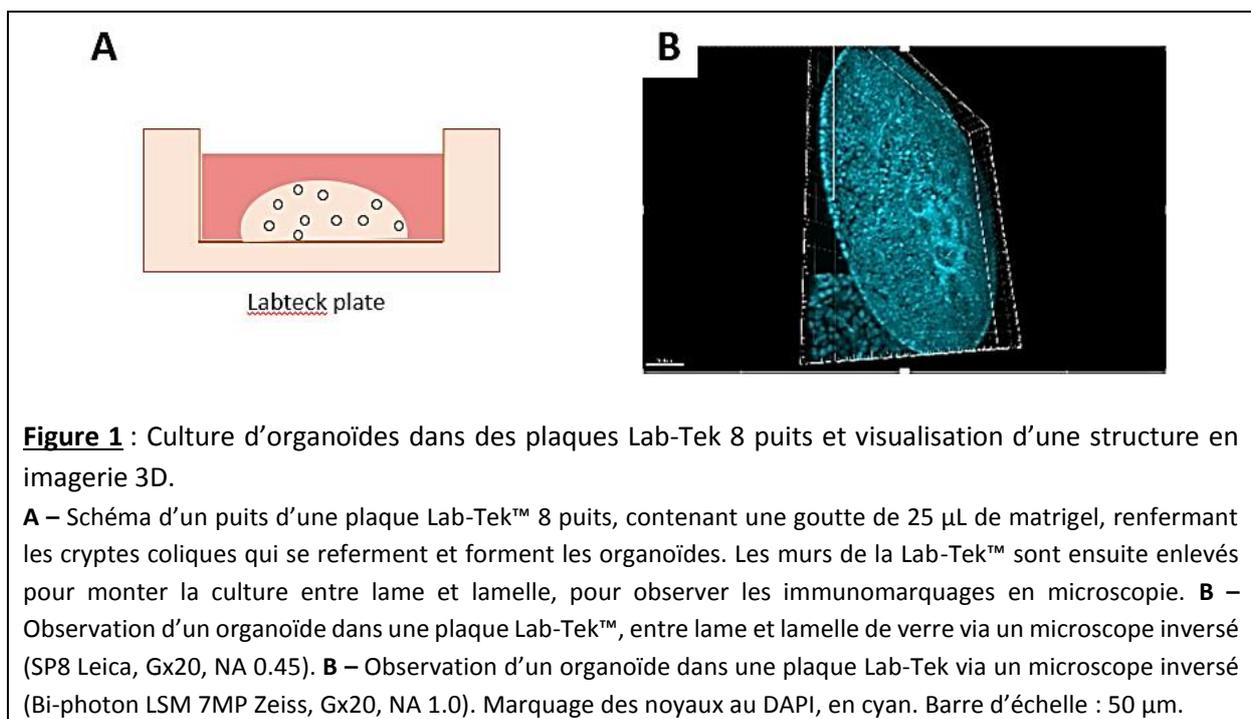
B/ Méthodologie et résultats

1) Réadaptation des conditions de culture d'organoïdes pour leur analyse en HCS

Comme mentionné précédemment, la culture du modèle organoïde est hétérogène et se compose de plusieurs structures, distinguable en 4 classes, les structures cystiques ou colonosphères, les structures colonnaires, les structures apoptotiques et les colonoïdes. L'évolution de cette culture d'organoïdes de côlon humain et plus particulièrement le processus d'auto-renouvellement et de différenciation n'ont jusqu'alors pas été caractérisés. Afin de caractériser ce modèle *ex vivo* et de l'utiliser en thérapeutique, l'utilisation de microscope automatisé et d'analyses robustes associées sont primordiaux. Cependant, il fallait tout d'abord optimiser les conditions de culture en ce sens.

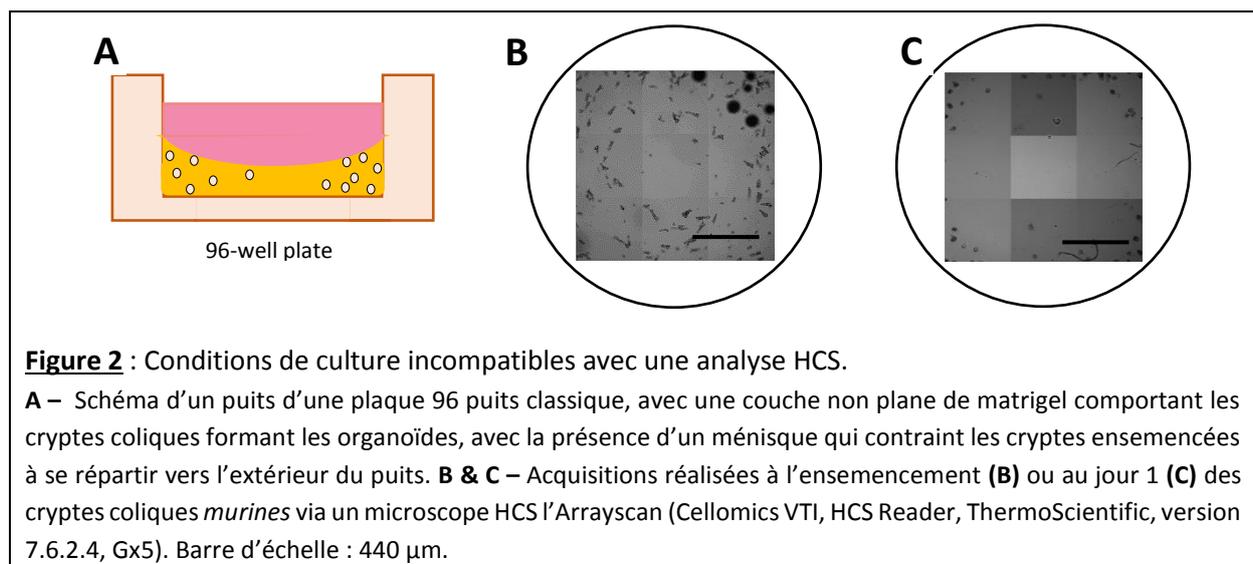
a) Conditions de culture précédentes

A mon arrivée au laboratoire, les cultures d'organoïdes étaient établies dans des plaques Lab-Tek™ de 8 puits compatibles avec l'imagerie classique (Figure 1, A). Il s'agit de plaques de culture dont le couvercle et les bords peuvent être retirés pour ne garder que le fond lamelle. La goutte de 25 μL de matrigel comprenant une vingtaine de structures, possédait une épaisseur de 2 mm environ, il était alors nécessaire d'appliquer une lamelle sur le matrigel pour monter la culture entre lame et lamelle pour pouvoir l'observer en microscopie inversée. L'application de la lamelle entraînait un aplatissement plus ou moins important des structures et rendait donc l'analyse des morphologies des organoïdes plus difficile et moins conforme à la réalité physique des structures (Figure 1, B).



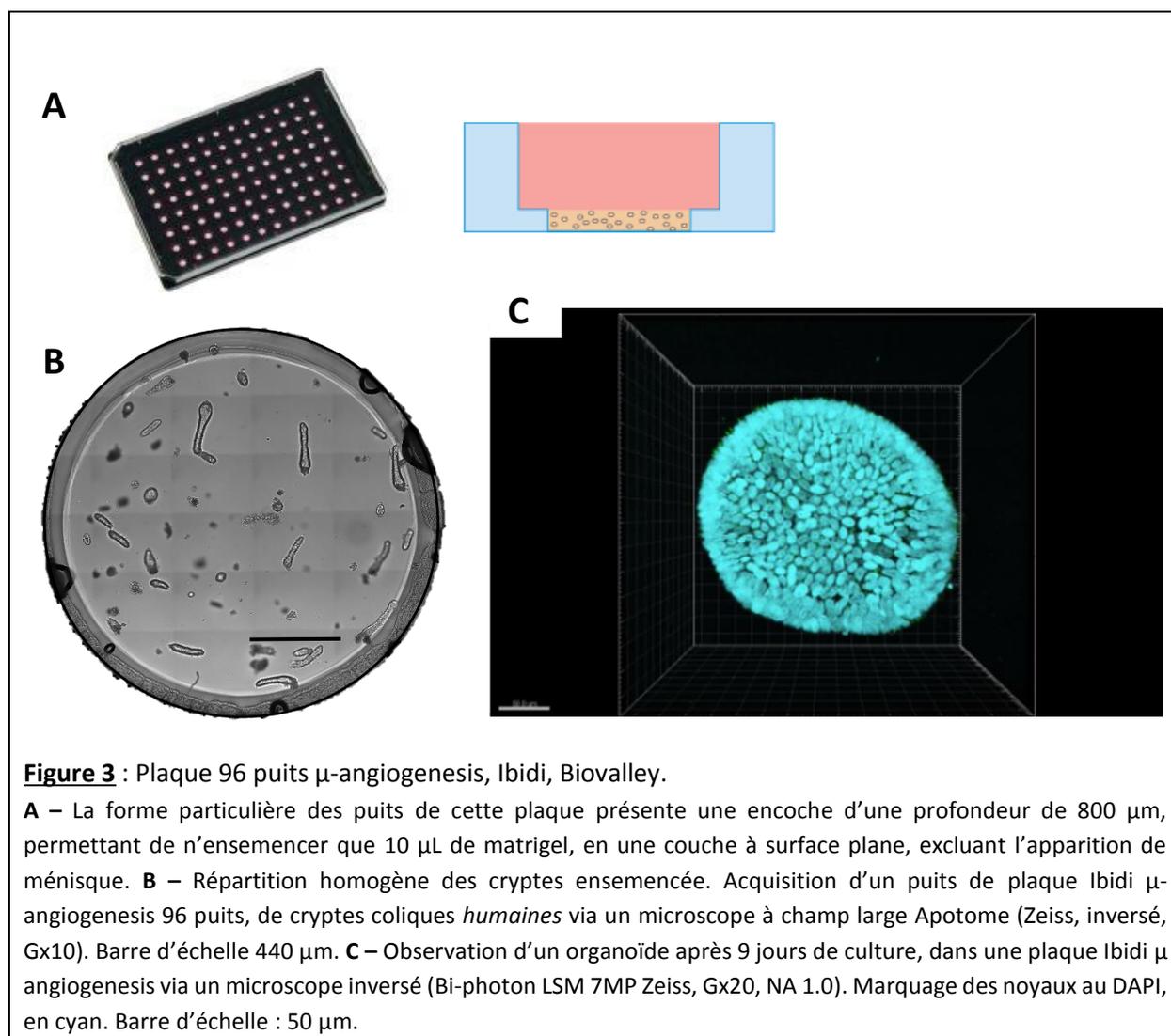
De plus, dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques à haut débit à partir du modèle organoïde de côlon humain, la culture devait être réalisée dans des plaques 96 puits. Pour cela, plusieurs tests ont été réalisés, avec un volume de matrigel plus ou moins important allant de 10 μL à 60 μL contenant 20 à 180 cryptes, par puits d'une plaque 96 puits classique (Greiner, #655090), avec 150 μL de milieu de culture ajoutés. Le fait d'ensemencer une couche de matrigel au fond du puits, engendrait la formation d'un ménisque concentrant les cryptes sur les bords du puits de façon concentrique (Figure 2, A&B). Ceci entraînait un problème de focus pour l'acquisition du puits en plusieurs champs. En effet, la surface du matrigel n'étant pas plane, un même focus ne pouvait être satisfaisant pour tous les champs d'un même puits et au sein même des champs périphériques (Figure 2, B) ce qui engendrait des distorsions lors de la reconstitution de l'image du puits entier. D'autre part, le ménisque pouvait également entraîner des variations de niveaux de gris d'arrière-plan ce qui peut induire des biais et des difficultés d'analyse par HCS, les programmes d'analyses par HCS étant basés entre autre sur l'analyse des intensités de niveaux de gris au sein des images (Figure 2, C).

D'autre part, les plaques 96 puits classiques utilisées sont transparentes et ne possèdent pas de fond lamelle compatible avec l'utilisation de microscopes inversés (permettant la caractérisation de la culture en lumière transmise ou en fluorescence).



b) Conditions de culture optimisées actuelles

Afin d'avoir des conditions de culture compatibles avec une analyse HCS, l'utilisation de plaque 96 puits μ -angiogenesis Ibidi™ (Biovalley, #89646) a été adoptée (Figure 3). Ces plaques possèdent un fond lamelle en polymère d'indice de réfraction similaire à celui du verre (respectivement 1,52 et 1,523) et ayant une épaisseur de 180 μm , adaptée à l'imagerie. Concernant l'ensemencement des cryptes dans ces puits, une couche plane de seulement 10 μL de matrigel est ensemencée et évite ainsi la présence de ménisque et permet une répartition homogène des cryptes dans le matrigel (Figure 3, A, B). De plus, le fond lamelle permet de visualiser les organoïdes via un microscope confocal inversé, sans altérer leur structure 3D (Figure 3, C).



Une seconde étape a été de s’assurer que cette nouvelle plaque de culture n’altérait en rien l’évolution de la culture d’organoïdes (Figure 4). Pour cela, j’ai comparé l’évolution de la culture d’organoïdes sur 9 jours selon la quantité de matrigel et la plaque de culture utilisées, en analysant la croissance de ces structures via le logiciel Fiji, après avoir fait des acquisitions via l’Apotome. Comme mentionné précédemment, les plaques 8 puits Lab-Tek™ étaient utilisées au sein du laboratoire, en déposant une goutte de 25 µL de matrigel contenant 50 cryptes. J’ai donc comparé la culture des organoïdes dans cette plaque, mais aussi avec une goutte de 10 µL de matrigel contenant 20 cryptes, avec la culture d’organoïdes dans une couche de 10 µL de matrigel dans une plaque 96 puits Ibidi™. Ainsi, aucune différence statistique n’a été observée sur la croissance des organoïdes selon la plaque utilisée.

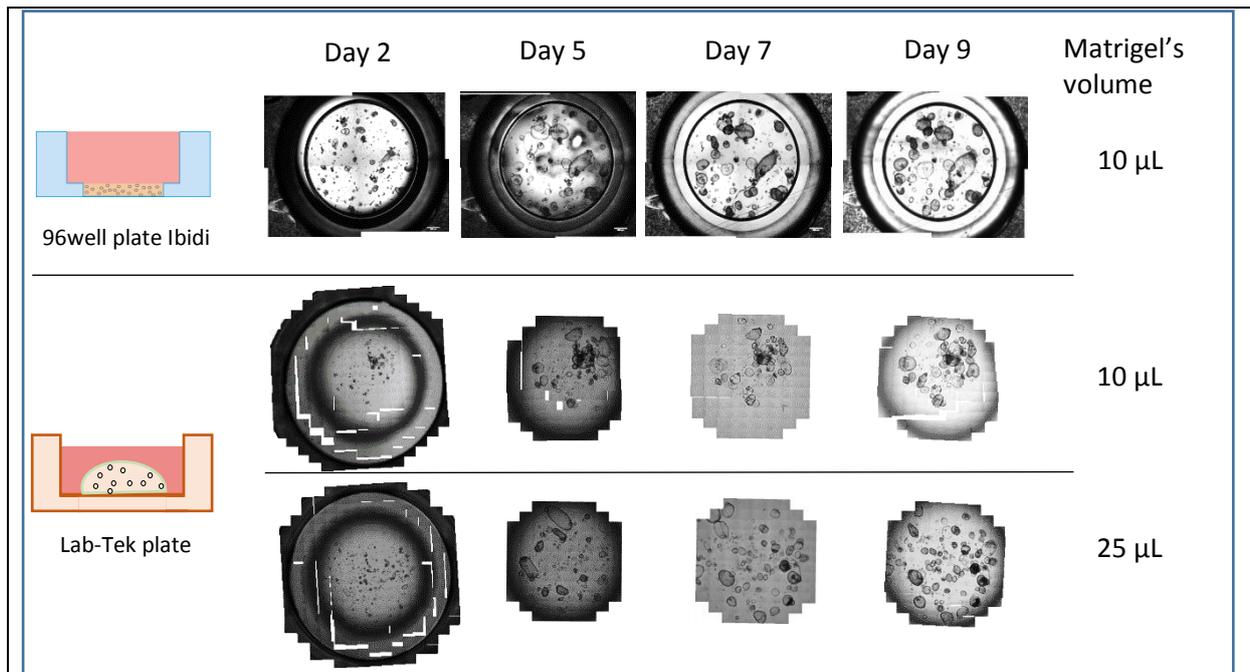


Figure 4 : Comparaison de l'évolution de la culture d'organoïde sur 9 jours selon la plaque utilisée et le volume de matrigel déposé.

La croissance des organoïdes a été analysée sur 9 jours de culture, dans une plaque 96 puits Ibidi avec une couche plane de 10 µL de matrigel, ou dans une plaque 8 puits Lab-Tek avec une goutte de 10 ou 25 µL de matrigel. Acquisitions via un microscope à champ large Apotome (Zeiss, inversé). Barre d'échelle : 100 µm.

2) Suivi de la culture d'organoïdes

Dans l'optique d'une approche à haut débit pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, il était nécessaire d'utiliser des kits de suivi de viabilité/prolifération et d'apoptose pour évaluer les effets de ces read-outs sur le modèle organoïde. Pour cela, j'ai recherché des kits conçus spécifiquement pour être utilisés sur des cultures 3D, capables de traverser la couche de matrigel et d'atteindre les organoïdes.

a) Suivi de la viabilité

Concernant la viabilité cellulaire des organoïdes, j'ai testé deux kits, l'ApoSENSOR™ Cell Viability kit (#ALX-850-247, Enzo) et le CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (#G968A, Promega), proposant tous deux le même principe. Ces kits reposent sur la quantification d'ATP relargué par les cellules, qui au contact de la luciférine et de l'enzyme luciférase apportées par le kit, génère un signal luminescent (Figure 5, A). Cette luminescence est proportionnelle à la quantité d'ATP relarguée dans le milieu de culture et ainsi, à l'activité métabolique cellulaire. Après avoir testé ces kits sur des cultures d'organoïdes issus de patients contrôles, il s'est avéré que le kit ApoSENSOR™ n'était pas capable de pénétrer dans le matrigel et d'atteindre les organoïdes, puisque je ne quantifiais pas du tout d'ATP dans les cultures (Figure 5, B - kit2), comparé à ce qui était quantifié avec le second kit CellTiter-Glo® 3D (Figure 5, B - kit 1) (dont les résultats corrélaient avec la survie des organoïdes, présentés dans la

partie II des études expérimentales de ce manuscrit, page 109).

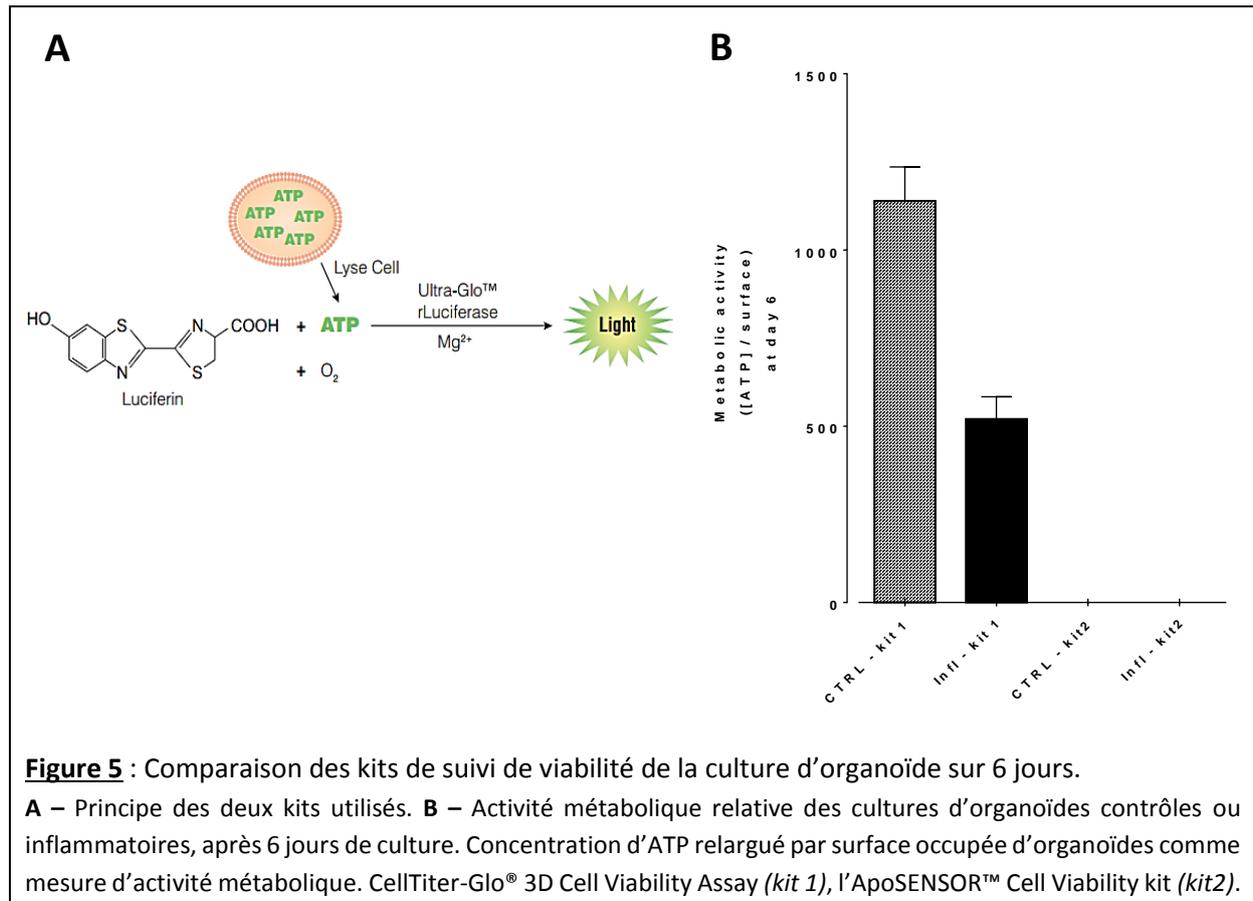
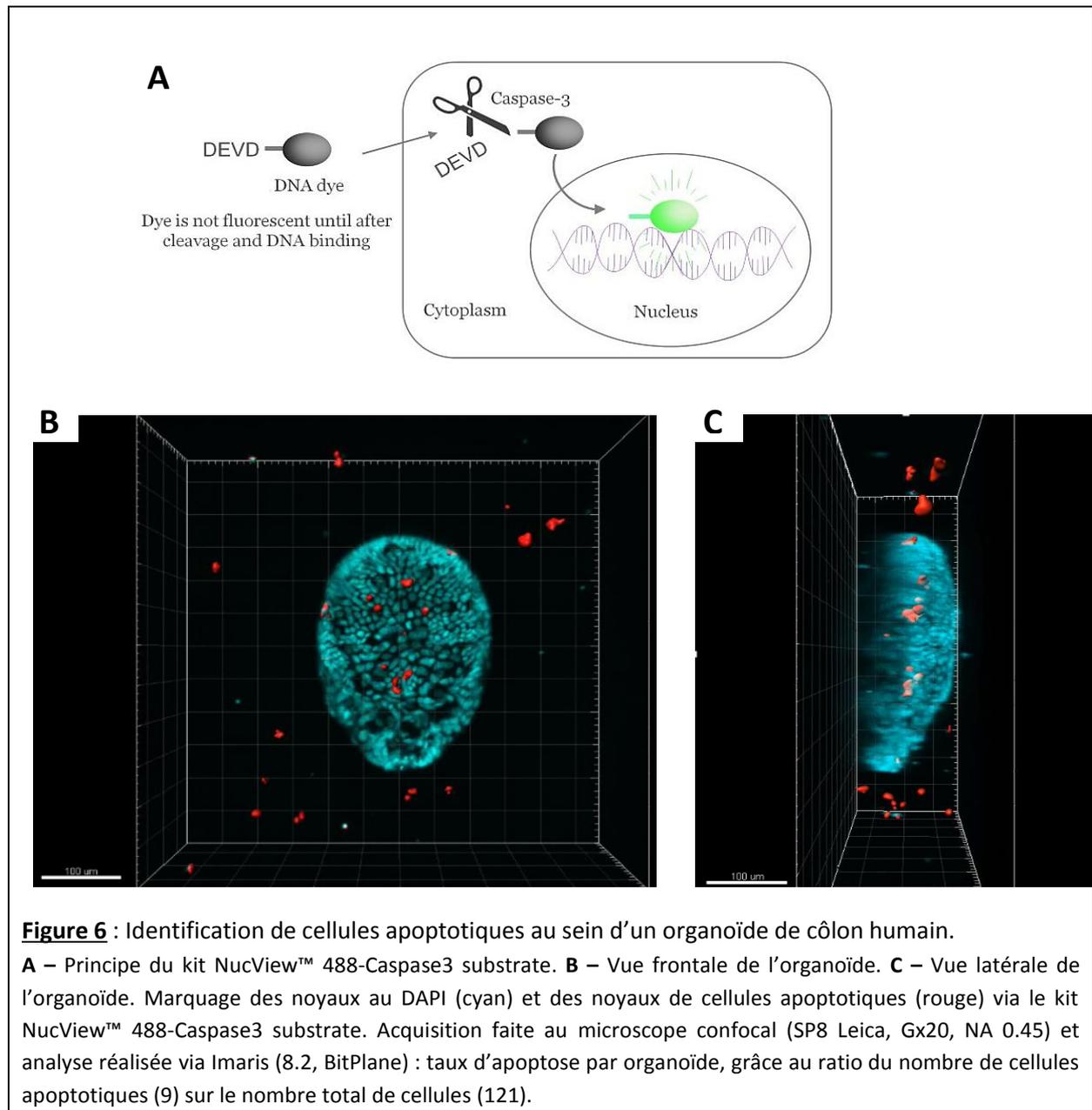


Figure 5 : Comparaison des kits de suivi de viabilité de la culture d'organoïde sur 6 jours.

A – Principe des deux kits utilisés. **B** – Activité métabolique relative des cultures d'organoïdes contrôles ou inflammatoires, après 6 jours de culture. Concentration d'ATP relargué par surface occupée d'organoïdes comme mesure d'activité métabolique. CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (*kit 1*), l'ApoSENSOR™ Cell Viability kit (*kit 2*).

b) Suivi de l'apoptose

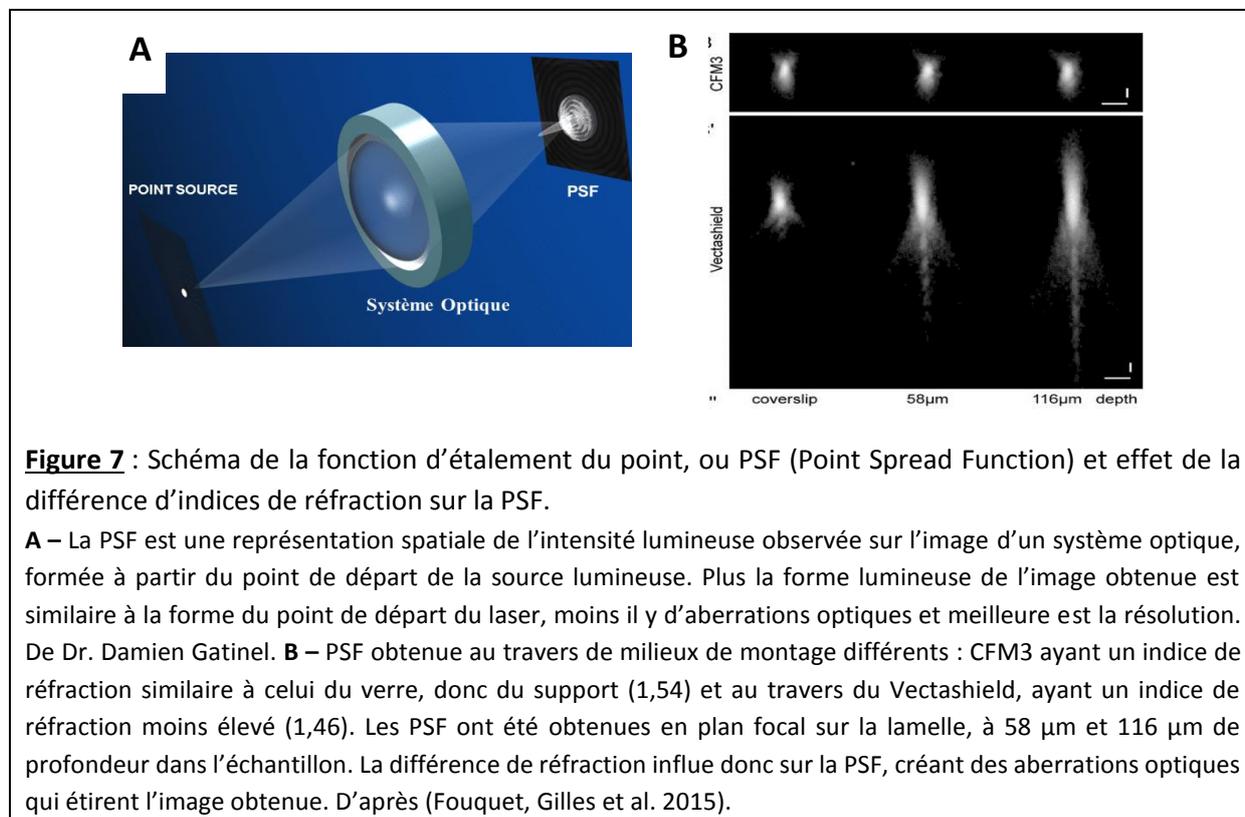
Concernant l'apoptose au sein des organoïdes, celle-ci fut analysée via le kit NucView™ 488-Caspase3 substrate. Il s'agit d'une sonde possédant deux parties distinctes, la 1^{ère} reconnaît la caspase 3 activée (médiateur du processus apoptotique) qui déclenche le clivage de la 2^{nde} partie qui transloque jusqu'au noyau, lie l'ADN et émet un signal fluorescent à 504 nm de longueur d'onde (Figure 6, A). Chaque cellule apoptotique est identifiée par fluorescence au sein des organoïdes, analysée grâce à l'utilisation du logiciel de reconstruction 3D, Imaris (8.2, BitPlane) (Figure 6, B et C). Ainsi, grâce à un masque de surface, les cellules apoptotiques sont identifiées en rouge et un ratio peut être calculé sur le nombre total de cellules présent dans chaque structure (dont le noyau était marqué au DAPI).



Enfin, je me suis questionnée sur un dernier point technique concernant l'utilisation des plaques Ibidi et du milieu de montage à utiliser pour analyser la différenciation des structures, notamment, par des marquages immuno-fluorescents observés en microscopie confocale. En effet, le milieu de montage permet de conserver sur le long-terme les cultures cellulaires dans un état fixé, de préserver les marquages immuno-fluorescents et d'en réduire le 'photobleaching' (ou photoblanchiment, qui consiste en la destruction irréversible du fluorochrome au contact de la lumière). Il est à noter que le milieu de montage utilisé doit posséder un indice de réfraction proche de celui du support dans lequel se trouve l'échantillon, afin d'éviter les distorsions de l'image finale obtenue de l'échantillon. Pour vérifier l'absence ou la présence de distorsions induits par une différence d'indices de réfraction entre le fond lamelle et le milieu de montage, il faut regarder la fonction d'étalement du point (ou PSF – Point Spread Function), qui est une représentation spatiale de l'intensité lumineuse observée sur l'image d'un système optique, formée à partir du point de départ

de la source lumineuse. En d'autres termes, la forme lumineuse obtenue sur l'image doit être équivalente à la forme du point de départ du laser (Fouquet, Gilles et al. 2015). La PSF permet de mettre en évidence les aberrations optiques issues du système optique ou de l'échantillon (Figure 7, A et B). Si le milieu de montage possède un indice de réfraction différent de celui de l'échantillon, les aberrations optiques seront présentes et la PSF distordue, et accentuées dans la profondeur de l'échantillon (Figure 7, B, avec l'exemple du Vectashield sur du verre, dont les indices de réfraction respectives sont de 1,46 et 1,52).

Concernant mes conditions de culture, l'indice de réfraction du fond lamelle est de 1,54 et celle du matrigel est de 1,34. Dans l'idéal, il fallait donc que j'utilise un milieu de montage ayant un indice de réfraction proche de celui du matrigel, était donné qu'il y aurait des aberrations optiques dues à la différence d'indice de réfraction entre le fond lamelle et le matrigel. Après avoir effectué une recherche bibliographique, les cultures de sphéroïdes étaient préférentiellement montées dans un milieu Vectashield ou Prolong Gold. J'ai donc utilisé ces deux milieux de montage, le Vectashield (indice de réfraction 1,475) et le Prolong Gold (indice de réfraction 1,42). Le Prolong Gold possède un agent anti-photoblanchiment et les échantillons montés avec ce dernier peuvent être stockés plusieurs mois à 4°C, alors que le Vectashield s'évapore après plusieurs semaines à 4°C et doit être stocké à -20°C sur le long-terme. Ceci s'explique par le fait que le Prolong Gold se polymérise, contrairement au Vectashield. J'ai d'abord opté pour l'utilisation du Prolong Gold. Cependant, en fonction du lot de matrigel utilisé, le Prolong Gold se polymérise autour des structures et engendre une auto-fluorescence du halo dans tous les canaux. J'ai donc ensuite utilisé le Vectashield. Dans l'idéal, il faudrait utiliser des objectifs à immersion à eau pour l'observation au microscope confocal des organoïdes dans le matrigel, ce qui réduirait les aberrations optiques et permettrait de réduire la distorsion axiale de l'image de l'organoïde reconstruit en 3D.

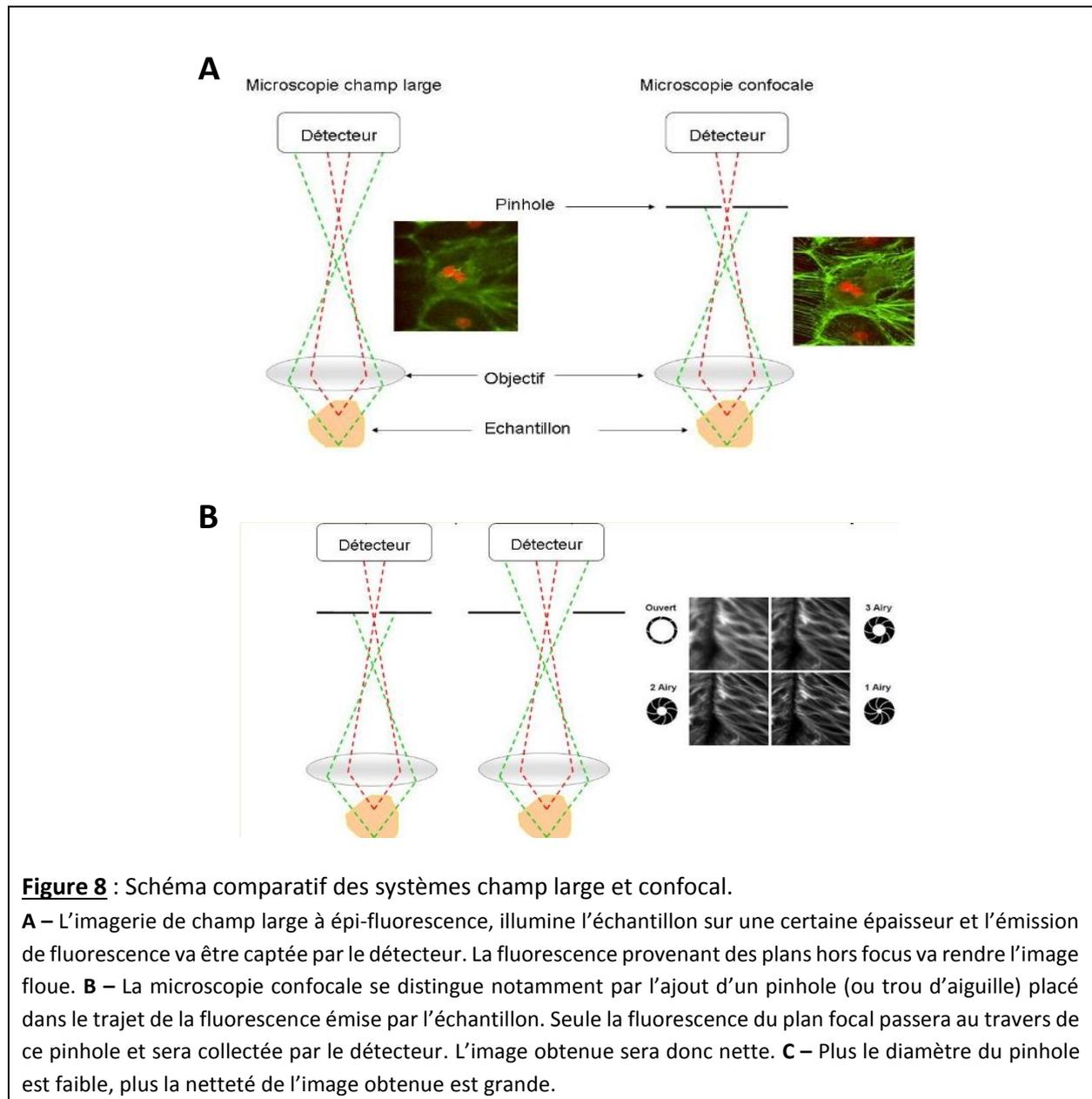


Pour conclure, l'utilisation de plaques 96 puits μ -angiogenesis Ibidi permet de résoudre les problèmes de conditions de culture (présence de ménisque, hétérogénéité de répartition des cryptes, coûts élevés de culture diminués, utilisation de plusieurs plaques, donc plus de cryptes nécessaires, et aplatissement des structures pour l'observation en imagerie). Après avoir optimisé ces conditions de culture en vue d'une analyse HCS, il était nécessaire de s'intéresser aux systèmes HCS disponibles et de valider celui qui conviendrait le mieux pour caractériser le modèle organoïde et de développer une approche HCS.

3) Caractérisation phénotypique des organoïdes de côlon humain

a) Comparaison de différents systèmes HCS

Il existe différents systèmes HCS qui se distinguent selon leurs spécifications, comprenant la vitesse d'acquisition, les chambres d'incubation contrôlant le taux de CO_2 et la température, et les modules d'imagerie additionnels, tels que le BrightField, le contraste de phase, le confocal et le FRET. La différence majeure est la présence d'un module confocal, qui permet d'acquérir un plan focal de l'échantillon par sections optiques sériées, en éliminant les photons provenant du reste de l'échantillon. Ainsi, l'image obtenue n'est que le reflet de ce plan focal et peut être la reconstruction 3D de l'échantillon peut être réalisée. En effet, l'imagerie de champ large à épi-fluorescence, illumine l'échantillon sur une certaine épaisseur et l'émission de fluorescence (photons) de cette dernière va être captée par le détecteur. La fluorescence provenant des plans hors focus va rendre l'image floue (Figure 8, A). A contrario, la microscopie confocale se distingue notamment par l'ajout d'un pinhole (ou trou d'aiguille) placé sur le trajet de la fluorescence émise par l'échantillon. Seule la fluorescence du plan focal passera au travers de ce pinhole et sera collectée par le détecteur, alors que la fluorescence provenant des plans hors focus sera déviée. L'image obtenue sera donc nette. Cette netteté peut être variable selon le diamètre du pinhole. En effet, plus le diamètre est faible, plus la netteté de l'image obtenue sera grande et inversement puisque la fluorescence des plans hors focus pourront atteindre le détecteur et être captée (Figure 8, B).



La qualité de l'imagerie confocale est dépendante de l'outil technique utilisé, tels que le scan de laser, le spinning disk seul ou associé à un pinhole ou le double spinning disk. Ils se distinguent par la sensibilité, la résolution, la vitesse, la phototoxicité et le photoblanchiment. Ainsi, le spinning disk possède une résolution et une vitesse élevées, mais présente un photoblanchiment important. Le double spinning disk permet alors de diminuer ce photoblanchiment.

De plus, pour caractériser de façon optimale les populations cellulaires en 3D, ces derniers paramètres doivent être pris en compte pour obtenir une balance optimale entre une haute résolution d'image, permettant la meilleure analyse, et une capture large de l'échantillon, permettant la meilleure représentativité de l'échantillon. C'est ainsi qu'après avoir trouvé les conditions de culture

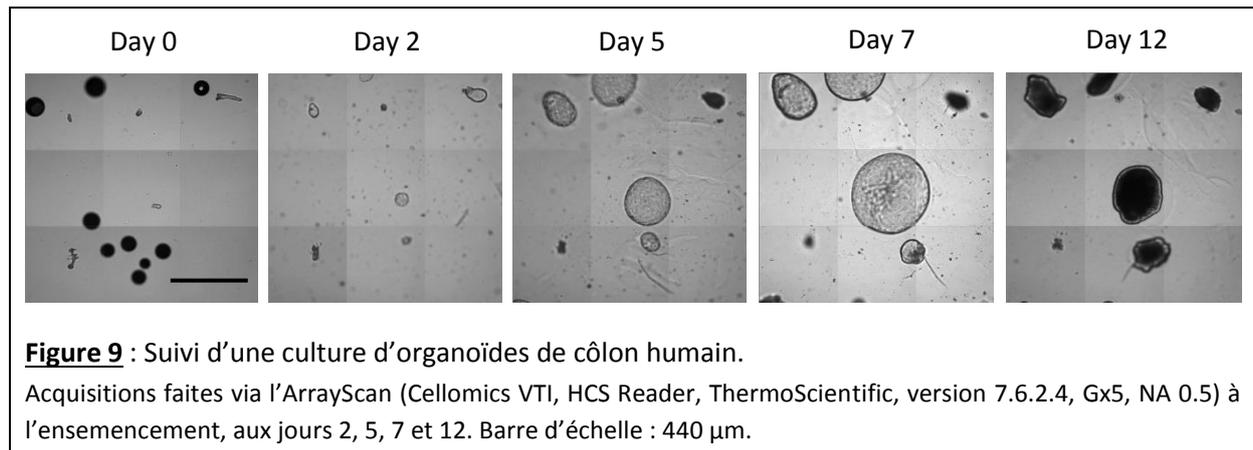
compatibles avec une analyse HCS, j'ai testé différents appareils d'analyse HCS afin de déterminer celui qui répondrait au mieux à nos besoins.

Dans un premier temps, mes objectifs étaient d'identifier les points forts et les points faibles de chacun d'entre eux par rapport à la caractérisation des organoïdes : suivi de la culture à différents jours en lumière transmise (brightfield) et sans marquage fluorescent, dénombrement des structures, classement des structures selon leur état de différenciation (structures cystiques, columnaires, apoptotiques et colonoïdes) et suivi de leur croissance au cours du temps. Dans un deuxième temps, nous voulions acquérir un système automatisé qui puissent à la fois caractériser le modèle organoïde de la façon décrite et offrir les mêmes fonctionnalités qu'un microscope confocal performant avec la meilleure pénétrance des lasers possible dans l'échantillon (au vu de l'épaisseur des organoïdes de 600 μm maximum) et pour observer des marquages cellulaires de prolifération, de survie et de différenciation rares notamment, avec une sensibilité et une résolution optimales pour l'observation de nos structures.

ArrayScan Thermo Scientific

Dans cette optique, j'ai commencé par tester l'ArrayScan, Cellomics VTI, HCS Reader, Thermo Scientific, version 7.6.2.4, disponible sur Toulouse (ITAV). Il s'agit d'un système HCS, qui permet d'acquérir une image de tous les puits d'une plaque 96 puits en 20 minutes, avec un objectif 2.5x, NA 0.5, en lumière transmise (Table 1). Les tests réalisés sur plusieurs mois ont pu mettre en évidence un appauvrissement du matrigel entre 7 et 12 jours de culture, puisque les structures devenaient plus denses (voire inertes) avec plus de débris cellulaires présents dans leur lumière et une réduction de la taille de ces structures (Figure 9).

D'autre part, plusieurs points négatifs ressortaient de ces tests. En effet, la version de cet ArrayScan possédait un autofocus qui se déterminait seulement à partir du champ central de chaque puits et ne pouvait être désactivé. Le fait qu'il y ait la présence d'un ménisque après avoir déposé une couche de matrigel dans des plaques 96 puits classiques, rendait l'acquisition plus longue puisque l'autofocus s'établissant pour chaque puits prenait plus de temps à se fixer, pour acquérir une image qui ne permettait pas d'observer les structures de façon satisfaisante. De plus, même au plus faible grossissement (x2.5), je ne pouvais pas obtenir une image complète des puits (seul le centre du puits était acquis) (Figure 9). Je perdais alors beaucoup d'informations associées aux organoïdes en dehors du champ d'acquisition (survie, croissance et différenciation). Il ne m'était également pas possible de réaliser plusieurs acquisitions simultanées à des profondeurs différentes dans le puits (z différents), pour essayer de se situer dans le centre d'un maximum d'organoïdes, ou bien d'en faire une reconstruction 3D par la suite. Il n'y avait également pas de module confocal associé à cette version, donc l'étude de différenciation par marquages immuno-fluorescents n'étaient pas réalisable en champs large. Enfin, le dernier point négatif était l'absence d'analyse 3D associée au logiciel.



Cytation 5 BioTek Instruments

Le Cytation 5 (BioTek Instruments) est un microscope mobile à champ large, couplé à un lecteur de plaque multimodal, pour lequel une analyse multiparamétrique est générée à partir d'une population cellulaire cultivée en 2D (Table 1). Cette analyse est le point fort de ce système, cependant il n'est applicable qu'à des cultures 2D et ne permet pas d'acquisition de z-stack. Les images obtenues lors des tests d'acquisition réalisés sur cet appareil étaient de moins bonne qualité que celles obtenues avec l'ArrayScan, en lumière transmise et de bien plus faible qualité en fluorescence. L'essai ne fut pas concluant.

L'Operetta PerkinElmer

Un autre système HCS était disponible sur Toulouse (en deux versions différentes du logiciel Harmony®), l'Operetta™ de PerkinElmer. Il s'agit d'un système HCS, ayant un module champs large et un module confocal, avec une analyse associée et simultanée à l'acquisition multimodale (Table 1).

La 1^{ère} version de logiciel Harmony® testée était la plus basique (4.2), sans module confocal et sans possibilité d'observation directe de l'échantillon (scan) : il fallait sélectionner un champ au hasard et lancer l'acquisition afin de savoir où nous nous situons dans la plaque et dans le puits. L'essai n'a pas été concluant pour plusieurs raisons techniques : non paramétrage de la plaque de culture, absence d'objectif à faible grossissement pour une vue d'ensemble du puits en lumière transmise (et donc pas de suivi possible de l'ensemble de la culture), absence de scan, absence de plan focal et également parce que les fonctionnalités d'analyses n'étaient pas encore présentes. Quelques acquisitions ont été réalisées afin d'illustrer ces points faibles (Figure 10).

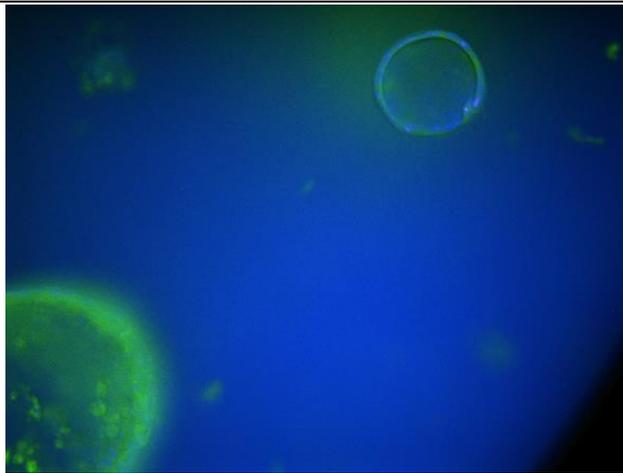


Figure 10 : Acquisition d'un organoïde de côlon humain réalisé via l'Operetta™ (4.2), sans module confocal. Acquisition réalisée en mode champ large, objectif x20 WD, NA 0.4. Marquage des noyaux au DAPI et des noyaux de cellules apoptotiques en vert (via le kit NucView™ 488 Caspase-3 Substrate, Ozyme).

La seconde version du logiciel Harmony® testée (4.5) (Table 1) en démonstration au sein de notre laboratoire à deux reprises pendant plusieurs semaines, présentait de multiples avantages : plusieurs objectifs à différents grossissements, paramétrage multimodal, scan des puits, acquisition de z-stack, modules champ large et confocal, et traitement d'images et analyse des résultats réalisés parallèlement à l'acquisition. Plusieurs acquisitions ont alors été réalisées, que ce soit des time-lapse sur 12h pour observer les cryptes se refermer sur elles-mêmes, des suivis de l'évolution de la culture (survie, mortalité et morphologies) et des analyses de différenciation par la quantification de marquages immuno-fluorescents (Figure 11).

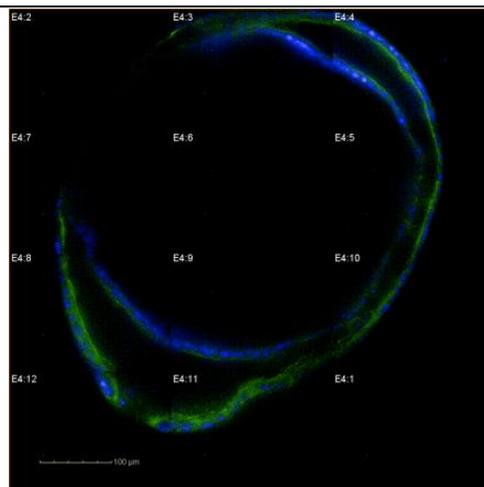


Figure 11 : Acquisition d'un organoïde de côlon humain réalisé via l'Operetta™ (4.2). Marquage des noyaux au DAPI (bleu) et de l'actine membranaire en vert (Gx40, NA 0.7).

Ce système HCS répondait aux différents besoins que nous avons concernant le modèle 3D d'organoïdes de côlon humain, que ce soit en termes :

- d'acquisition multimodale : z-stack, module confocal, rapidité et haute résolution ;
- et de traitement d'image et d'analyse de résultats associés à l'acquisition : projection du maximum d'intensité du z-stack, stratégie de traitement d'image créée par la sélection et le paramétrage de blocs de calculs proposés et analyse des images traitées par la génération de résultats d'intérêts sous forme de graphes et de tableaux récapitulatifs.

L'Opera Phenix PerkinElmer

Un autre système de PerkinElmer, l'Opera Phenix™ a été testé à Hamburg sur invitation de PerkinElmer. Il s'agit du même type de système que l'Operetta™, mais possédant des lasers au lieu de diodes, pouvant être équipé de 4 caméras sCMOS et un double spinning disk, permettant d'éviter le crosstalk des lasers et ainsi augmenter la résolution de l'image obtenue (Table 1). Les acquisitions de meilleure résolution permettaient alors une analyse plus fine des critères morphologiques des structures (Figure 12). C'est ce système HCS que le laboratoire a décidé d'acquérir.

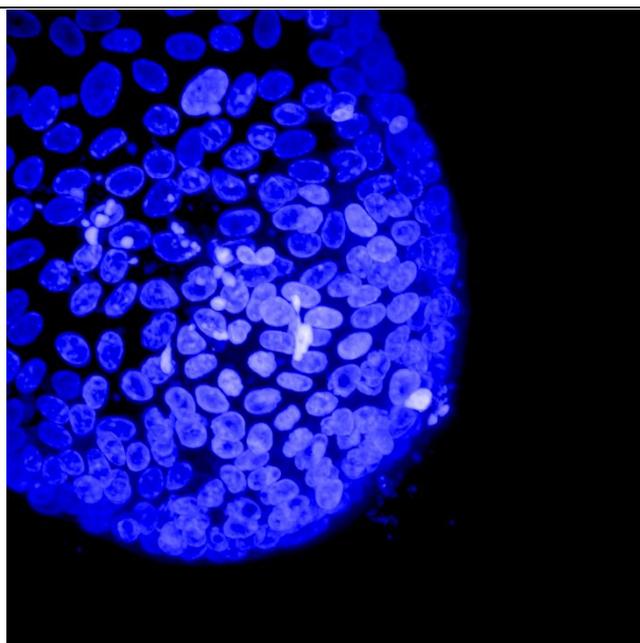


Figure 12 : Acquisition d'un organoïde de côlon humain réalisé via l'Opera Phenix™ (4.5).
Marquage des noyaux au DAPI (bleu) (Gx63 WD water immersion, NA 1.15).

	source lumineuse	technologie	caméra	objectif utilisé	Ouverture Numérique (NA)	profondeur (μm)	vitesse d'acquisition (min)/structure	vitesse d'analyse d'images	préservation de l'échantillon	résolution	rapidité
ArrayScan	lampe	confocal/pinhole	1xCCD	2.5x	0.5	/	2,5	/	+++	++	+++
Cytation 5	lampe	BrightField	1xCCD	2.5x	0.2	/	?	/	+++	+	+++
Operetta 4.2	laser	Confocal / pinhole	1xCMOS	20x WD	0.4	310	20	/	++	+	++
Operetta 4.5	laser	confocal / pinhole	1xCMOS	40x WD	0.6	174	90	simultanée	++	++	++
Opera Phenix	laser	confocal / dble Spinning Disk	4xCMOS	63x WD immersion à eau	1.15	125	20	simultanée	+++	+++	++++

Table 1 : Comparatif des spécifications des HCS utilisés.

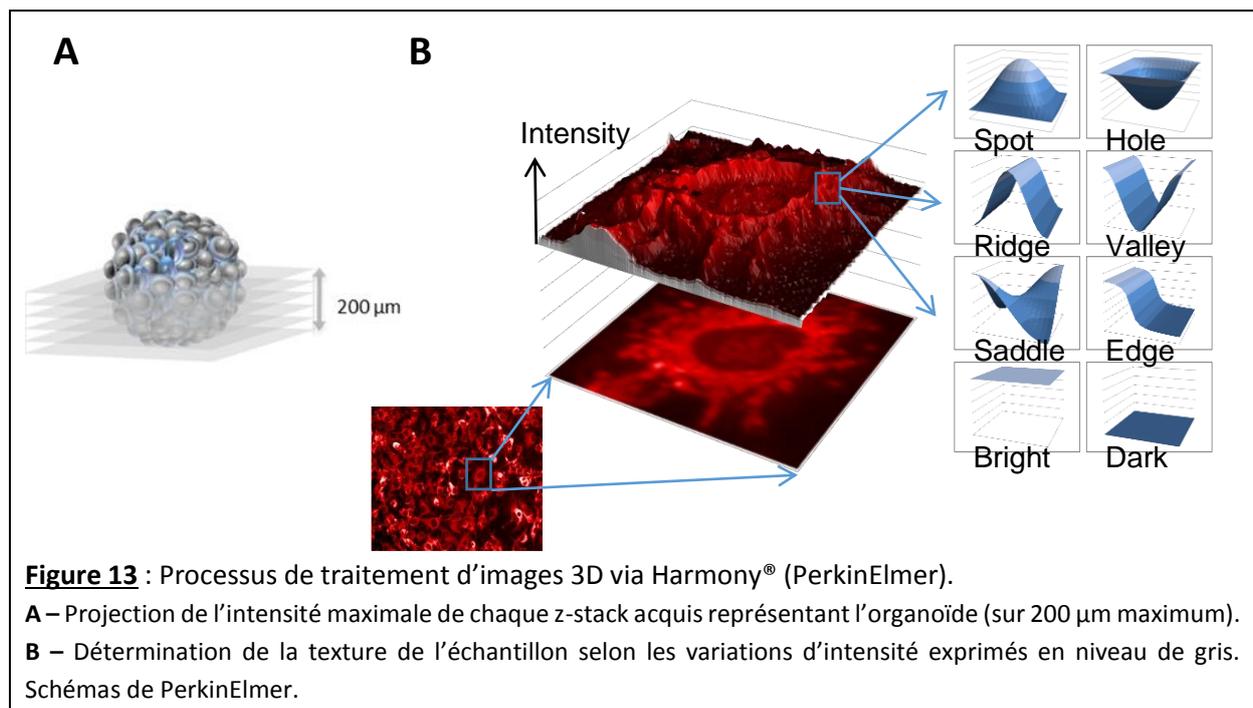
b) Développement du traitement et de l'analyse d'images pour la caractérisation du modèle organoïde

Création du programme de traitement et d'analyse d'images

A partir du bilan technique très positif des essais faits sur les systèmes HCS de PerkinElmer, nous avons choisi de sélectionner le système disponible de suite sur Toulouse, l'Operetta™, et décidé de développer un programme d'analyse permettant de suivre l'évolution des organoïdes tout le long de la culture, dès l'ensemencement des cryptes jusqu'à l'arrêt de la culture au jour 9. Notre but était de caractériser l'évolution des fonds de cryptes et des cryptes entières ensemencées (Figure 4, B), dans la répartition des structures cystiques, columnaires, apoptotiques et colonoïdes après 9 jours de culture.

Un second programme a été développé afin de classer les différents types de structures (cystiques, columnaires, apoptotiques et colonoïdes), de les dénombrer et de générer des données morphologiques associées (taille, aire, densité, ...). Pour cela, avec l'aide de l'ingénieur-support de PerkinElmer, Alioune N'Doye, j'ai développé un protocole de traitement d'image et d'analyse, qui résulte de l'utilisation et le paramétrage de blocs d'analyse.

-Tout d'abord, l'analyse doit être faite sur la projection de l'intensité maximale de chaque z-stack du BrightField, pour en faciliter l'analyser, bloc d'analyse nommé 'Calculate Image' (Figure 13, A).



- 'Find Image Region' permet de délimiter la zone d'intérêt, soit le contour extérieur du puits, puis l'encoche intérieure du puits où se situe la couche de matrigel contenant les cryptesensemencées/organoïdes grâce au bloc 'Select Region' (Figure 14).

- 'Filter Image' est appliqué dans le but de traiter l'image avec un filtre Gaussien et ainsi augmenter le contraste d'intensité.

- 'Find Image Region' permet de déterminer automatiquement les événements (donc les structures) présents dans le puits.

- Basé sur ces structures repérées, le programme d'analyse peut être établi, notamment en définissant des propriétés morphologiques, d'intensité et de texture à analyser (grâce aux blocs de calcul 'Calculate Morphology Properties', 'Calculate Intensity Properties' et 'Calculate Texture Properties' (Figure 13, B).

- 'Select Population' permet d'initier la classification des structures.

- 'Calculate Morphology Properties' joue sur les filtres d'intensité, pour pouvoir déterminer d'une part les fonds de cryptes, cryptes entières et débris lors de l'ensemencement, et d'autre part les structures cystiques, colonnaires, apoptotiques ou colonoïdes au cours de la culture d'organoïdes.

- 'Select Population' permet de sélectionner et de classer les structures grâce à une visualisation et un contrôle manuel.

Pour cela, le logiciel fait appel à une fonctionnalité de 'Machine Learning' qui au fil des acquisitions et de l'ajustement manuel, va affiner de plus en plus le protocole d'analyse et permettre une analyse robuste, automatique et fiable des données issues des cultures d'organoïdes et ainsi obtenir des résultats statistiques. Cette fonctionnalité est le point fort des systèmes HCS de PerkinElmer, très utile pour la caractérisation du modèle d'organoïdes. Cette fonctionnalité n'était effectivement pas présente sur les appareils des autres entreprises testés.

Concrètement, cette fonctionnalité n'est utile qu'après avoir réalisé un 'training set', c'est-à-dire avoir sélectionné au préalable des exemples de structures cystiques, columnaires, apoptotiques et colonoïdes. Ceci dans le but de sélectionner les données brutes, de les trier et de les transformer en résultats exploitables (c'est ce que réalise le bio-informaticien). Cette fonctionnalité se base alors sur les données des exemples établis, mais également sur les données nouvellement générées, sur le processus à accomplir (c'est-à-dire, dans le cas présent, sur la prédiction des classes de structures et le choix de ces classes), l'algorithme d'apprentissage (généralisé automatiquement selon le processus à accomplir, sans être accessible) et enfin l'analyse d'erreur selon le processus à accomplir.

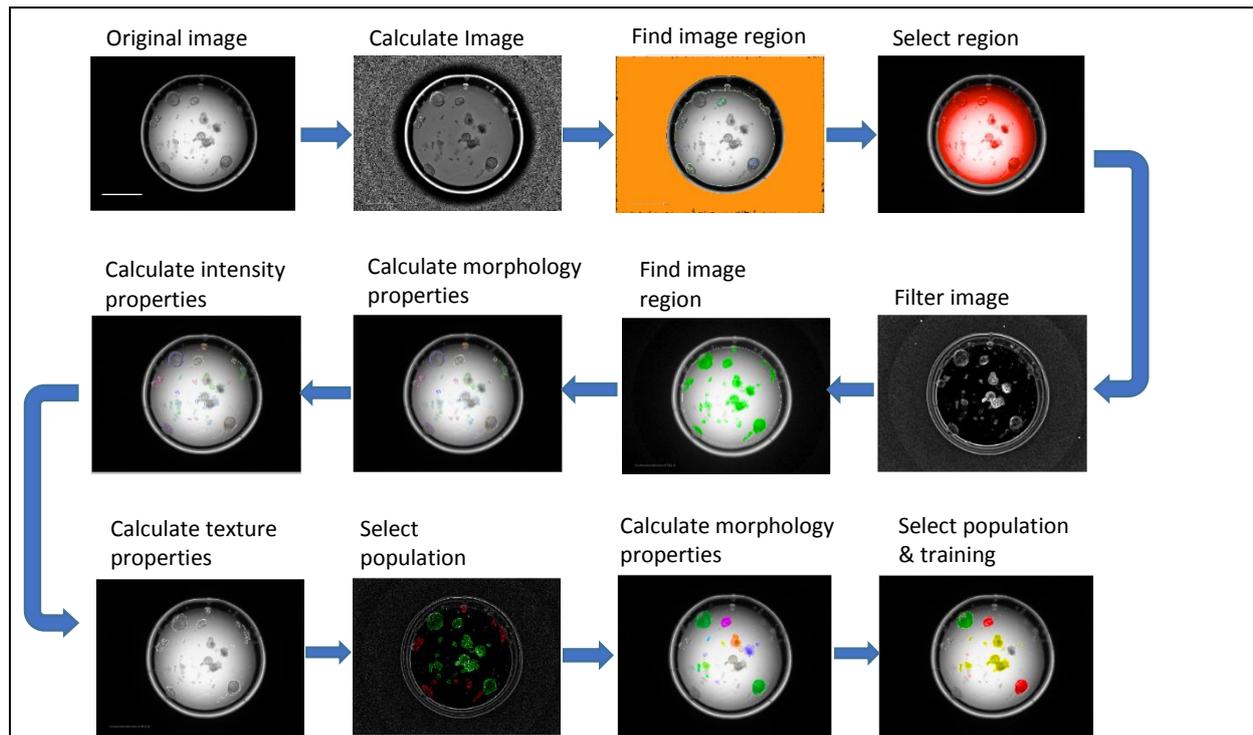


Figure 14 : Programme de traitement d'images et d'analyse créé par l'utilisation et l'ajustement de blocs de calculs proposés dans Harmony® sur l'Operetta™.

La classification des structures (cystiques, columnaires, apoptotiques et colonoïdes) au sein de la culture d'organoïdes est réalisée à partir d'une projection de l'intensité maximale du z-stack généré et de différents critères d'intensité, de texture et de morphologie. Barre d'échelle : 1 mm (Gx1.25, NA 0.03).

Application du programme de traitement d'image et d'analyse d'images

Le but du développement du programme de traitement d'images et d'analyse sur Harmony®, était de pouvoir caractériser l'évolution de la culture d'organoïdes à partir de cryptes coliques humainesensemencées, ainsi que de dénombrer et de classer les différentes structures. Etant donné que le système HCS Operetta™ n'était disponible en démonstration que quelques semaines au sein de notre laboratoire, nous n'avons pas eu l'opportunité de suivre plusieurs cultures d'organoïdes issus de cryptes coliques de patients dits 'contrôles'. Cependant, la preuve de concept a pu être réalisée sur une première culture, et ainsi démontrer la robustesse de l'analyse. En effet, grâce au programme d'analyse, nous avons suivi l'évolution des structures sur 7 jours de culture (Figure 15). Les résultats obtenus mettent en évidence au 4^{ème} jour de culture, la présence de peu de structures cystiques (5%),

de 25% de structures colonnaires, aucun colonoïde et 18% de structures apoptotiques (Figure 15, A). Ces ratios évoluent ensuite jusqu'au jour 7, avec moins de structures colonnaires (12%) mais une apparition de colonoïdes (14%) et moins de structures apoptotiques (4%). Ceci s'expliquerait par le fait que le processus de différenciation s'est poursuivi durant les 3 jours, avec l'évolution de structures colonnaires en colonoïdes (présentant des néo-cryptes), notamment (Figure 15, B). Parmi ces représentations, deux nouvelles classes apparaissent, les 'clusters' et les 'dead'. En effet, à partir du training set, il est possible de mentionner plusieurs classes différentes de population d'intérêt. J'ai donc fait le choix de discriminer les structures 'clusters', qui après projection du z-stack se superposent et ne peuvent être distinguées l'une de l'autre, ainsi que les structures 'dead', correspondant aux structures mortes ou les amas de débris cellulaires présents dès l'ensemencement.

Concernant les données morphologiques associées et exploitées en résultats permettant de caractériser le modèle organoïde, il est possible d'observer, entre autres, l'évolution de la croissance des différentes classes de structures au cours de la culture au jour 4 et au jour 7 (Figure 15, C). Ainsi, les structures colonnaires et apoptotiques croissent significativement et les colonoïdes apparaissent, ce qui reflète la survie et la prolifération des cellules au sein des structures. Il s'agit d'une donnée physiologique parmi tant d'autres, qui sera nécessaire à la caractérisation du modèle organoïde et à l'évaluation de nouvelles cibles pharmacologiques et thérapeutiques dans les pathologies coliques.

des structures, suivi via des acquisitions en Brightfield et épaisseur des structures limitant la pénétration des lasers à puissance égale dans la profondeur de l'échantillon).

Après cette étape d'optimisation de conditions de culture, il était nécessaire de tester et de valider des systèmes HCS permettant la caractérisation du modèle organoïde de façon automatisée, robuste et rapide et d'utiliser ce modèle pour le criblage de molécules. Cette approche avait, entre autres, été élaborée à partir de culture de sphéroïdes (amas de cellules sans organisation architecturale) (Sirenko, Mitlo et al. 2015). Ceci dans le but de quantifier des changements physiologiques (forme, viabilité et apoptose) des sphéroïdes cancéreux en réponse à des traitements anti-cancéreux. Cette étude mettait en avant le développement de l'analyse de modèle 3D afin d'obtenir des données physiologiques, ce qui confirmait l'utilisation bénéfique de systèmes HCS dans l'analyse de modèle 3D. Après plusieurs tests, j'ai validé l'utilisation de l'Operetta™ de PerkinElmer et du logiciel d'analyse Harmony® associé, appliqués au modèle organoïde *ex vivo*. Cette validation a doublement été confirmée grâce à une revue comparative des différents systèmes HCS et de leurs logiciels d'analyse, qui paraissait peu de temps après (Li, Zhou et al. 2016).

Dans un second temps, en collaboration avec Alioune N'Doye, l'ingénieur application de PerkinElmer, j'ai développé un processus de traitement d'images et d'analyse des cultures d'organoïdes via le logiciel d'analyse Harmony®, associé à l'Operetta™. Ce programme permet de dénombrer les structures, de les classer en structures cystiques, columnaires, apoptotiques et colonoïdes, de générer des données morphologiques (diamètre, aire, ...) et physiologiques (survie, apoptose). Il est à noter que plusieurs critères morphologiques et physiologiques peuvent être suivis selon le processus d'analyse créé. En effet, sur une image acquise en BrightField d'un puits de culture d'organoïdes, l'aire, la longueur, la largeur, la circularité et l'intensité des structures peuvent être déterminés et mesurés. À partir d'un programme d'analyse prenant en compte un ou plusieurs canaux, d'autres critères basés sur l'intensité et la localisation de fluorescence peuvent être établis. Par exemple, l'épaisseur de la paroi peut être déterminée en mesurant la distance entre le côté apical (révélé par marquage de l'actine membranaire) et le noyau (marqué au DAPI) des cellules au sein des structures. Ceci pourrait être un indicateur supplémentaire utile au Machine Learning et à son processus de détermination, pour classer plus aisément les différentes structures, selon la polarité des cellules au sein de la structure. Une récente étude a notamment démontré l'utilité de l'utilisation d'un système HCS appliqué à une bio-banque d'organoïdes cancéreux de côlon de patients, préalablement caractérisé génétiquement (Pauli, Hopkins et al. 2017). Cette étude a permis d'orienter le traitement à suivre pour 56 patients, au vu des résultats du séquençage entier du génome et du criblage thérapeutique réalisé par un système HCS. Aujourd'hui le système HCS reste le meilleur outil afin de caractériser un modèle cellulaire et pour réaliser des études pharmacologiques en vue d'une médecine personnalisée à terme.

D/ Conclusion et Perspectives

Pour conclure, l'objectif de cette partie était de développer une approche automatisée et rapide pour aider à la caractérisation du modèle 3D d'organoïdes issus de côlon de patients et de l'utiliser afin d'évaluer de nouvelles cibles pharmacologiques dans les pathologies coliques humaines. Une année et demie aura été nécessaire pour optimiser les conditions de cultures, tester plusieurs kits

de suivi de culture (survie/apoptose) et valider ceux qui possédaient la capacité de pénétrer à travers le matrigel et d'atteindre les structures, puis de tester différents systèmes HCS et d'en valider un en particulier, l'Operetta™ de PerkinElmer. Ceci a alors permis à l'institut de faire le choix d'acquérir en septembre 2017, l'Opera Phenix™ de PerkinElmer (après avoir effectué des essais très positifs sur des cultures d'organoïdes de côlon) et de créer une plateforme 'organoïdes' au sein de l'institut, proposant de multiples services. Cette plateforme permettra, entre autres, d'analyser de façon automatisée, rapide et robuste les cultures d'organoïdes et de notamment, comprendre les effets de la thrombine sur l'épithélium colique humain.

Discussion & Conclusion

Le **côlon est fortement exposé aux protéases** qui interviennent dans une **multitude de processus physiologiques (motricité intestinale, survie et prolifération) et pathologiques (agrégation plaquettaire, inflammation, apoptose, carcinogenèse)**, après l'activation de leurs récepteurs, les PARs (Bustos, Negri et al. 1998). Dans le côlon, les deux récepteurs activés par la thrombine, **PAR₁** et **PAR₄**, sont exprimés dans les cellules épithéliales coliques (Vergnolle 2005, Nasri, Bonnet et al. 2016).

Le 1^{er} objectif de ces travaux de thèse a été d'évaluer les **effets de la thrombine et l'implication de ses récepteurs PAR₁ et PAR₄** sur l'épithélium colique humain, en utilisant le modèle de culture en trois dimensions (3D) d'organoïdes colorectaux. Nos résultats montrent que la thrombine exogène agit sur les processus de prolifération, de différenciation et d'apoptose de l'épithélium colique sain humain, au travers de l'activation de PAR₁ et de PAR₄, selon la dose de thrombine utilisée. Nous avons observé qu'une dose de **10 mU/mL** de thrombine, en impliquant **PAR₁** et **PAR₄**, diminue de moitié la **prolifération cellulaire**. Ces données corrélerent avec la littérature, montrant que PAR₁ est associé à la prolifération des cellules cancéreuses de côlon (Darmoul, Gratio et al. 2003). Cependant, à forte dose de thrombine, **50 mU/mL**, **seul PAR₁ était impliqué** dans cette diminution de prolifération cellulaire. Cette différence d'activation de récepteurs selon la dose de thrombine utilisée, pourrait traduire un effet compensatoire dans le but de maintenir la survie des structures différenciées, les colonoïdes, en inhibant leur prolifération.

Nos résultats montrent également que l'ajout de thrombine à faible dose, **10 mU/mL**, sur une culture d'organoïdes établis à partir de tissus colorectaux normaux entraîne une **diminution de moitié de l'activité métabolique** après activation de **PAR₄** puisque un antagoniste spécifique de ce récepteur inhibe cet effet. Alors qu'à forte dose de thrombine, **50 mU/mL**, la diminution de moitié de l'activité métabolique des cellules épithéliales coliques des organoïdes observée semble cependant **n'impliquer que PAR₁**. Il est établi qu'à faible dose de thrombine, PAR₁ co-activerait PAR₄. Une étude a mis en évidence par technique de FRET et de co-immunoprécipitation, l'hétérodimérisation de PAR₁ et PAR₄, induite par la thrombine, augmentant bien plus l'agrégation plaquettaire engendrée par PAR₄ seule (Leger, Jacques et al. 2006). Ainsi, il pourrait y avoir une coopération des deux récepteurs en réponse à la thrombine, pour réguler l'activité métabolique des cellules épithéliales colorectales normales humaines. Une autre explication serait que PAR₄ est activé par d'autres protéases à sérine, sécrétées par les cellules épithéliales coliques (Motta, Bermudez-Humaran et al. 2012, Rolland-Fourcade, Denadai-Souza et al. 2017). Une récente étude a démontré de façon inattendue, l'activation de PAR₂ par la thrombine (Mihara, Ramachandran et al. 2016). Il se pourrait alors que l'activation de PAR₂ réduise la prolifération et l'activité métabolique des cellules souches, comme nous avons pu le démontrer dans des cultures d'organoïdes intestinaux murins (Nasri, Bonnet et al. 2016), et que ceci serait dépendant de la thrombine. Des études complémentaires devraient être réalisées pour identifier l'implication de ces récepteurs selon la dose de thrombine utilisée et s'ils sont activés individuellement ou co-activés.

Le **processus apoptotique** est, quant à lui, **augmenté d'un facteur 8** en réponse à la thrombine et via l'activation de **PAR₁ et de PAR₄**. Ce résultat corréle avec la littérature, qui démontrait l'implication de PAR₁ dans le processus apoptotique (Chin, Vergnolle et al. 2003), mais souligne l'implication de l'activation de PAR₄ dans ce processus. Concernant la **différenciation épithéliale**, la thrombine **diminue le nombre de colonosphères** (structures immatures), au profit d'une **augmentation du nombre de structures apoptotiques et de colonoïdes** (structures plus matures

présentant des néo-cryptes). Cet effet est dû à **l'activation à la fois de de PAR₁ et de PAR₄** dans les cellules épithéliales coliques. Une récente étude a permis de mettre en évidence le possible rôle de la thrombine sur la différenciation des mégacaryocytes, à partir d'une lignée cellulaire humaine, Meg-01 (Yang, Ge et al. 2016). L'ajout de thrombine entraîna un arrêt du cycle cellulaire et une induction d'apoptose. Ce qui peut être corrélé avec nos résultats. De plus, la thrombine inhibe l'expression d'une protéine inhibant le processus apoptotique, Bcl-2 et favorise l'expression d'Akt et d'ERK, impliqués dans le processus de différenciation, soulignant le rôle de la thrombine dans ces processus. Une autre étude avait également mis en évidence l'effet de la thrombine sur la différenciation des cellules progénitrices endothéliales, via l'activation de PAR₁, suggérant son rôle dans la régénération vasculaire (Tarzami, Wang et al. 2006). Seules, les expériences transcriptomiques qui vont être réalisées sur nos cultures d'organoïdes en présence des différentes conditions, pourront confirmer ces dernières données et souligner l'effet de la thrombine sur l'épithélium colique humain, dans ce contexte.

Concernant les **processus d'inflammation et de cancérisation, la thrombine participe à ces processus chez les patients atteints de MICI** via une augmentation de l'incidence de thrombose (Thompson, Wakefield et al. 1995). En effet, la MC se caractérise par un dépôt intravasculaire de fibrine et des micro-thromboses vasculaires, suggérant l'apparition de dommages de ces vaisseaux précocement dans le développement de la maladie. Concernant les patients atteints de RCH, les données histologiques montrent une occlusion des capillaires. De plus, le processus de coagulation est anormalement activé et de façon constante chez les patients atteints de MICI. La thrombine semble donc être un facteur dans le développement des MICI. Concernant la cancérisation, les **patients atteints de MICI ont 7 fois plus de risque de développer un CCR** (Dyson and Rutter 2012). Une étude a révélé **le rôle de la thrombine dans le développement de cancer du côlon à partir d'un contexte inflammatoire**. A partir de modèle de colite (chimio-induite via le DSS) et de cancer associé à la colite (via l'AOM) chez la souris (C57BL/6 consanguine), les auteurs ont observé la formation d'adénomes. Le résultat obtenu était un développement uniforme d'adénomes à partir de cryptes aberrantes chez les souris contrôles (FII^{+/+}) et une diminution de ces lésions précancéreuses, ainsi que du nombre d'adénomes chez les souris FII^{+/-} (Turpin, Miller et al. 2014). Le fait que la **thrombine induise la carcinogenèse à partir d'un état inflammatoire** a été validé par l'utilisation d'un inhibiteur de la thrombine, l'hirudine, qui ralentit le développement des adénomes.

Les effets pro- ou anti-apoptotiques de la thrombine ont été décrits dans un contexte tumoral, via l'activation de PAR₁, mais ces effets sont dépendants de la dose utilisée, (Zain, Huang et al. 2000, Flynn and Buret 2004). Effectivement, **à une première dose de thrombine, de 0,1 à 0,5U/mL, PAR₁ activé entraîne la croissance des cellules tumorales** (dont la lignée humaine de carcinome colique, HCT8), alors qu'à plus **forte dose de thrombine, allant de 0,5 à 1U/mL, la croissance est diminuée au profit de l'apoptose cellulaire**. Ces résultats soulignent deux points, le premier étant l'implication d'autres récepteurs que PAR₁, pour expliquer les effets opposés ou la présence d'autres protéases à sérine interagissant avec ce récepteur. Le second point est que dans notre étude, les **doses de thrombine** utilisées sont **10 à 100 fois moins importantes** (10 et 50 mU/mL). Or, dans le modèle organoïde, l'hétérogénéité cellulaire est représentée, suggérant que sur un épithélium colique humain normal, la thrombine agirait plus efficacement sur les cellules souches que sur les cellules différenciées, présentes dans une lignée cellulaire tumorale. Ce résultat soulignerait d'autant plus l'importance et la relevance de l'utilisation de modèle 3D *ex vivo*, à partir des cellules souches.

L'utilisation du modèle *ex vivo* permet de comparer les différences morphologiques et physiologiques des cultures pathologiques et contrôles, voire **de tester les effets d'approches pharmacologiques et de nouveaux médicaments sur ces cultures**. Un inhibiteur sélectif et réversible de la thrombine est couramment utilisé en médecine afin de prévenir les accidents thromboemboliques, le **Dabigatran Etexilate** (Hankey and Eikelboom 2011). Cette molécule anticoagulante est la seule inhibant la thrombine, une fois métabolisée, et utilisée en clinique à ce jour. Une étude a récemment été publiée sur l'effet de l'inhibition de la thrombine dans l'activation de PAR₁ (Chen, Soto et al. 2015). La molécule **dabigatran va lier le site actif de la thrombine, inhibant ainsi l'activation de PAR₁ et la signalisation associée**. Une inhibition prolongée et plus forte entraîne une stabilisation de PAR₁ à la membrane et augmente ainsi sa liaison à d'autres protéases activatrices ou agonistes. Il serait intéressant de traiter des cultures d'organoïdes coliques issus de muqueuse de patients atteints de MICI, pour voir l'implication du site actif de la thrombine dans l'altération de la perméabilité et le processus apoptotique et de connaître quels sont les récepteurs impliqués et s'ils agissent mutuellement, ce qui ouvrirait la voie à une nouvelle perspective thérapeutique.

En vue d'un objectif thérapeutique, la 2nde partie de ce travail de thèse a été d'abord la mise en place **des conditions de culture et d'imagerie nécessaires pour réaliser une approche de criblage robuste et reproductible** par HCS (High-Content Screening) appliquée aux organoïdes. Les conditions de culture d'organoïdes en plaques 96-puits ont été réadaptées afin de pouvoir acquérir des images répondant aux critères nécessaires pour une analyse via un système HCS. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé le système Operetta HCS couplé au logiciel d'Analyse Harmony (PerkinElmer) pour mettre en place une procédure d'analyse permettant de **reconnaître les organoïdes, de les dénombrer, de les classer selon leur état de différenciation et de suivre leur croissance** tout au long de la culture.

Très récemment, une étude a été publiée sur le **développement et l'utilisation d'une bio-banque d'organoïdes cancéreux de côlon de patients**, caractérisée par séquençage du génome entier. Les données génétiques seules étant insuffisantes pour orienter le traitement à proposer aux différents patients, **une analyse par HCS** des organoïdes établis à partir de ces patients a été utilisée pour tester et déterminer les **combinaisons de traitements à proposer** (Pauli, Hopkins et al. 2017). Cette étude ouvre la voie de nouvelles perspectives de thérapie personnalisée. Etant donné que l'utilisation du modèle organoïdes est maintenant commune, la procédure d'analyse mise en place lors de ces travaux de thèse, permettra tout d'abord d'analyser les effets de la thrombine exogène sur une culture d'organoïdes issus de patients atteints de MICI, d'observer les effets de son inhibition par le dabigatran et/ou la modulation de PAR₁ et/ou celle de PAR₄, et ensuite d'évaluer les effets d'autres composés sur l'épithélium colique (patho)-physiologique. Utilisés de façon rigoureuse, les systèmes HCS permettront d'obtenir une quantité indénombrable de données qui ne pourront être exploitées de nos jours. Toutefois, les big-data générées pourront dans un premier temps être corrélées à des approches mathématiques. Une récente étude américaine, a permis de modéliser des **organoïdes cancéreux de côlon de façon spatiotemporelle** (Yan, Konstorum et al. 2017). Cette modélisation permet de prédire le **devenir morphologique de la tumeur via la régulation des cellules souches** par des signaux provenant du microenvironnement (tels que BMP et HGF) et est en accord avec les résultats générés par les études réalisées sur des organoïdes cancéreux issus de patients atteints de CCR.

L'utilisation de ce modèle *ex vivo* complète les approches jusque-là effectuées dans des modèles de lignées de cellules épithéliales, proposant une vision intégrée du comportement d'un épithélium complexe humain. L'approche HCS initiée lors de ces travaux de thèse permettra d'analyser

de façon robuste et automatisée dans ce modèle, les effets d'autres composés et avoir ainsi un impact majeur sur notre compréhension des pathologies épithéliales et sur les tests de nouvelles approches thérapeutiques.

ANNEXES

Gastroenterology

Characterization of human colon organoids from Inflammatory Bowel Disease patients as a new preclinical model --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	GASTRO-D-17-01150
Full Title:	Characterization of human colon organoids from Inflammatory Bowel Disease patients as a new preclinical model
Article Type:	Basic - Alimentary Tract
Corresponding Author:	Nathalie Vergnolle, PhD INSERM UMR1043 Toulouse, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	INSERM UMR1043
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Emilie D'Aldebert
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Emilie D'Aldebert Muriel Quaranta Morgane Sebert Delphine Bonnet Sylvain Kirzin Guillaume Portier Duffas Jean-Pierre Sophie Chabot Philippe Lluel Sophie Allart Celine Deraison Claire Racaud-Sultan Audrey Ferrand Laurent Alric Emmanuel Mas Nathalie Vergnolle, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>BACKGROUND & AIMS: Inflammatory Bowel Diseases (IBD) are chronic inflammatory disorders, where epithelial defects are believed to drive, at least in part, the pathology. Isolation and culture of intestinal crypts from human tissues reconstitutes in vitro organoids, corresponding to a 3-dimension complete and diverse epithelium. Our aim was to characterize the morphological and functional phenotype of organoids from controls (non-IBD) patients, compared to organoids from IBD patients, in order to describe the epithelial defects imprinted by IBD, and to evaluate the effects of pro- and anti-inflammatory mediators on organoid cultures.</p> <p>METHODS: Crypts isolated from controls (non-IBD) and IBD patient colons were cultured up to 12-days. Morphological (size, budding formation, polarization, luminal</p>

content), cell composition (proliferation, differentiation, immaturity markers expression), and functional (chemokine and tight junction protein expression) parameters were measured by immunohistochemistry, RT-qPCR or western-blot. The effects of inflammatory cocktail or anti-inflammatory treatments were studied on controls and IBD organoid cultures respectively.

RESULTS: Organoid cultures from controls or IBD patients had the same cell composition after 10 to 12-days of culture, but IBD organoid cultures showed an inflammatory phenotype with decreased size and budding capacity, increased cell death and luminal debris, and inverted polarization. Tight junction proteins were also significantly decreased in IBD organoid cultures. Inflammatory cytokine cocktail reproduced this inflammatory phenotype in non-IBD organoids. Clinically-used treatments (5-ASA, glucocorticoids, anti-TNF) reduced some but not all parameters.

CONCLUSIONS: Imprinted inflammatory changes are associated with IBD epithelium, and can be studied in organoid cultures. This model constitutes a reliable human pre-clinical model to investigate new strategies targeting epithelial repair.

Characterization of human colon organoids from Inflammatory Bowel Disease patients as a new preclinical model

Emilie d'Aldebert¹, Muriel Quaranta¹, Morgane Sébert¹, Delphine Bonnet², Sylvain Kirzin³,
Guillaume Portier³, Jean-Pierre Duffas³, Sophie Chabot⁴, Philippe Lluel⁴, Sophie Allart⁵,
Céline Deraison¹, Claire Racaud-Sultan¹, Audrey Ferrand¹, Laurent Alric², Emmanuel Mas^{1,6}
and Nathalie Vergnolle^{1,7}.

Running title: Inflammatory bowel disease human colonoids

¹IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, Toulouse, France.

²Internal Medicine, Digestive Department CHU Toulouse, UMR 152, IRD Toulouse 3
University, France

³Pole Digestif, CHU de Toulouse, France

⁴UROsphere SAS, Toulouse, France

⁵Plateforme d'Imagerie, CPTP, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS,
Toulouse, France

⁶Unité de Gastroentérologie, Hépatologie, Nutrition, Diabétologie et Maladies Héréditaires
du Métabolisme, Hôpital des Enfants, CHU de Toulouse, France

⁷Department of Physiology and Pharmacology, University of Calgary, Calgary, AB, Canada

* Correspondance: Dr. Nathalie Vergnolle, Inserm UMR-1220, Institut de Recherche en Santé
Digestive, CS60039 CHU Purpan, 31024 Toulouse, Cedex-3, France. E-mail address:
nathalie.vergnolle@inserm.fr

Conflict of interest statement: None of the authors have declared conflicts of interest.

Authors contribution to the manuscript: E d'A, MQ and MS have performed experiments, analyzed data, contributed to manuscript drafting. DB, SK, GP, JPD, SA, CD, LA and EM have provided technical and/or material support, and contributed to manuscript editing. SC, PL, CD, CRS, AF, EM and NV have analyzed and critically reviewed data, obtained funding and contributed to manuscript editing. Study design, concept, supervision and manuscript writing were performed by E d'A and NV.

Words: 4,725

ABSTRACT (257)

BACKGROUND & AIMS: Inflammatory Bowel Diseases (IBD) are chronic inflammatory disorders, where epithelial defects are believed to drive, at least in part, the pathology. Isolation and culture of intestinal crypts from human tissues reconstitutes *in vitro* organoids, corresponding to a 3-dimension complete and diverse epithelium. Our aim was to characterize the morphological and functional phenotype of organoids from controls (non-IBD) patients, compared to organoids from IBD patients, in order to describe the epithelial defects imprinted by IBD, and to evaluate the effects of pro- and anti-inflammatory mediators on organoid cultures.

METHODS: Crypts isolated from controls (non-IBD) and IBD patient colons were cultured up to 12-days. Morphological (size, budding formation, polarization, luminal content), cell composition (proliferation, differentiation, immaturity markers expression), and functional (chemokine and tight junction protein expression) parameters were measured by immunohistochemistry, RT-qPCR or western-blot. The effects of inflammatory cocktail or anti-inflammatory treatments were studied on controls and IBD organoid cultures respectively.

RESULTS: Organoid cultures from controls or IBD patients had the same cell composition after 10 to 12-days of culture, but IBD organoid cultures showed an inflammatory phenotype with decreased size and budding capacity, increased cell death and luminal debris, and inverted polarization. Tight junction proteins were also significantly decreased in IBD organoid cultures. Inflammatory cytokine cocktail reproduced this inflammatory phenotype in non-IBD organoids. Clinically-used treatments (5-ASA, glucocorticoids, anti-TNF) reduced some but not all parameters.

CONCLUSIONS: Imprinted inflammatory changes are associated with IBD epithelium, and can be studied in organoid cultures. This model constitutes a reliable human pre-clinical model to investigate new strategies targeting epithelial repair.

Keywords: Colonoids, Inflammatory Bowel Disease, Inflammation, Crohn's disease, ulcerative colitis, Gut.

INTRODUCTION

Inflammatory Bowel Diseases (IBD) are chronic inflammatory disorders of the intestine that include Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). IBD cause lifelong inflammatory disorders and severely impair the quality of life in patients[1]. Current treatments target the inflammatory reaction *per se*, and in particular the recruitment of inflammatory cells[2]. However, the idea that a healed intestinal epithelium is necessary in addition to inhibition of immune cell recruitment has emerged. Mucosal healing is now considered as the next therapeutic challenge for IBD. Indeed, a more favorable prognosis is associated with mucosal healing: patients having lower relapse and hospitalization rates[3, 4]. Some of the current treatments used in the clinic are considered to favor, at least in part epithelial healing. This is the case for Mesalamine (5-ASA)[5], but also for anti-Tumor Necrosis Factor (TNF)[6] and glucocorticoid treatments, which restore barrier function[7]. However, their effects on epithelial functions are considered very limited and the hope for future treatments is to strengthen the effects of therapies on epithelial healing.

The consensus to explain IBD's etiology is to consider that in genetically-predisposed individuals, a combination of immune disorders with intrinsic (epithelial barrier function for instance) and extrinsic (microbiota) factors lead to the development of chronic inflammation. Genome-wide association studies have identified a number of epithelial mediators and epithelial signaling pathways associated with IBD. These studies brought the epithelium at the forefront for the development of new therapeutic strategies, although epithelial dysfunctions in IBD have not been exhaustively defined yet. Novel models focusing on epithelial biology are therefore necessary in the context of IBD. Such models are important both to better characterize epithelial dysfunctions associated with IBD and to assess new therapeutic strategies aiming at promoting intestinal epithelium healing.

A recent technological breakthrough now allows to re-create *in vitro* an intestinal epithelial organ[8]. This technology is based on the isolation of intestinal crypts, which are then cultured in 3-dimensions. In the presence of appropriate growth factors, intestinal stem cells present in the isolated crypts proliferate and enter into differentiation processes, recreating a complex epithelium, which contains all cell types that compose the intestinal epithelium (paneth cells, enteroendocrine cells, goblet cells, enterocytes, tuft cells, etc.). The epithelium generated by 3-dimension culture of isolated crypts closes on itself, forming a sphere in which epithelial cells are orientated with their apical side towards the lumen. We proposed here to use this technology of colon organoids, first to characterize the phenotype of IBD patient's epithelium in order to define epithelial mediators involved in the disease, and second to establish whether organoid cultures from IBD patients could be used to test therapeutic approaches on epithelial healing.

METHODS

Human tissue materials

Biological samples were obtained from individuals treated at the Toulouse University Hospital who gave informed consent. The MICILIP research protocol was approved by the national ethics committee (#NCT01990716) and was supported by the Toulouse University Hospital. Colonic samples were obtained either from surgical resections or endoscopic biopsies. These samples were freshly collected from non-IBD controls (healthy zones of tissues resected from patients with colorectal cancer or endometriosis) and from IBD patients. Characteristics and treatments for patients are provided in supplementary Table 1.

Isolation and culture of colon crypts

Fresh colonic tissues or biopsies were kept for few minutes in Phosphate Buffered Saline solution without calcium and magnesium (PBS WO, Sigma Aldrich) at 4°C. Samples were washed in PBS WO until supernatant was clear. For resection tissues, muscle layer and sub-mucosa were removed and incubated with a mixture of antibiotics (normocin (Invivogen), gentamycin (Sigma Aldrich), and fungizone (Invitrogen)) 4 times for 5 minutes at room temperature (RT). Mucosa was cut into small pieces and incubated 3 times for 5 minutes at RT in 10 mM dithiotreitol (DTT, Roche). Next, samples were transferred in 8 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Ambion) and slowly rotated for 1 hour at 4°C. After removal of the EDTA, tissue fragments were vigorously re-suspended in PBS to isolate intestinal crypts. Heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS, Life Technologies) was added (5%) and crypts were centrifuged at 40g for 2 minutes. Supernatant was replaced by basal medium (advanced DMEM/F12 (Invitrogen), 2 mM Glutamax (Invitrogen), 10 mM hepes (Gibco) and 5% FBS) and fractions were centrifuged at 500 rpm for 2 minutes. This washing procedure was repeated 3 times, pellet was diluted in 5 ml of basal medium and crypt number was counted. Isolated intestinal crypts (50-100 crypts per 25 µl of Matrigel per well) were embedded in hESC-qualified matrix (Matrigel, Corning) on ice and seeded in 48 wells plates (Greiner) or 8 wells chamber slide (lab-tek II, Nunc). The Matrigel was incubated for polymerization for 10 minutes at 37 °C, and was supplemented with 250 µl/well of complete medium A (advanced DMEM/F12, 2mM Glutamax, 10 mM hepes, 1X N2 (Invitrogen), 1X B27 minus vitamin A (Life technologies), 1X penicillin/streptomycin solution (Invitrogen), 50 ng/ml human EGF (Gibco), 100 ng/ml human noggin (Tebu), 100 ng/ml human Wnt3a (R&D systems), 1 mM N-acetylcysteine (Sigma Aldrich), 1µg/ml human R-spondin (R&D systems), 10 mM nicotinamide (Sigma Aldrich), 10 nM gastrin (Sigma Aldrich), 10 µM SB202190 (Sigma Aldrich), 0.01 µM PGE₂ (Sigma Aldrich), 0.5 µM LY2157299 (Axon MedChem)). Medium was changed every other day with complete medium B (advanced

DMEM/F12, 2mM Glutamax, 10 mM hepes, 1X N2, 1X B27 minus vitamin A, 1X penicillin/streptomycin solution, 50 ng/ml human EGF, 100 ng/ml human noggin, 100 ng/ml human Wnt3a, 0.5 µg/ml human R-spondin, 10 mM nicotinamide, 10 nM gastrin, 10 µM SB202190, 0.01 µM PGE₂) and culture was maintained in a humidified incubator at 37°C under 5% CO₂ and 95% air atmosphere for an average of 10 days.

Treatments

Control organoids were treated by a pro-inflammatory cytokines cocktail (IL-1β, IL6, TNF-α (PeproTech)) at the concentration of 10 ng/ml (supplementary Figure 1). IBD organoids were treated independently by three routinely used medications for the treatment of IBD patients: anti-TNFα (10 or 100 µM), methyl-prednisolone (10 or 100 µM), and 5-ASA (50 or 500 µM) (supplementary Figure 2).

Immunofluorescence labeling

Organoids (in chamber slide) were fixed with 4% formaldehyde (FA, Sigma Aldrich) in Hank's Buffered Salt Solution (HBSS, Gibco) at 37°C for 40 minutes. Organoids were permeabilized with 0.5 % triton X-100 (Sigma Aldrich) in HBSS at RT for 40 minutes and were incubated with a blocking buffer containing 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich) in HBSS overnight at 4°C. Organoids were incubated 2 hours at 37°C with primary antibodies. Next, organoids were incubated with secondary antibodies 1.5 hour at 37°C and then stained for 20 minutes with DAPI (Invitrogen) and Phalloidin (see supplementary Table 2 for all antibodies)[9]. Finally slides were mounted with Vectashield mounting medium (VectoLaboratories).

Colonoid imaging

The images of organoids were taken by confocal microscopy with a Leica SP8. Image J software was used to process and analyze images. Ten images at 20X and 10 images at 63X objectives were analyzed for each well, and an average of 2 wells were analyzed for each condition. To assess barrier function, organoids were incubated with 1mg/ml of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled dextran 4-kDa for 2-hours at 37°C, and images were analyzed on a confocal microscope with a X63 lense.

RNA and protein extraction

After an average of 10 days of culture, organoids (8-10 wells in 48 wells plates) were incubated in cell recovery solution (Corning) for 30 min at 4°C. After centrifugation, pellet-containing cells were resuspended in RP1 buffer (NucleoSpin® RNA/Protein kit, Macherey Nagel). Total RNA and protein were extracted according to the manufacturer's protocol.

Reverse transcription, and real-time quantitative PCR analysis

1 µg of each purified RNA preparation was reverse-transcribed using Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Life sciences) and cDNAs were analyzed by qPCR using relevant primers as previously described[10]. qPCR analysis was performed on a LightCycler® 480 Real-time PCR system device (Roche Applied Science) using the LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science), according to the manufacturer's instructions, and specific primers (supplementary table 3). All experiments included a standard curve and all samples were analyzed in duplicate and expressed as a relative amount ($2^{-\Delta Ct}$). Relative expression of targeted genes was compared to GlycerAldehyde-3-Phosphate DesHydrogenase (GAPDH).

Western blot

50µg of total proteins were separated by 4–20% Mini-Protean Gel (Biorad). Separated proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane. Primary antibodies (supplementary table 2) as well as peroxidase conjugated secondary antibodies were used according to standard Western blot procedures. Peroxidase was detected by using the ECL™ Prime Western Blotting system (GE Healthcare). Quantification of signals was done using Image Lab software (Biorad).

Metabolic activity assay

Organoids were plated in 96-wells opaque plates after 6 or 9 days of culture. CellTiter-Glo®3D reagent (Promega, France) was added to each well (volume 1:1), and incubated for 30-min at room temperature. Triplicate measures were performed for each condition. Luminescence was measured with a Varioskan Flash (Thermo Scientific), and images of each well were taken with Apotome, in order to evaluate the surface occupied by all organoids (Fiji software). Results were normalized with the ATP standard curve and were expressed as ATP concentration per total surface of organoids.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM. Analyses were performed using the GraphPad Prism 5 software. Statistical significance was determined by Student's *t* test, Mann-Whitney, and Wilcoxon tests where appropriate. Significance was accepted for $p < 0.05$.

RESULTS

Characterization of colonoid cultures

Human colon crypts were purified from fresh tissue samples obtained from colectomies or biopsies harvested in healthy zones of non-IBD patient tissues. Crypts fragments (Figure 1a day 0 panel) were cultured in a three-dimensional Matrigel matrix for 10 to 12 days. Within the first two days, crypt architecture disappeared to form organoid structures composed of a monolayer of epithelial cells and a central lumen. At days 10 to 12 of culture, two types of structures were observed: colonospheres, which are composed of a monolayer of epithelial cells with a central lumen and colonoids exhibiting budding crypts (Figure 1). The epithelium of colonospheres and colonoids was polarized, with the basolateral side facing outwards (β -catenin labeling) and the apical side oriented towards the lumen (actin labeling) (Figure 1b).

At 10 to 12-days of culture, human colon organoids had positive staining for cytokeratin 20 (Figure 2a), chromogranin A (Figure 2b) and mucin 2 (Figure 2c), demonstrating that differentiated cells: colonocytes, enteroendocrine cells, and goblet cells respectively, were present in cultured colon organoids (Figure 2). The proportion of each cell type in cultured organoids was comparable to their known proportion in whole human colonic tissues. In 12-day cultured organoids, epithelial turnover was present and characterized by Ki67 staining in proliferative zones and active caspase-3 staining in apoptotic zones (Figure 2d and e). Interestingly, apoptosis as revealed by caspase-3 staining was predominantly observed towards the lumen of organoids. Finally, 10 to 12-days cultured human colon organoids demonstrated functional barrier properties, as observed by cobblestone organization of epithelial cells highlighted by occludin staining (Figure 2f) and by the lack of passage of fluorescent dextran 4kDa added to the medium (Figure 2g).

Organoids from IBD patients have a morphological phenotype different from healthy controls and retain some inflammatory features

Next, crypts isolated from tissues of both non-IBD and IBD patients (Crohn's and ulcerative colitis) were cultured. In IBD patients, tissues for crypt isolation were harvested at the margin of the inflamed zone, where the epithelium was still intact. Five categories of organoid structures were present in these cultures (Figure 3a). 1/ Organoids with a simple columnar epithelium, 2/ Organoids with a simple squamous epithelium, 3/ Pseudostratified epithelium 4/ Organoids with both squamous and columnar epithelium depending on the zones within the organoid and 5/ Transitional structures, where the epithelium showed no organization. The proportion of simple columnar organoids was significantly decreased in IBD patient organoid cultures compared to controls (Figure 3a). In contrast, the proportion of pseudostratified structures was significantly increased in IBD patient organoid cultures compared to controls (Figure 3a). This last observation is consistent with the fact that in tissues from IBD patients, pseudostratified epithelium is often observed in healing zones.

In addition, organoids from IBD patients had a significant smaller size than control organoids (Figure 3b). Similarly, the ratio of the number of colonoids (as opposed to colonospheres) over the total number of structures was significantly lower in organoids from IBD patients, as compared to control organoids (Figure 3c). As a matter of fact, mostly immature colonospheres were observed in cultures of organoids from IBD patients. As described above, in organoid cultures from control tissues, the organoids were polarized, with an apical side oriented towards the lumen. We called these organoids "orientated" (see Figure 3d). However, we noticed that in organoid cultures from IBD patients, a large number of organoids had an inverse orientation, with the cortical actin staining (representative of the apical side) facing outwards of the structures (photomicrograph in Figure 3d). We called these structures "inverted" and we quantified them. The proportion of inverted structures in organoid cultures from IBD patient was significantly higher than in cultures of control organoids, with nearly three times more inverted organoids (Figure 3d). Some organoids had

debris inside their lumen, most likely due to excessive cell death, while others had clear lumen (Figure 3e microphotographs). We quantified the number of these “dense” lumen structures and found their proportion significantly higher in organoid cultures from IBD patients compared to controls (Figure 3e), while the proportion of organoids with “empty” or clear lumen was significantly lower in organoid cultures from IBD patients compared to controls (Figure 3f).

The expression of functional molecules characteristic of an inflammatory phenotype was studied in organoid cultures from IBD patients and controls. First, the mRNA expression of inflammatory cytokines such as MCP1 (Figure 4a), CXCL-8 (Figure 4b), and IP-10 (not shown) was similar in colon organoids from IBD patients or controls. Second, Western blot analysis of tight junction proteins revealed a significant decreased expression of ZO1, Occludin and Claudin-1 for colon organoids from IBD patients compared to controls (Figure 4c, d, e, f).

Metabolic status of organoids was investigated by dosing ATP in organoid cultures (Figure 5). Organoids from IBD patients demonstrated a significantly reduced viability/metabolic activity status, compared to cultured organoids from control non-IBD. This significant difference was observed both at day 6 and day 9 of culture (Figure 5).

Taken together, these data demonstrated that cultured colon organoids from IBD patients have a different phenotype from non-IBD controls. After 10 to 12 days of culture, IBD epithelial organoids retained some inflammatory features, such as pseudostratification, slow growth, altered polarization and decreased expression of tight junction proteins. Interestingly, these inflammatory features appeared both in Crohn’s disease and ulcerative colitis organoid cultures.

Pro-inflammatory cocktail can induce a pro-inflammatory phenotype in control organoids

We next investigated whether inflammatory stimulation of control non-IBD organoid cultures could induce an inflammatory phenotype in cultured organoids. We stimulated control colon organoid cultures at day 3 and day 6 of cultures, with an inflammatory cocktail composed of Interleukin-1, Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF α) and Interleukin-6 (10 ng/ml each) (supplementary Figure 1). Inflammatory cocktail stimulation did not significantly change the distribution of organoid categories (columnar, squamous, pseudostratified, transitional, etc.) (Figure 3a). However, incubation with the inflammatory cocktail significantly reduced the size of organoids in cultures (Figure 3b), the proportion of colonoids (Figure 3c) and increased the number of “inverted” organoid structures (Figure 3d), while having no effect on the proportion of “dense lumen” structures (Figure 3e) or “empty lumen” structures (Figure 3f). Incubation with the inflammatory cocktail was also able to induce a significant mRNA overexpression by colon organoids of the two inflammatory chemokines MCP-1 (Figure 4a) and CXCL-8 (Figure 4b), but did not change the expression of IP-10 (not shown). Inflammatory stimulation of control non-IBD organoid cultures significantly decreased the expression of tight junction proteins ZO1, and Occludin, but not Claudin-1, compared to control (unstimulated) condition (Figure 4c, d, e, f). Finally, cell viability as observed by measurement of ATP production was also significantly reduced in control organoids incubated with the inflammatory cocktail, but this reduction was observed right after the stimulation (day 6), and did not last at day 9 (Figure 5).

Cell composition is identical between controls and inflamed organoids

We wanted to determine whether the inflammatory phenotype observed for IBD organoids and for inflammatory cocktail-stimulated organoids could be explained by different

organoid cell composition compared to controls. We therefore investigated the mRNA expression of proliferation genes (cyclin D1 and Ki67), the expression of intestinal stem cell markers (LGR5 and Ephrin B2), and the expression of differentiation markers (KRT20, Chromogranin A and MUC2). Cyclin D1 and Ki67, two proliferation markers were similarly expressed in control organoid cultures and in inflamed organoids (both inflammatory cocktail-stimulated and IBD organoids (Figure 6a and b). Intestinal stem cell markers LGR5 and Ephrin B2 were also similarly expressed in control organoids and inflamed organoids (Figure 6c and d). Finally, the differentiation markers KRT20, Chromogranin A and MUC2 were also similarly expressed in the 3 types of organoid cultures: controls non-IBD, controls non-IBD plus inflammatory cocktail, or IBD organoids (Figure 6 e, f and g).

Taken together, these results suggested that inflamed organoids have similar proliferation, stem cell and differentiation capacities compared to controls. Differences in biological activities of inflamed organoids rather than their cell composition might explain their morphological and functional differences.

Effects of clinically-used treatments on the inflammatory phenotype of human colon organoids from IBD patients

Human colon organoids from IBD patients were cultured in the presence or not of treatments currently used in the clinics: 5-ASA, methyl-prednisolone and anti-TNF (see supplementary Figure 2 for protocol). Four morphological parameters significantly altered in IBD organoid cultures compared to controls were followed: 1/ the size of organoids (Figure 7a), 2/ the proportion of colonoids (budding structures) (Figure 7b), 3/ the proportion of structures with empty lumen (Figure 7c) and 4/ the polarity of organoids (Figure 7d). Statistics could not be run in those experiments due to necessary paired analysis and the low number of patients included. Nonetheless, the purpose of these experiments was to investigate

whether clinically-used treatments can modify the inflammatory phenotype of individual patient organoid cultures towards a non-inflammatory control phenotype. Overall, considering the medians (shown by the line in each groups of Figure 7), all treatments had positive effects on some of the observed parameter, in a dose-dependent manner. However, not all treatments were efficient on all parameters.

Considering the lower size of IBD organoid structures compared to non-inflamed organoids, anti-TNF treatment and 5-ASA treatments, but not methyl prednisolone treatment were able to bring the size of some IBD organoid cultures to the level of controls (dotted line) (Figure 7a). Anti-TNF treatment was able to elevate the size of IBD organoids above controls for one patient at the lower dose, and for 2 patients at the highest dose. Lower dose of 5-ASA elevated the size of organoids to control level for two patients, and the highest 5-ASA dose for only one patient (Figure 7a). The positive effects of 5-ASA and anti-TNF treatments on the size of IBD organoids were observed both on Crohn's and ulcerative colitis organoid cultures (Figure 7a).

IBD organoid cultures showed a very low proportion of budding structures compared to controls. This is characterized by low counts of colonoids (Figure 3c, and Figure 7b). All three treatments (anti-TNF, methyl prednisolone and 5-ASA) were able to bring the proportion of colonoids to control levels in some patients: in 3 patients out of 7 for the anti-TNF treatment, in 3 patients out of 6 for the methyl prednisolone treatment and in 2 patients out of 5 for the 5-ASA treatment (Figure 7b). Positive effects of treatments on colonoid counts were observed both in Crohn's disease and ulcerative colitis organoid cultures (Figure 7b).

The number of empty lumen structures in organoid cultures was significantly decreased in IBD organoids compared to non-inflamed organoids (Figure 3f). This decreased

proportion of organoids with clear lumen could be reversed by all treatments. The anti-TNF treatment was able to reverse this effect in 4 patients out of 7, the methyl prednisolone treatment in 3 patients out of 6, and the 5-ASA treatment in 2 patients out of 5 (Figure 7c). For this parameter as well, the positive effect of treatments was observed similarly in Crohn's disease and ulcerative colitis organoid cultures (Figure 7c).

Finally, it was observed that organoids from IBD patients had an increased inverted polarization compared to non-inflamed controls (Figures 3d and 7d). Treatment with anti-TNF reduced the number of inverted organoids to control level (dotted line) in 3 from 6 IBD organoid cultures that were above the control level. Methyl prednisolone treatment reduced the number of inverted organoids to control level in only one IBD organoid culture that was above control level without treatment. Treatment with 5-ASA did not bring back to control level the two IBD organoid cultures that showed elevated inverted organoids in absence of treatment (Figure 7d). The positive effect of treatment was observed similarly in Crohn's disease and ulcerative colitis organoid cultures (Figure 7d).

When considered per patient, these results highlight IBD patient cultures that are not responding to any forms of treatments (cross symbol patient). Interestingly, this patient had uncontrolled Crohn's disease. In contrast, other IBD patient organoid cultures responded positively for all parameters (size, colonoid inverted or clear structure proportions) (star symbol patient).

DISCUSSION

The present study brings a number of new and important information on organoid cultures. It characterizes both morphological and gene expression changes in organoid cultures from IBD patients, compared to organoid cultures from the colon of non-IBD

individuals. Importantly, these data demonstrated that even after 10 to 12 days of culture, and in absence of any immunological stimulation, crypt stem cells isolated from IBD tissues regrow abnormal epithelium. This could be due to the long-term impregnation to inflammatory mediators of crypts isolated from IBD patient tissues. To grow organoids, tissues were harvested at the margin of inflamed tissues in non-inflamed zones. This choice was made in order to be certain that the isolated epithelium would be intact of ulcers and that sufficient and reproducible crypt numbers would be isolated. Therefore, isolated crypts might have been exposed chronically to adjacent inflammatory mediators. Such chronic exposure of intestinal epithelium to inflammatory mediators could induce epigenetic changes that are conserved in organoid cultures even in the absence of inflammatory mediators. Indeed, epigenetic variations have been identified in tissues from IBD patients[11, 12]. Epigenetic studies of cultured organoids from IBD patients would certainly bring important responses to this question. Interestingly, another recent study performed with organoid cultures from ulcerative colitis patients also suggests an imprinting of IBD stem cells[13]. In that study, authors identified a set of genes that exhibited sustained differential expression in cultured organoids from ulcerative colitis patients. These genes include LYZ, CLDN18, hZG16, hCLCA1, MUC12 and AQP8, which are involved in antimicrobial, barrier, mucus production or water transport functions. Another study recently confirmed that differential expression of mucus production gene (MUC2) is observed in organoids from IBD patients, and in particular from Crohn's disease patients, compared to controls[14]. Taken together, such data implies that long-lasting epithelial defects are present in IBD patient epithelium, and may be acquired during the course of the disease thereby contributing to the perpetuation of the pathology. Another hypothesis to explain the IBD phenotype in organoid cultures, is that some genetic mutations that have been associated with IBD are involved in architectural organization of the colonic epithelium, conferring a permanent epithelial phenotype. Large-scale genome-wide

association studies have identified more than 200 loci associated with IBD[15]. Some of these genes are involved in innate immune response, impaired mechanisms of phagocytosis and autophagy, T cell signaling, but also epithelial barrier function[16]. For instance, genes such as *ECM1*, *CDH1*, *LAMB1*, *ADAM17A*, *KIND1/FERMT1* or *HNF4 α* are known to be involved in barrier function and single nucleotide polymorphism has been associated with IBD for these genes[17, 18, 19]. If such polymorphism is associated with a functional phenotype of impaired barrier function, then this could explain the decreased expression of tight junction proteins we observed in cultured organoids. The *OSMR* gene coding for the Oncostatin M receptor is also associated with IBD and is known to promote epithelial cell proliferation. Here again, such mutation could explain the smaller size of IBD organoids we observed[19, 20]. Mutations in the type VII collagen gene *COL7A1* are associated with IBD[21, 22]. Considering the major role of type VII collagen in keratinocyte polarity[23], a similar role could be proposed in intestinal epithelial cells, although no studies have yet investigated such role in this cell type. The inverted phenotype that we observed in 70% of IBD organoids could be explained by such mutation. Future studies will be needed to investigate the association of IBD gene polymorphism with specific organoid culture phenotype.

Our results generated with IBD patient organoid cultures suggested that inflamed organoids have similar proliferation, stem cell and differentiation capacities compared to controls. This was evidenced by the conserved expression of proliferation genes cyclin D1 and Ki67, of intestinal stem cell markers LGR5 and Ephrin B2, and of differentiation markers KRT20, Chromogranin A and MUC2. Similar results were reported by a recent study in which, organoid cultures from ulcerative colitis patients were compared to organoid cultures from non-inflamed controls, showing similar self-renewal capacity and comparable molecular features[13].

A second important point highlighted by the present study is that the phenotype of inflamed organoid can be recapitulated *in vitro*, by exposing control organoids to an inflammatory cocktail. We showed that a cytokine cocktail induced in control organoid cultures, the same size reduction, inverted phenotype, decreased proportion of colonoids, ZO-1 and Occludin decreased expression, decreased metabolic activity as it was observed in IBD patient organoid cultures. This suggests that *in vivo* as well, these parameters might be under the long-term control of inflammatory mediators. However, some other features of IBD organoids were not recapitulated in control organoids exposed to the inflammatory cocktail. This involves the increased presence of apoptotic debris in the lumen of IBD organoids, and their decreased expression of Claudin-1. This means that for these parameters, short-term exposure to inflammatory mediators might not be sufficient to induce the phenotype. Rather, genomic imprinting or mutation might be involved to induce these epithelial phenotypes. Indeed, a frequent occurrence of private variants of the X-linked inhibitor of apoptosis protein has been associated with Crohn's disease[24]. Importantly, some inflammatory features such as chemokine (CXCL-8 and MCP-1) release are induced by transient exposure to inflammatory cocktail, but are not maintained in IBD organoid cultures (Figure 4a and b). This means that in the context of IBD, the regulation of those genes does not depend on long-term imprinting or gene mutation, but is a consequence of acute inflammatory response. Therefore, this model of stimulated organoid culture appears as a unique new tool that will help defining intestinal epithelium gene regulation by individual or combined mediators. In addition, it will clearly serve to screen the efficacy of new therapeutic approaches targeting the effects of inflammatory mediators on epithelial repair.

A third major point raised by the present study is the demonstration that IBD organoid cultures could be used to test the effects of therapeutic options on epithelial biology. We demonstrated that overall, all treatments (anti-TNF, corticosteroids and 5-ASA) had positive

impact on the observed parameters in a dose-dependent manner. This is important as it means that such treatments could participate at least to some extent, to epithelial regeneration and repair. The fact that these treatments positively impacted inflamed IBD organoid cultures seems surprising as these treatments were originally developed to target the immune response. However, recent studies It was interesting to note that not all treatments were efficient on the same parameters, and also that some treatments could be more efficient than others in some patients. This first result paves the way to a more extensive study, including large numbers of patients that could aim at defining whether the response of culture organoids could be predictive of the patient's response to treatment. Similarly, the effects of new therapeutic options focusing on epithelial repair could therefore be tested directly in tissues from patients, and their efficiency could be compared to that of clinically used treatments.

In conclusion, the extensive characterization of colon organoid cultures from IBD patients compared to non-IBD controls that we have performed in the present study brings important new knowledge. First, it demonstrates the possible use of such model to further characterize epithelial dysfunctions associated with IBD. Second, we showed that this model constitutes a reliable human preclinical model to investigate new therapeutic approaches targeting epithelial repair.

Acknowledgements

The authors thank for technical assistance Anissa Edir-Kribi, Daisy Jonkers, and Elhaseen Elamin, for administrative assistance Madame Helene Weiss, and the COST Action BM1106 GENIEUR for support through the student exchanges program.

Grant support

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (R12177BB to NV), the Region Midi-Pyrénées (to NV), by the European Research Council (ERC-2012-StG-20111109) (to NV), by the FUI (Fond Unique Interministeriel) Program ORGANOCAN-2 financed by the Region Midi-Pyrenees, the “Banque Publique d’Investissement” of France, Toulouse-Metropole, and the “Conseil Departemental du Tarn”. Tissue collection was financially supported by the “Délégation Régionale à la Recherche Clinique des Hôpitaux de Toulouse”, through the MICILIP project.

Figure 1: *Ex vivo* culture of human colon crypts from control patients. All images were acquired with SP8 confocal microscope at 20X and 63X objectives and analyzed by Image J software. **(a)** Isolated colon crypts at day 0 (left panel), and after 10 to 12 days of culture (middle and right panels) (scale bar 100 μm). Colored confocal pictures shows DAPI nuclei labeling (cyan) in a 3D reconstruction. Ten to 12-days cultures showed either perfectly rounded structures called colonospheres (middle panel), or budding structures called colonoids (right panels). **(b)** β -catenin labeling (green) stained basolateral side (BL) and actin labeling (blue) stained apical side (A) of organoid epithelial cell monolayers, defining a central lumen, in cross section of colonospheres (left panel) and colonoids (right panel) (scale bar 10 μm). Arrows indicated buds.

Figure 2: Human colon organoid cell type composition and organoid sealing observation. Colonosphere cross sections are shown for each staining, and all images were acquired with SP8 confocal microscope at 63X objectives and analyzed by Image J software, after 10 days of culture of control organoids. Scale bar 10 μm (a-g). **(a)** DAPI nucleus (cyan) and cytokeratin 20 (red) staining for colonocytes, **(b)** DAPI nucleus (cyan) and chromogranin A (pink) staining for enteroendocrine cells, **(c)** DAPI nucleus (cyan), mucin 2 (yellow) staining for goblet cells, **(d)** DAPI nucleus (red) and ki67 (green) staining for proliferative cells, **(e)** DAPI nucleus (cyan) and active caspase 3 (red) staining for apoptotic cells, **(f)** Occludin staining (red) for tight junction labeling **(g)** One colonosphere

cultivated in the presence of FITC-4KDa (green) in bright field (left) or fluorescence (right) microscopy.

Figure 3: Morphological differences between control and inflamed colon organoids. All images were acquired with SP8 confocal microscope at 20X and 63X objectives and analyzed by Image J software. Red lines on graphs represented medians. P value <0.05 for *, <0.01 for **, and <0.005 for ***(One-way Anova, Kruskal Wallis, and Dunns). **(a)** Morphological classification of cultured organoids in subgroups: simple columnar, simple squamous, pseudostratified columnar, simple squamous and columnar, and transitional. Control organoids derived from non-IBD patients were represented by black signs, blue signs represented control organoids treated with an inflammatory cocktail (IL-1 β , TNF- α , and IL-6, at 10 ng/ml) from day 3 to day 10. Organoids derived from IBD patient tissues were represented in red: light red for Ulcerative Colitis, dark red for Crohn's disease. An average of 20 organoids per patient was imaged and analyzed. Medians were represented by red lines. P value <0.05 (One way anova, Kruskal Wallis, and Dunns). For b, c, d, e and f, control organoids cultured from non-IBD patient tissues were represented by circles, square signs represented control organoids treated with an inflammatory cocktail (IL-1 β , TNF- α , and IL-6, at 10 ng/ml) from day 3 to day 10, and organoids derived from IBD patient tissues were represented by triangles: open symbols for Ulcerative Colitis and closed symbols for Crohn's disease. **(b)** Average size of organoids (μ m). **(c)** The number of colonoids (budding structures) per total number of organoids (colonospheres plus colonoides each represented on right panel). **(d)** DAPI nucleus (cyan) and actin (blue) labeling were used in cross sections of organoid cultures (right panels) to visualize oriented (actin labeling towards the lumen) (right upper panel) and inverted organoids (actin labeling outwards the lumen) (right bottom panel) (scale bar 100 μ m). On the left panel, the number of inverted organoids per total number of organoids (oriented plus inverted) was represented. **(e)** Nuclei labeling in cross sections of organoids to visualized empty (right upper panel) and dense (right bottom panel) lumen, the arrow showed the presence of debris in the lumen. The number of organoids with dense lumen per total number of organoids (empty, dense, and without lumen) was represented on the left panel. **(f)** The number of organoids with empty lumen per total number of organoids (empty, dense and without lumen).

Figure 4: Chemokine (MCP-1 and CXCL-8) and tight junction molecule (ZO-1, Occludin and Claudin-1) mRNA and protein expression respectively, in controls (circles), controls exposed to an inflammatory cocktail (IL-1 β , TNF- α , and IL-6, at 10 ng/ml) from day 3 to day 10 (squares) and organoids from IBD patients (triangles): ulcerative colitis (UC) patients (opened triangles) and Crohn's disease (CD) patients (closed triangles). mRNA or proteins were extracted from organoids after 10 days of culture and data were normalized by GAPDH or actin expression respectively. Red lines represented medians. P value <0.05 for *, <0.01 for **, and <0.005 for *** (One-way Anova, Kruskal Wallis, and Dunns). (a) MCP1 mRNA expression. (b) IL-8 mRNA expression. (c) Representative Western-blot of the ZO-1, Occludin, Claudin-1 and Actin protein expression in tissues from 3 representative samples from controls (non-IBD), and IBD (Crohn's disease: CD, and ulcerative colitis: UC) patients. (d) Quantification of ZO-1 relative protein expression. (f) Quantification of Occludin relative protein expression. (g) Quantification of Claudin relative protein expression.

Figure 5: Concentration of ATP release per surface of total organoids as a measure of metabolic activity/cell survival in organoids cultured for 6 and 9-days and harvested from control (non-IBD) patients (circles), control (non-IBD) organoids exposed to inflammatory cocktail (IL-1 β , TNF- α , and IL-6, at 10 ng/ml) from day 3 to day 10 (squares) and organoids from IBD patients (triangles): ulcerative colitis (UC) patients (opened triangles) and Crohn's disease (CD) patients (closed triangles). Red lines represented medians. P value <0.05 for * and <0.01 for ** (One-way Anova, Kruskal Wallis, and Dunns).

Figure 6: mRNA expression of proliferation markers (Cyclin D1 and Ki67), immaturity markers (LGR5 and Ephrin B2), and differentiation markers (Carbonic Anhydrase-1: CA1, Cytokeratine-20: KRT20, and Mucin 2: MUC2) in 10-days cultured organoids from controls (circles), control organoids exposed to inflammatory cocktail (IL-1 β , TNF- α , and IL-6, at 10 ng/ml) from day 3 to day 10 of cultures (squares) and organoids from IBD patients (triangles): ulcerative colitis (UC) patients (opened triangles) and Crohn's disease (CD) patients (closed triangles). Data were normalized to GAPDH. Red lines in graphs represented medians. No statistical significant difference was observed.

Figure 7: Effects of different treatments used in clinics on the morphological characteristics of IBD organoids. IBD organoids were derived from IBD patients. Crohn's disease (CD) patient organoids were represented with closed symbols and ulcerative colitis (UC) patient organoids by opened symbols. One patient was represented by the same symbol in all figure panels. IBD organoids were treated from day 0 to day 10 with anti-TNF (Remicade) at 1, 10 and 100 μM , or methyl-prednisolone (Solupred) at 10 and 100 μM , or 5-ASA (Pentasa) at 50 and 500 μM . An average of 20 organoids was studied per condition per patient. Medians were represented by red lines on graphs. Dotted lines represented for each criteria, the median measured for this criteria in control (non-IBD), non-treated organoid cultures. Statistics were not performed on these graphs due to the low n number in each group. **(a)** Average size of organoids (μm) **(b)** Number of colonoids (budding structures) per total number of organoids (colonospheres plus colonoids) **(c)** Number of organoids with empty lumen per total number of organoids (empty, dense and without lumen). **(d)** Number of inverted organoids per total number of organoids (oriented plus inverted).

Supplementary Table 1: Characteristics and outcomes of control and IBD patients

Supplementary Table 2: Antibodies used for immunofluorescence labeling (IF) and western blot (WB) studies.

Supplementary Table 3: Primers used for quantitative RT-PCR studies (from 5' to 3').

Supplementary Figure 1: Protocol for the culture of organoids from IBD and non-IBD patients. Inflamed organoids were obtained from colon biopsies or resection of IBD patients. But inflamed organoids could be obtained from control patients. When control organoids were formed (at day 3) a chronic inflammatory stress (IL-1 β , TNF- α , and IL-6, at 10 ng/ml) was applied at each change of medium. After 10 days of culture morphological and functional study was performed as well as expression of pro-inflammatory mediators or expression of tight junction proteins.

Supplementary Figure 2: Inflamed organoids obtained from colon biopsies or resection of IBD patients were subjected or not to a clinical treatment (anti-TNF (10 or 100 μ M); methyl-prednisolone (10 or 100 μ M); 5-ASA (50 or 500 μ M)). Treatments were added at day 0 and at each medium change. After 10 days of culture morphological study was performed.

References

- 1 Panaccione R, Ferraz JG, Beck P. Advances in medical therapy of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Pharmacol* 2005;**5**:566-72.
- 2 Neurath MF. Current and emerging therapeutic targets for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;**14**:269-78.
- 3 Burisch J, Jess T, Martinato M, Lakatos PL, EpiCom E. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis* 2013;**7**:322-37.
- 4 Peyrin-Biroulet L, Ferrante M, Magro F, Campbell S, Franchimont D, Fidder H, *et al.* Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO. I: Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2011;**5**:477-83.
- 5 Baumgart DC, Vierziger K, Sturm A, Wiedenmann B, Dignass AU. Mesalamine promotes intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism. *Scand J Gastroenterol* 2005;**40**:958-64.
- 6 Fischer A, Gluth M, Pape UF, Wiedenmann B, Theuring F, Baumgart DC. Adalimumab prevents barrier dysfunction and antagonizes distinct effects of TNF-alpha on tight junction proteins and signaling pathways in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013;**304**:G970-9.
- 7 Fischer A, Gluth M, Weege F, Pape UF, Wiedenmann B, Baumgart DC, *et al.* Glucocorticoids regulate barrier function and claudin expression in intestinal epithelial cells via MKP-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;**306**:G218-28.
- 8 Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science* 2013;**340**:1190-4.
- 9 Cenac N, Bautzova T, Le Faouder P, Veldhuis NA, Poole DP, Rolland C, *et al.* Quantification and Potential Functions of Endogenous Agonists of Transient Receptor Potential Channels in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 2015;**149**:433-44 e7.
- 10 Rolland-Fourcade C, Denadai-Souza A, Cirillo C, Lopez C, Jaramillo JO, Desormeaux C, *et al.* Epithelial expression and function of trypsin-3 in irritable bowel syndrome. *Gut* 2017.
- 11 McGovern DP, Kugathasan S, Cho JH. Genetics of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2015;**149**:1163-76 e2.
- 12 Kellermayer R. Epigenetics and the developmental origins of inflammatory bowel diseases. *Can J Gastroenterol* 2012;**26**:909-15.
- 13 Dotti I, Mora-Buch R, Ferrer-Picon E, Planell N, Jung P, Masamunt MC, *et al.* Alterations in the epithelial stem cell compartment could contribute to permanent changes in the mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 2016.
- 14 Noben M, Verstockt B, de Bruyn M, Hendriks N, Van Assche G, Vermeire S, *et al.* Epithelial organoid cultures from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease: a truly long-term model to study the molecular basis for inflammatory bowel disease? *Gut* 2017.
- 15 Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, *et al.* Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet* 2015;**47**:979-86.
- 16 Prager M, Buettner J, Buening C. Genes involved in the regulation of intestinal permeability and their role in ulcerative colitis. *J Dig Dis* 2015;**16**:713-22.
- 17 Blaydon DC, Biancheri P, Di WL, Plagnol V, Cabral RM, Brooke MA, *et al.* Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *N Engl J Med* 2011;**365**:1502-8.
- 18 Kern JS, Herz C, Haan E, Moore D, Nottelmann S, von Lilien T, *et al.* Chronic colitis due to an epithelial barrier defect: the role of kindlin-1 isoforms. *J Pathol* 2007;**213**:462-70.
- 19 Bianco AM, Girardelli M, Tommasini A. Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms. *World J Gastroenterol* 2015;**21**:12296-310.

- 20 Beigel F, Friedrich M, Probst C, Sotlar K, Goke B, Diegelmann J, *et al.* Oncostatin M mediates STAT3-dependent intestinal epithelial restitution via increased cell proliferation, decreased apoptosis and upregulation of SERPIN family members. *PLoS One* 2014;**9**:e93498.
- 21 Uhlig HH. Monogenic diseases associated with intestinal inflammation: implications for the understanding of inflammatory bowel disease. *Gut* 2013;**62**:1795-805.
- 22 Freeman EB, Kogelmeier J, Martinez AE, Mellerio JE, Haynes L, Sebire NJ, *et al.* Gastrointestinal complications of epidermolysis bullosa in children. *Br J Dermatol* 2008;**158**:1308-14.
- 23 Dayal JH, Cole CL, Pourreyron C, Watt SA, Lim YZ, Salas-Alanis JC, *et al.* Type VII collagen regulates expression of OATP1B3, promotes front-to-rear polarity and increases structural organisation in 3D spheroid cultures of RDEB tumour keratinocytes. *J Cell Sci* 2014;**127**:740-51.
- 24 Zeissig Y, Petersen BS, Milutinovic S, Bosse E, Mayr G, Peuker K, *et al.* XIAP variants in male Crohn's disease. *Gut* 2015;**64**:66-76.

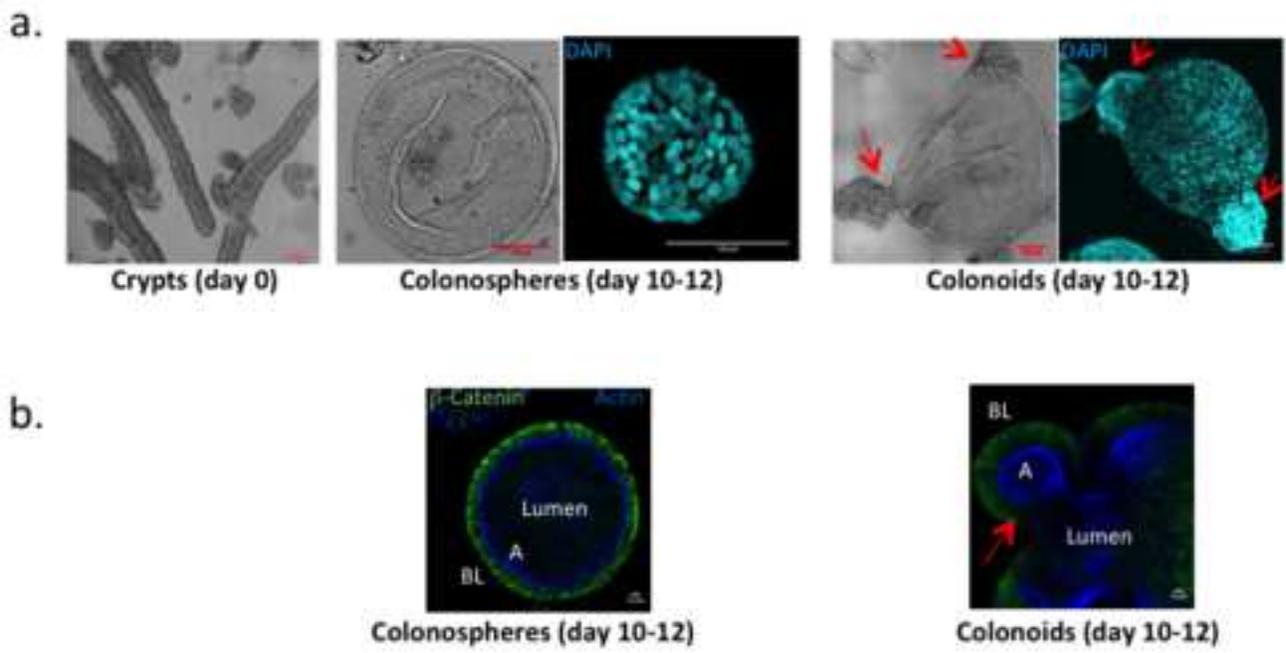
Figure 1

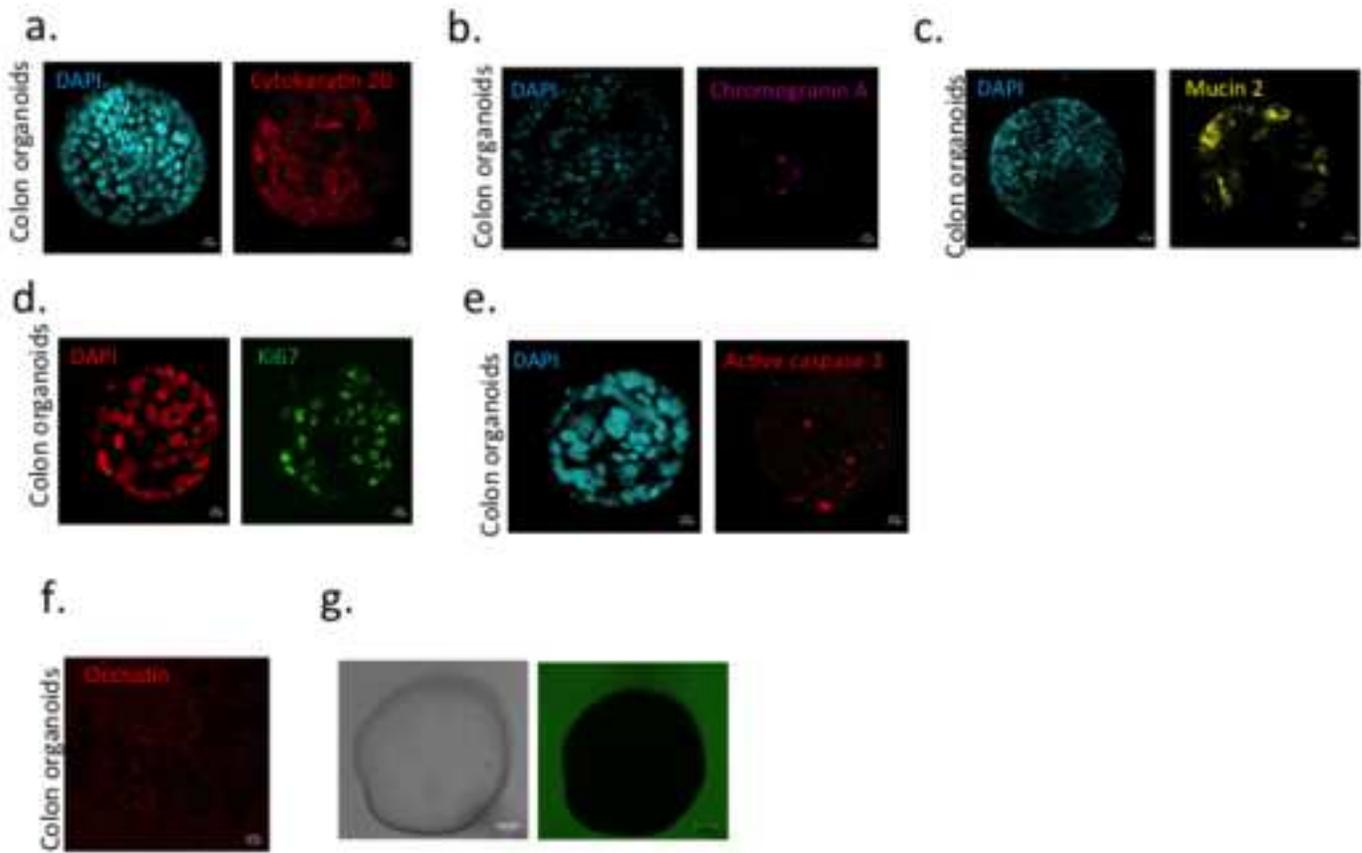
Figure 2

Figure 3

a.

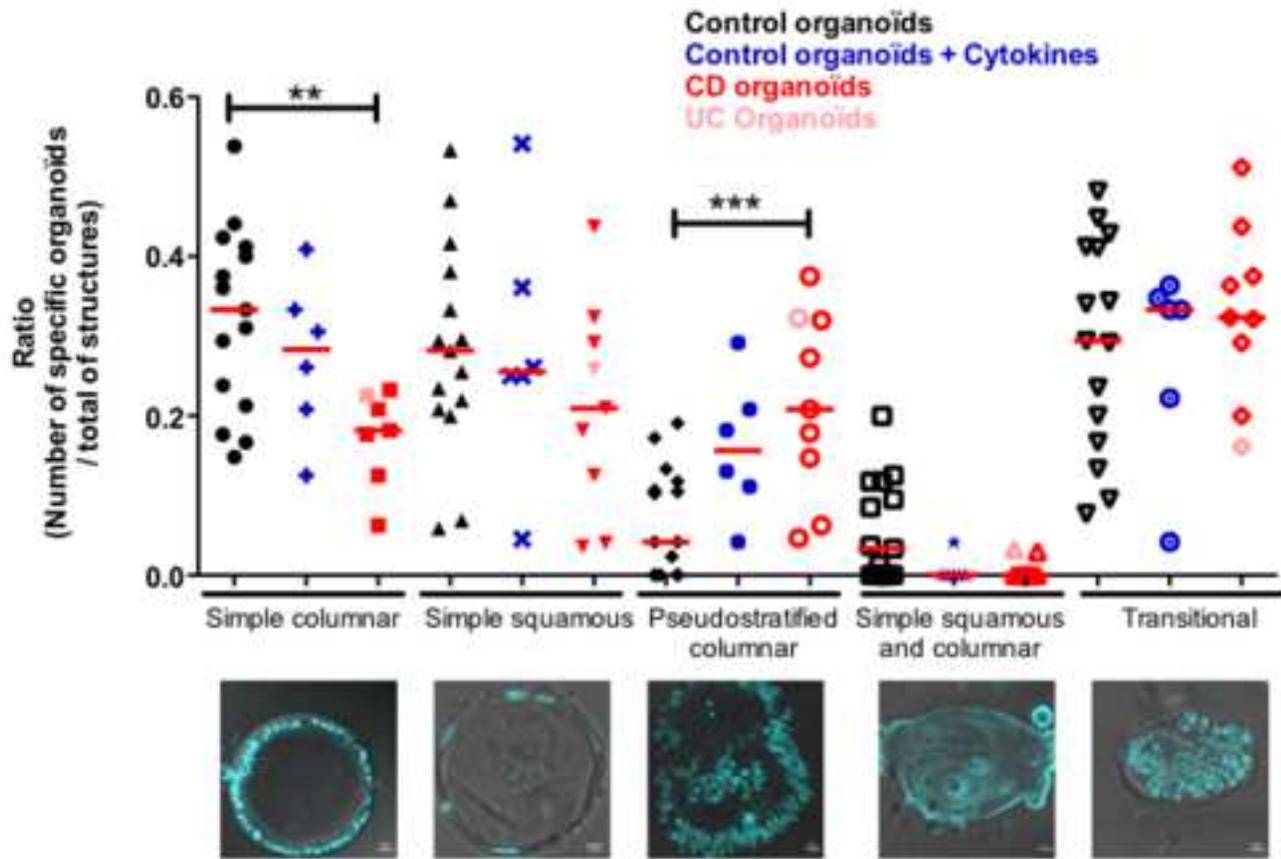


Figure 3

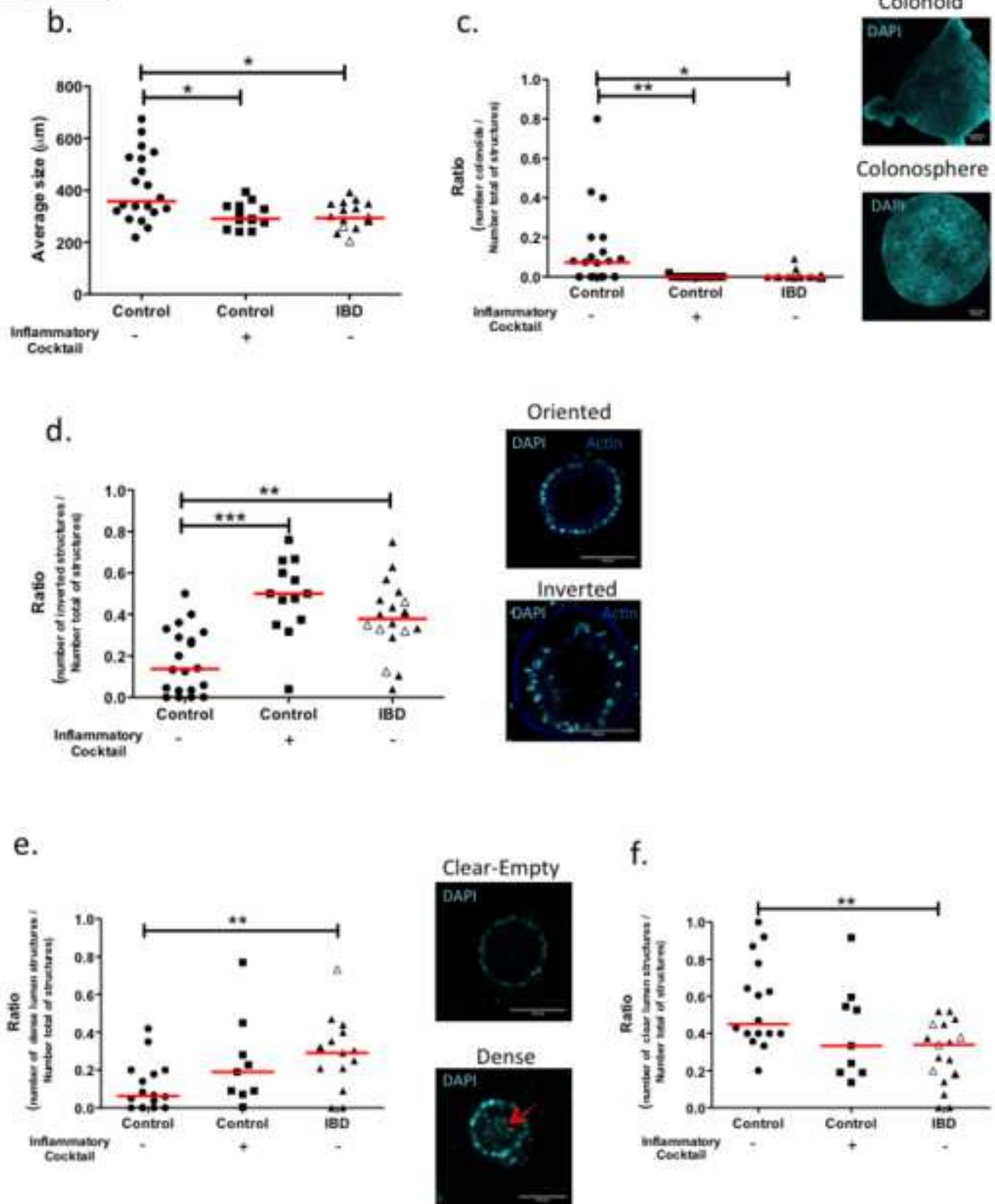


Figure 4

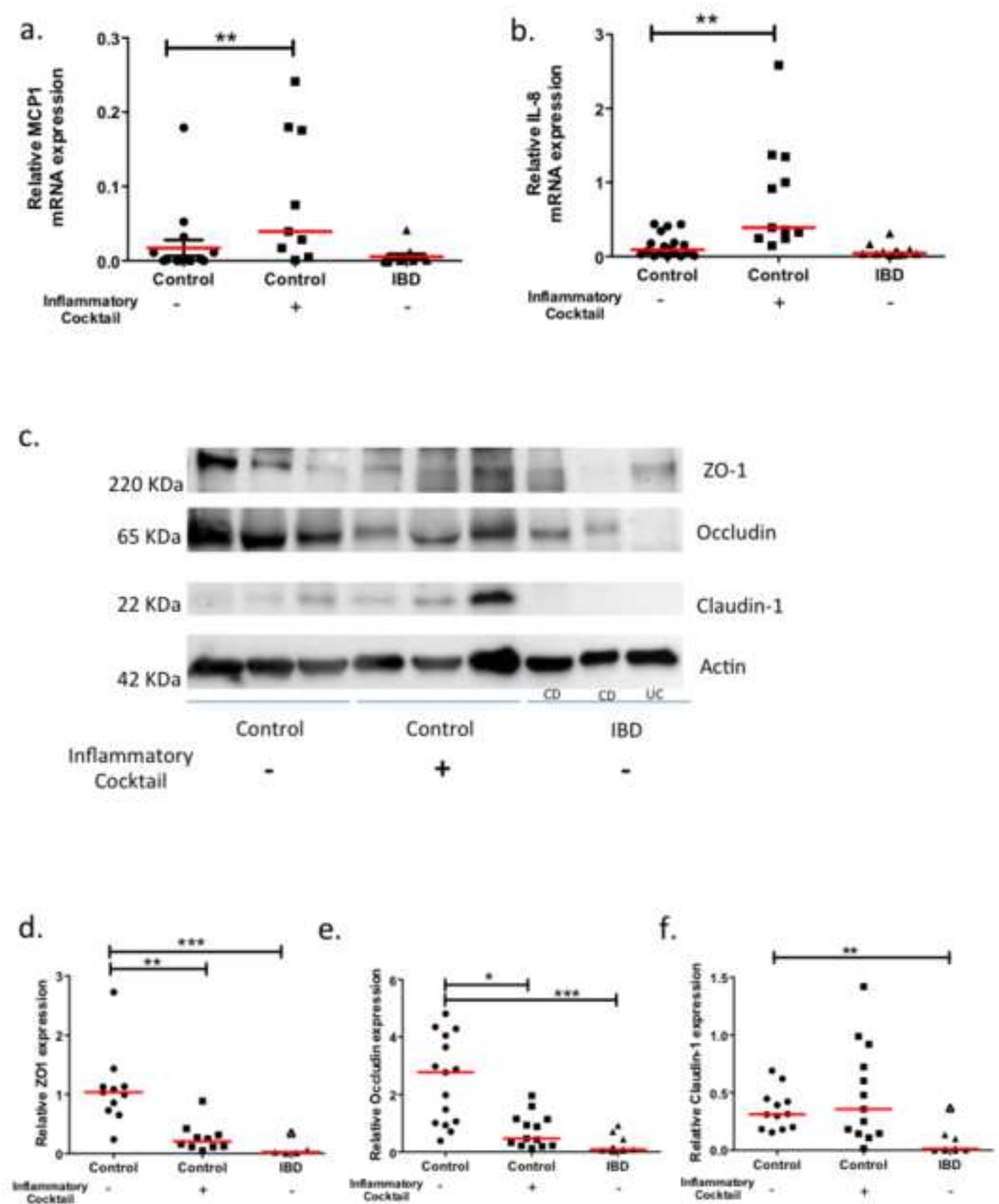


Figure 5

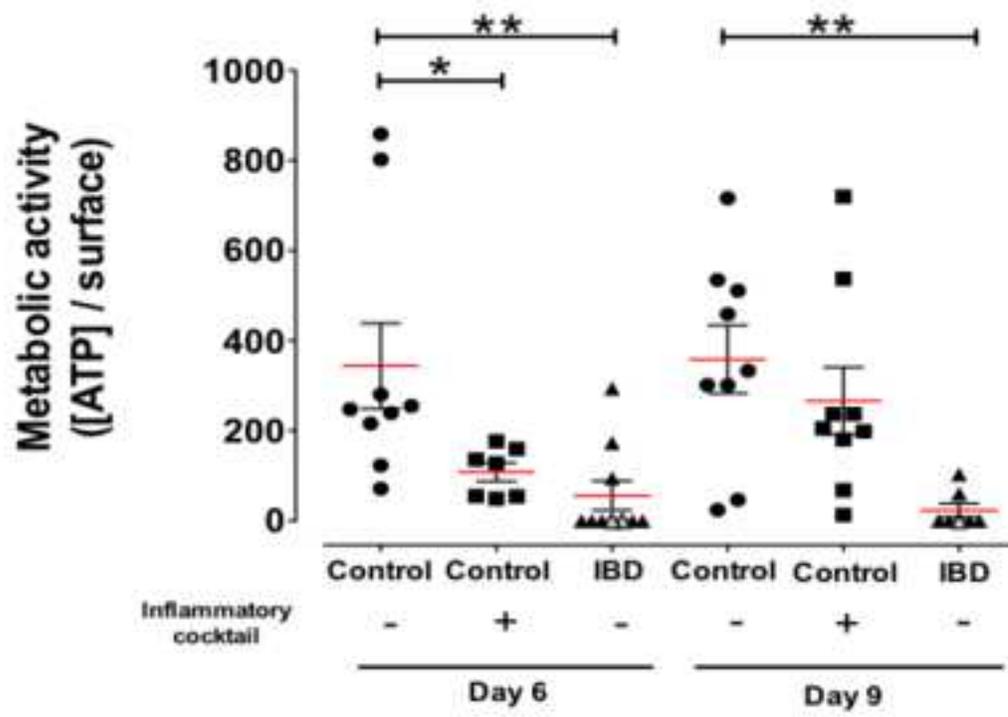


Figure 6

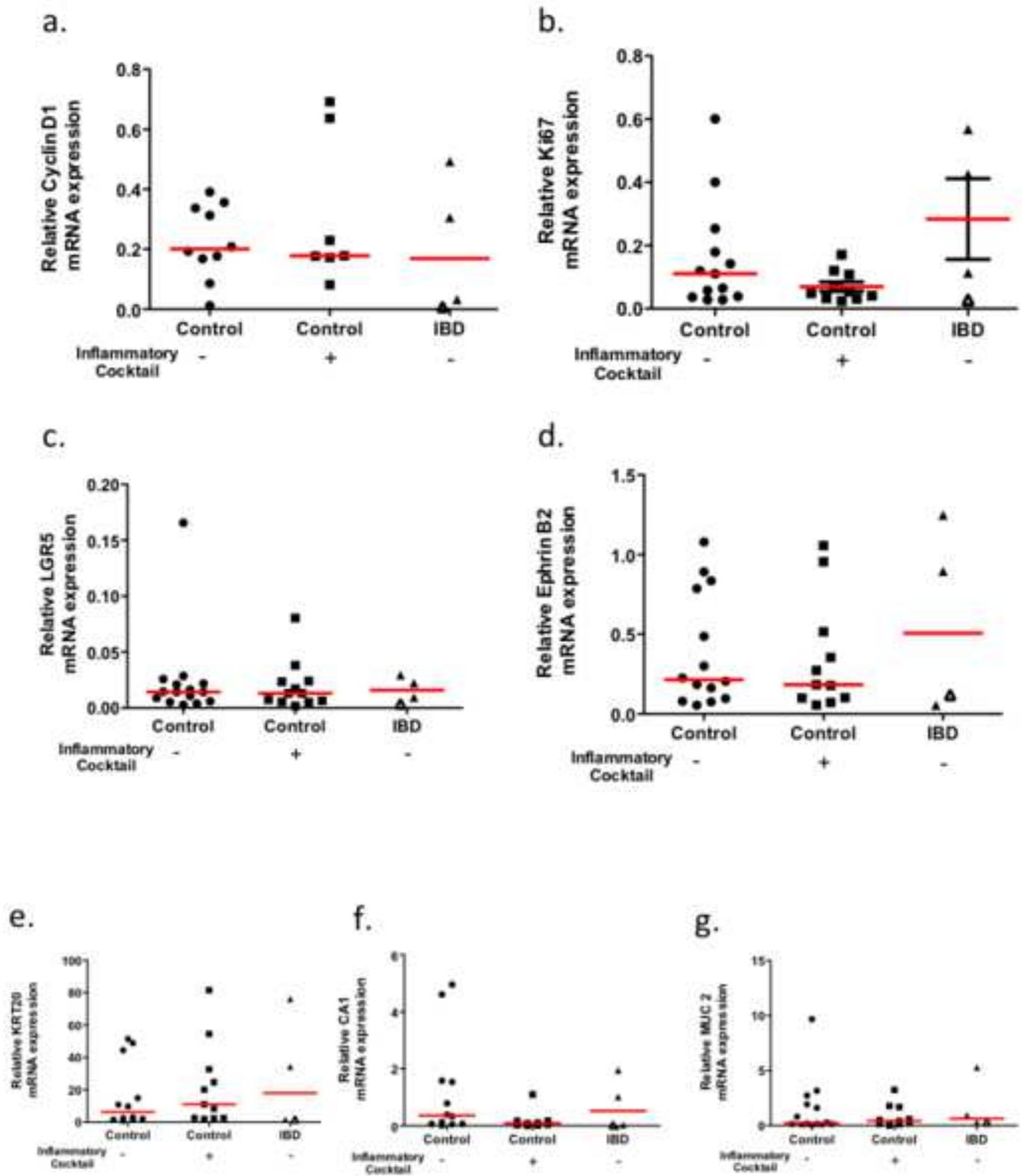
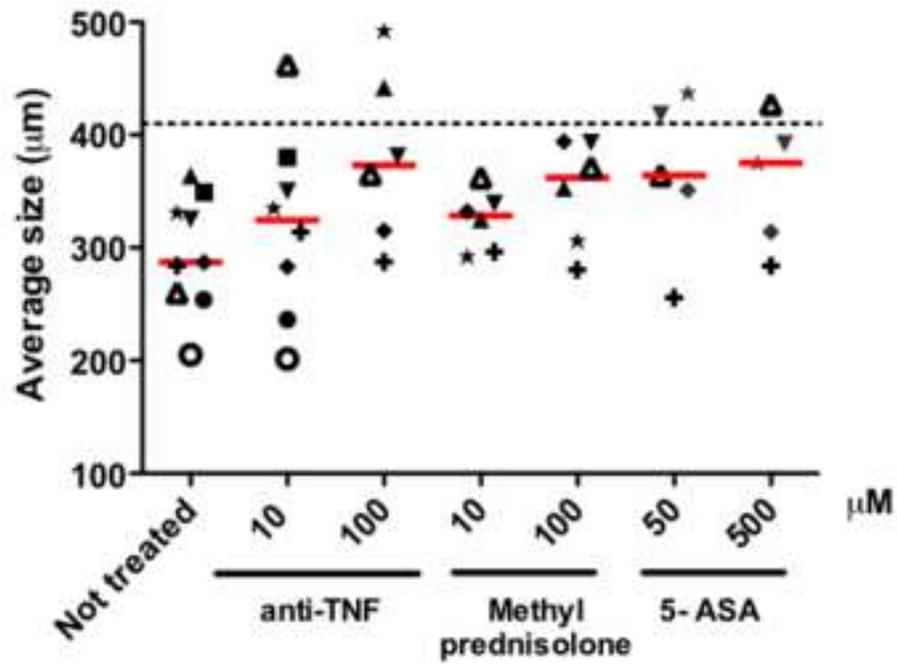


Figure 7

a.



b.

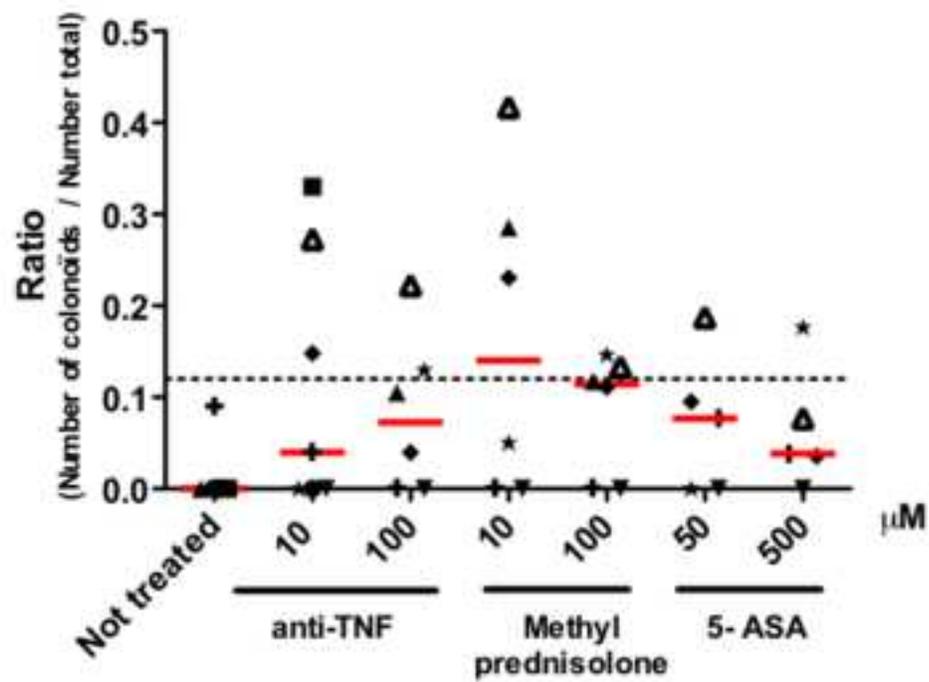
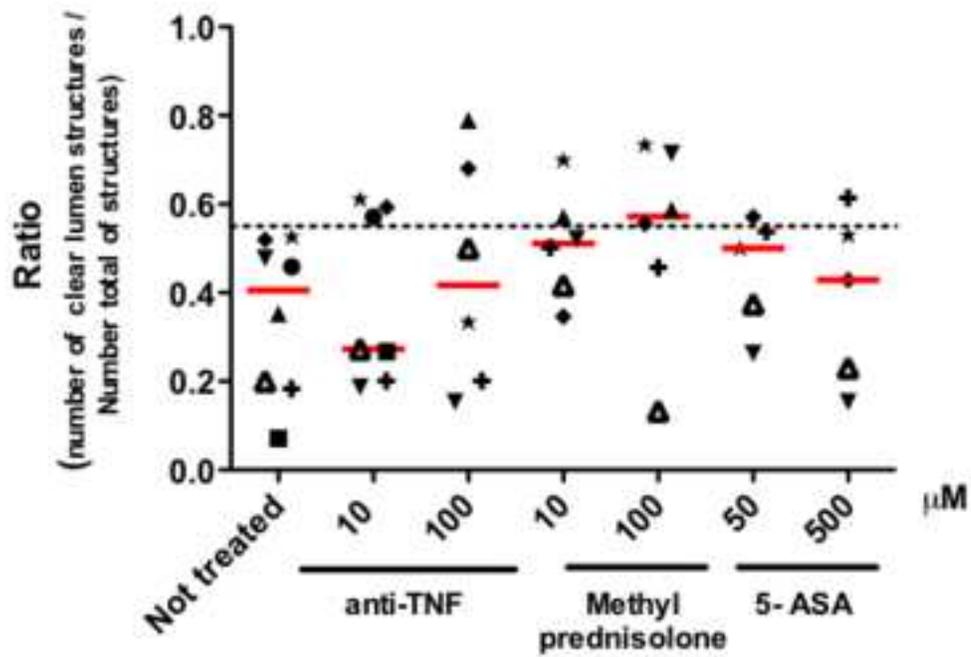
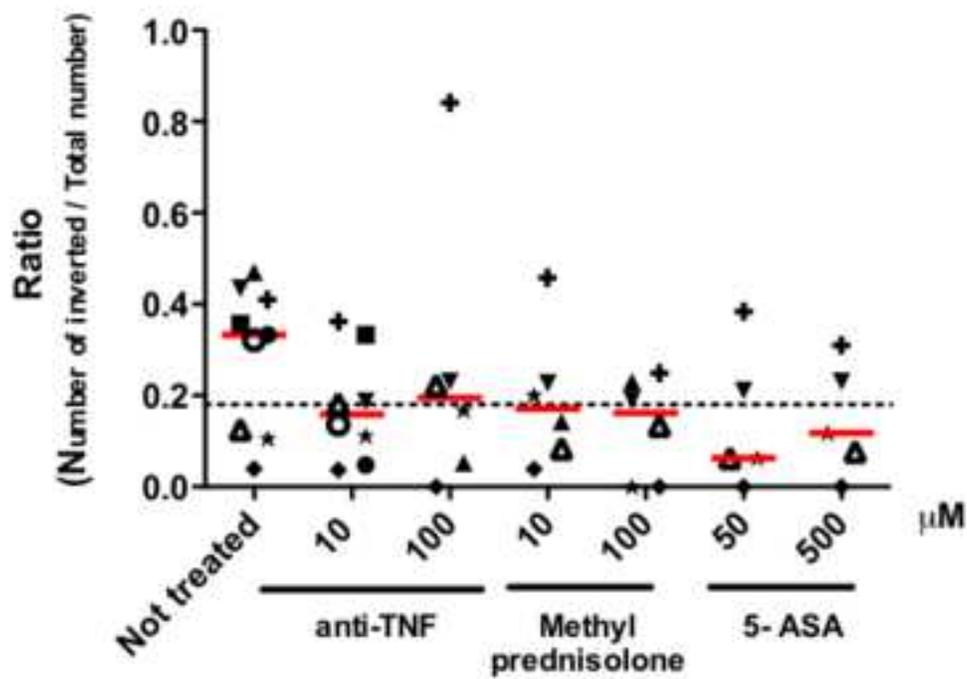


Figure 7

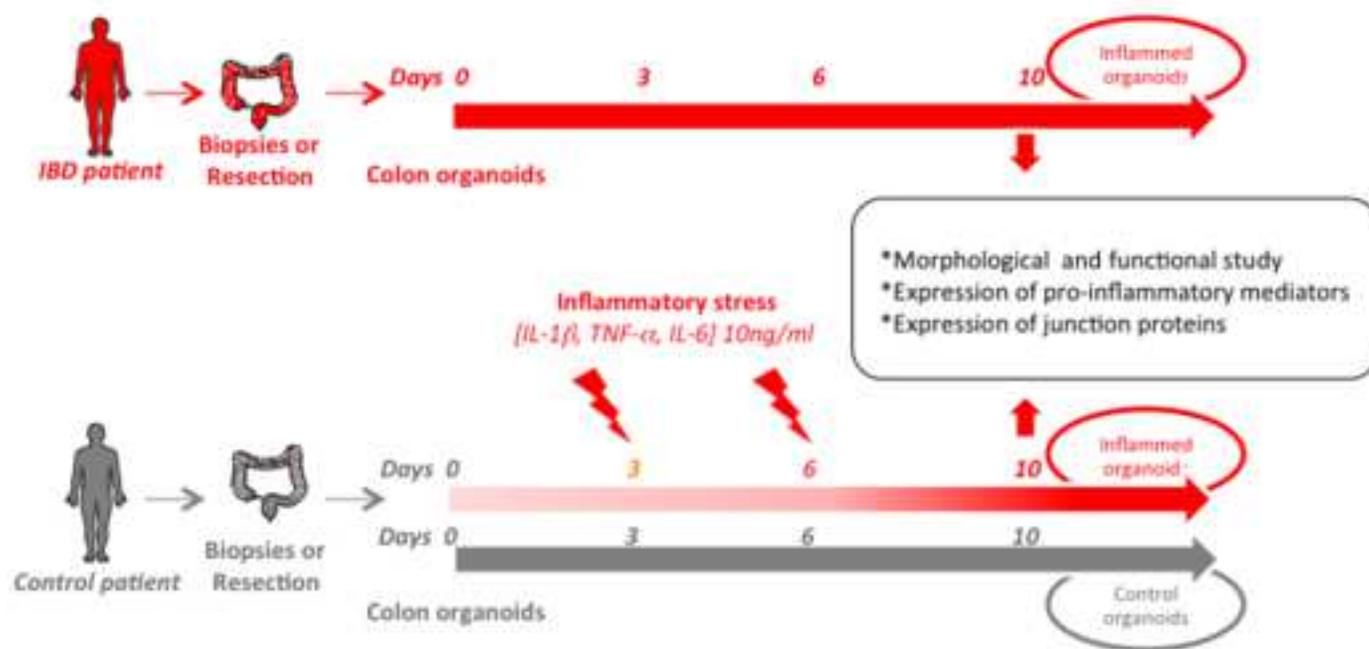
c.



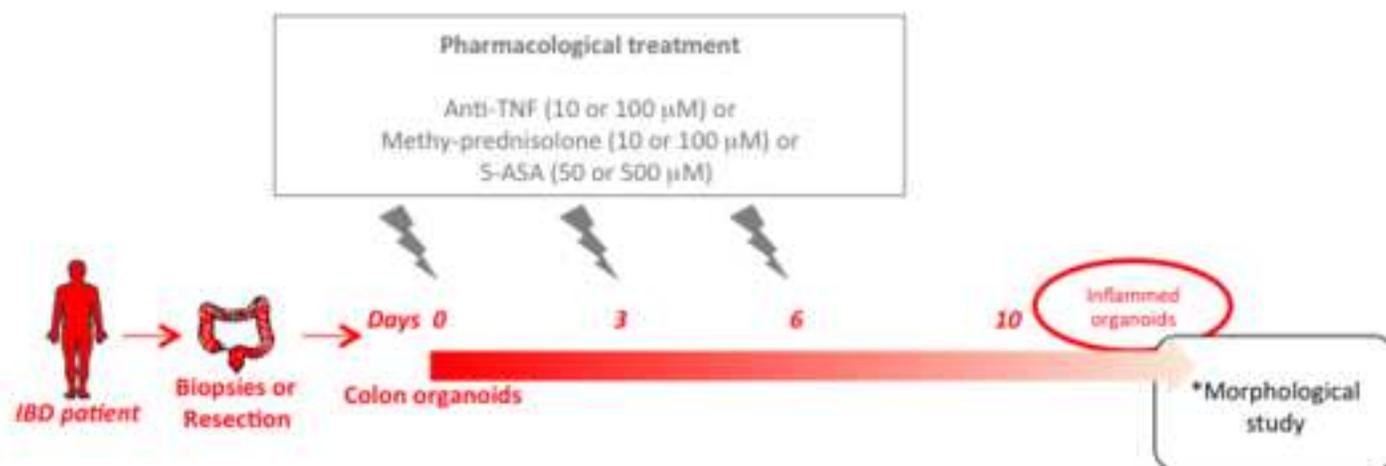
d.



Supplementary figure 1:



Supplementary figure 2:



Supplementary Table 1:

	Crohn's disease n=26	Ulcerative colitis n=8	Non-IBD n=18
Age (year)	40.4 ± 11.8	45.8 ± 14.9	58.2
Sex ratio	16/10	5/3	11/7
IBD duration (year)	11.9 ± 7.3	7.1 ± 4.9	NA
Material (surgical resection/colonoscopy)	13/13	6/2	18/0
Hb level (g/L)	135 ± 19 (n=23)	128 ± 22 (n=8)	ND
CRP (mg/L)	10.3 ± 14.0 (n=18)	21.9 ± 32.2 (n=5)	ND
Treatments			
5ASA	3 (12%)	4 (50%)	NA
Steroids	2 (8%)	5 (31%)	NA
Immunosuppressors	8 (31%)	2 (25%)	NA
Biotherapy	17 (65%)	4 (50%)	NA
Combotherapy	3 (12%)	1 (13%)	NA
Modulen IBD®	3 (12%)	1 (13%)	NA

Continuous outcomes are expressed as mean ± SD.

Abbreviations: CRP, C-reactive protein; IBD, inflammatory bowel disease; NA, not applicable; ND, not done.

Supplementary Table 2:

Antibodies (Human)	Supplier	Cat No.	Dilutions IF	Dilutions WB	Molecular weight (kDa)
Ki67	Dako	M7240	1/100		
Ki67	Abcam	ab6526		1/100	395
Active caspase 3	Abcam	ab13847	1/200		
Active caspase 3	Cell signaling	9664		1/400	32
Occludin	Life Technologies	71-1500	1/100		
Mucin 2	Abcam	ab1197	1/200	1/500	621
Chromogranin A	Abcam	ab15160	1/100	1/500	75
Cytokeratin 20	Dako	M7019	1/50	1/10000	48
CD24	Biolegend	311101	1/100		
CD44	Biolegend	338801	1/500		
β -catenin	Abcam	ab32572	1/100		
Actin (Phalloidin 670)	Cytoskeleton	PHDN1	1/500		
Occludin				1/300	65
Claudin-1				1/300	22
ZO-1				1/300	220
beta-actin	Sigma Aldrich	A5441		1/10000	42
Donkey anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 555	Life Technologies	A31572	1/1000		
Donkey anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488	Life Technologies	A21206	1/1000		
Donkey anti-mouse IgG, Alexa Fluor 568	Life Technologies	A10037	1/1000		
Goat anti-mouse IgG/ IgA/ IgM, Alexa Fluor 488	Life Technologies	A10667	1/1000		
Goat anti-mouse IgG 2a, Alexa Fluor 647	Jackson Immuno Research	115-605-206	1/1000		
Goat anti-mouse IgG 1, Alexa Fluor 488	Jackson Immuno Research	115-545-205	1/1000		

Supplementary Table 3:

Gene name (Human)	Foward primer	Reverse primer
GADPH	GAGAAGGCTGGGGCTCAT	TGCTGATGATCTTGAGGCTG
IL-8	GCCTTCCTGATTTCTGCAGCT	TGCACTGACATCTAAGTTCTTTAGCAC
IP10	TTTCCTTGCTAACTGCTTTCA	CCAGAATCGAAGGCCATCAA
MCP1	TCCAGCATGAAAGTCTCTGC	TGGAATCCTGAACCCACTTC
Cyclin D1	GCTGCGAAGTGGAACCATCC	GCACTTCTGTTCTCGCAGAC
Ephrin B2	CTGCTGGGGTGTTTTGATGGTT	ATAGTACCAGTCCTTGCCAGGTAG
LGR5	ACGTGACCTTGAAGATTTCTGCT TG	CAGAGGGGATCTGAAAAGTGTGAAGT C
Ki67	TGCAGCAAGCACTTTGGAGA	CTTGACACACACATTGTCCTCAG
MUC 2a	ACTCCAACATCTCCGTGTCC	AGCCACACTTGTCTGCAGTG
KRT20	CTGAGGTTCAACTAACGGAGCTG	AACAGCGACTGGAGGTTGGCTA
CA1	TAGTGTCTCCTACAACCCAGCC	GCTGTCAGAGAAAGGACCACCT

PORTFOLIO

Article soumis :

Thrombin modifies growth, proliferation and apoptosis of human colon organoids: a PAR1- and PAR4-dependent mechanism, *British Journal of Pharmacology*, M. Sébert, A. Denadai-Souza, C. Racaud-Sultan, S. Chabot, P. Lluel, N. Monjotin, L. Alric, G. Portier, S. Kirzin, D. Bonnet, A. Ferrand and N. Vergnolle.

Characterization of human colon organoids from Inflammatory Bowel Disease patients as a new preclinical model, *Gastroenterology*, E. d'Aldebert, M. Quaranta, M. Sébert, D. Bonnet, S. Kirzin, G. Portier, J.P. Duffas, S. Chabot, P. Lluel, S. Allart, C. Deraison, C. Racaud-Sultan, A. Ferrand, L. Alric, E. Mas and N. Vergnolle.

Présentations orales :

Certaines présentations orales se sont appuyées sur ces travaux de thèse et ont été présentées par le Dr. Audrey Ferrand :

- UCLA – janvier 2017
- Workshop GSO Biofabrication et Cancer – juin 2017
- Workshop Cancéropole GSO 'Technoday' : Modèle organoïdes 3D – septembre 2017.

Présentations de posters :

Congrès Intestinal Epithelial Stem Cell – IESC – Nantes novembre 2015

TECHNICAL POINTS - Human colon organoids : culture and beyond, E. d'Aldebert, M. Quaranta, M. Sébert, D. Bonnet, S. Kirzin, G. Portier, JP. Duffas, L. Alric, C. Racaud-Sultan, A. Ferrand, E. Mas and N. Vergnolle.

Colon epithelial stem cells and parameters of their survival and growth *in vitro*, L. Delcombel, M. Quaranta, M. Sébert, E. D'Aldebert, D. Bonnet, S. Magness, E. Mas, N. Vergnolle, A. Ferrand, C. Racaud-Sultan.

Congrès Club d'Etudes des Cellules Epithéliales Digestives - CECED – Lille mars 2016

Unravelling the Identity of Active Serine Proteases in Inflammatory Bowel Diseases, A. Denadai-Souza, C. Bonnart, M. Marcellin, N. Barlow, A. Edir, B. Gilmore, M. Quaranta, M. Sébert, L. ALric, D. Bonnet, N. Bunnnett, O. Schiltz, C. Deraison, N. Vergnolle

Congrès du Cancéropôle Grand Sud-Ouest - GSO – 'Technologies pour la santé' – La Grande Motte novembre 2016

Development of a high content screening approach on 3D human colon organoids to identify drug candidates against colon cancer, [M. Sébert](#), M. Quaranta, D. Bonnet, L. Alric, G. Portier, S. Kirzin, E. Bloom, C. Rouget, S. Chabot, Philippe Lluel, N. Vergnolle, A. Ferrand.

Congrès international Focus On Microscopy – FOM – Bordeaux avril 2017

Development of a High Content Screening approach on 3D human colon organoids to identify drug candidates against colon cancer, [M. Sébert](#), M. Quaranta, D. Bonnet, L. Alric, G. Portier, S. Kirzin, E. Bloom, C. Rouget, S. Chabot, Philippe Lluel, N. Vergnolle, A. Ferrand.

World Congress of basic and clinical Pharmacology – WCP – Kyoto 2018

Thrombin modifies growth, proliferation and apoptosis of human colon organoids: a PAR1- and PAR4-dependent mechanism, [M. Sébert](#), A. Denadai-Souza, M. Quaranta, C. Racaud Sultan, S. Chabot, P. Lluel, N. Monjotin, L. Alric, G. Portier, S. Kirzin, D. Bonnet, A. Ferrand, [N. Vergnolle](#).

Autres activités scientifiques :

Synthèse de l’avis éthique n°124 publiée sur le site internet ‘Génétique et Société’ genotoul.fr.

Journée de la Science 2015, ateliers ‘coupes histologiques de côlon humain et imagerie’ pour les lycéens.

Création d’un MOOC de révision en physiologie, ‘Anatomie du système nerveux’ pour les étudiants en L2 Physiologie de l’Université de Paul Sabatier, Toulouse.

Prix et distinction :

Prix ‘Jeunes chercheurs’ – Axe 5 Technologies pour la Santé – Congrès cancéropôle Grand Sud Ouest 2016 - *Development of a high content screening approach on 3D human colon organoids to identify drug candidates against colon cancer*

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, C. and J. H. Cho (2007). "Bugging of the intestinal mucosa." *N Engl J Med* **357**(7): 708-710.
- Adams, M. N., R. Ramachandran, M. K. Yau, J. Y. Suen, D. P. Fairlie, M. D. Hollenberg and J. D. Hooper (2011). "Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors." *Pharmacol Ther* **130**(3): 248-282.
- Al-Ani, B., K. K. Hansen and M. D. Hollenberg (2004). "Proteinase-activated receptor-2: key role of amino-terminal dipeptide residues of the tethered ligand for receptor activation." *Mol Pharmacol* **65**(1): 149-156.
- Alessandri, K., L. Andrique, M. Feyeux, A. Bikfalvi, P. Nassoy and G. Recher (2017). "All-in-one 3D printed microscopy chamber for multidimensional imaging, the UniverSlide." *Sci Rep* **7**: 42378.
- Alessandri, K., B. R. Sarangi, V. V. Gurchenkov, B. Sinha, T. R. Kiessling, L. Fetler, F. Rico, S. Scheuring, C. Lamaze, A. Simon, S. Geraldo, D. Vignjevic, H. Domejean, L. Rolland, A. Funfak, J. Bibette, N. Bremond and P. Nassoy (2013). "Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(37): 14843-14848.
- Andus, T., V. Gross, I. Caesar, D. Krumm, J. Hosp, W. Gerok and J. Scholmerich (1993). "PMN-elastase in assessment of patients with inflammatory bowel disease." *Dig Dis Sci* **38**(9): 1638-1644.
- Antonello, Z. A., T. Reiff, E. Ballesta-Illan and M. Dominguez (2015). "Robust intestinal homeostasis relies on cellular plasticity in enteroblasts mediated by miR-8-Escargot switch." *EMBO J* **34**(15): 2025-2041.
- Arora, P., T. K. Ricks and J. Trejo (2007). "Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer." *J Cell Sci* **120**(Pt 6): 921-928.
- Asahara, T., C. Kalka and J. M. Isner (2000). "Stem cell therapy and gene transfer for regeneration." *Gene Ther* **7**(6): 451-457.
- Asfaha, S. (2015). "Intestinal stem cells and inflammation." *Curr Opin Pharmacol* **25**: 62-66.
- Asfaha, S., V. Brussee, K. Chapman, D. W. Zochodne and N. Vergnolle (2002). "Proteinase-activated receptor-1 agonists attenuate nociception in response to noxious stimuli." *Br J Pharmacol* **135**(5): 1101-1106.
- Auge, C., D. Balz-Hara, M. Steinhoff, N. Vergnolle and N. Cenac (2009). "Protease-activated receptor-4 (PAR 4): a role as inhibitor of visceral pain and hypersensitivity." *Neurogastroenterol Motil* **21**(11): 1189-e1107.
- Ayala, Y. M., A. M. Cantwell, T. Rose, L. A. Bush, D. Arosio and E. Di Cera (2001). "Molecular mapping of thrombin-receptor interactions." *Proteins* **45**(2): 107-116.
- Baars, J. E., E. J. Kuipers, M. van Haastert, J. J. Nicolai, A. C. Poen and C. J. van der Woude (2012). "Age at diagnosis of inflammatory bowel disease influences early development of colorectal cancer in inflammatory bowel disease patients: a nationwide, long-term survey." *J Gastroenterol* **47**(12): 1308-1322.
- Bah, A., Z. Chen, L. A. Bush-Pelc, F. S. Mathews and E. Di Cera (2007). "Crystal structures of murine thrombin in complex with the extracellular fragments of murine protease-activated receptors PAR3 and PAR4." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(28): 11603-11608.
- Bank, U., B. Kupper, D. Reinhold, T. Hoffmann and S. Ansorge (1999). "Evidence for a crucial role of neutrophil-derived serine proteases in the inactivation of interleukin-6 at sites of inflammation." *FEBS Lett* **461**(3): 235-240.
- Bannaga, A. S. and C. P. Selinger (2015). "Inflammatory bowel disease and anxiety: links, risks, and challenges faced." *Clin Exp Gastroenterol* **8**: 111-117.
- Barker, N. (2014). "Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(1): 19-33.
- Barker, N., R. A. Ridgway, J. H. van Es, M. van de Wetering, H. Begthel, M. van den Born, E. Danenberg, A. R. Clarke, O. J. Sansom and H. Clevers (2009). "Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer." *Nature* **457**(7229): 608-611.
- Barker, N., M. van de Wetering and H. Clevers (2008). "The intestinal stem cell." *Genes Dev* **22**(14): 1856-1864.
- Barker, N., J. H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haegebarth, J. Korving, H. Begthel, P. J. Peters and H. Clevers (2007). "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5." *Nature* **449**(7165): 1003-1007.
- Barnich, N. and A. Darfeuille-Michaud (2007). "Adherent-invasive Escherichia coli and Crohn's disease." *Curr Opin Gastroenterol* **23**(1): 16-20.
- Barry, G. D., J. Y. Suen, H. B. Low, B. Pfeiffer, B. Flanagan, M. Halili, G. T. Le and D. P. Fairlie (2007). "A refined agonist pharmacophore for protease activated receptor 2." *Bioorg Med Chem Lett* **17**(20): 5552-5557.
- Bartfeld, S. and H. Clevers (2015). "Organoids as Model for Infectious Diseases: Culture of Human and Murine Stomach Organoids and Microinjection of Helicobacter Pylori." *J Vis Exp*(105).
- Baumgart, D. C. and S. R. Carding (2007). "Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology." *Lancet* **369**(9573): 1627-1640.
- Bazil, V. and J. L. Strominger (1994). "Metalloprotease and serine protease are involved in cleavage of CD43, CD44, and CD16 from stimulated human granulocytes. Induction of cleavage of L-selectin via CD16." *J Immunol* **152**(3): 1314-1322.
- Beigel, F., M. Friedrich, C. Probst, K. Sotlar, B. Goke, J. Diegelmann and S. Brand (2014). "Oncostatin M mediates STAT3-dependent intestinal epithelial restitution via increased cell proliferation, decreased apoptosis and upregulation of SERPIN family members." *PLoS One* **9**(4): e93498.
- Bernstein, C. N., A. Wajda and J. F. Blanchard (2008). "The incidence of arterial thromboembolic diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study." *Clin Gastroenterol Hepatol* **6**(1): 41-45.

-Bertotti, A., G. Migliardi, F. Galimi, F. Sassi, D. Torti, C. Isella, D. Cora, F. Di Nicolantonio, M. Buscarino, C. Petti, D. Ribero, N. Russolillo, A. Muratore, P. Massucco, A. Pisacane, L. Molinaro, E. Valtorta, A. Sartore-Bianchi, M. Risio, L. Capussotti, M. Gambacorta, S. Siena, E. Medico, A. Sapino, S. Marsoni, P. M. Comoglio, A. Bardelli and L. Trusolino (2011). "A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer." *Cancer Discov* **1**(6): 508-523.

-Bianco, A. M., M. Girardelli and A. Tommasini (2015). "Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms." *World J Gastroenterol* **21**(43): 12296-12310.

-Bissell, D. M., D. M. Arenson, J. J. Maher and F. J. Roll (1987). "Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver." *J Clin Invest* **79**(3): 801-812.

-Bissell, D. M. and J. G. Tilles (1971). "Morphology and function of cells of human embryonic liver in monolayer culture." *J Cell Biol* **50**(1): 222-231.

-Bissell, M. J., H. G. Hall and G. Parry (1982). "How does the extracellular matrix direct gene expression?" *J Theor Biol* **99**(1): 31-68.

-Bjerknes, M. and H. Cheng (1999). "Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors." *Gastroenterology* **116**(1): 7-14.

-Blackburn, J. S. and C. E. Brinckerhoff (2008). "Matrix metalloproteinase-1 and thrombin differentially activate gene expression in endothelial cells via PAR-1 and promote angiogenesis." *Am J Pathol* **173**(6): 1736-1746.

-Blackhart, B. D., K. Emilsson, D. Nguyen, W. Teng, A. J. Martelli, S. Nystedt, J. Sundelin and R. M. Scarborough (1996). "Ligand cross-reactivity within the protease-activated receptor family." *J Biol Chem* **271**(28): 16466-16471.

-Blackhart, B. D., L. Ruslim-Litrus, C. C. Lu, V. L. Alves, W. Teng, R. M. Scarborough, E. E. Reynolds and D. Oksenberg (2000). "Extracellular mutations of protease-activated receptor-1 result in differential activation by thrombin and thrombin receptor agonist peptide." *Mol Pharmacol* **58**(6): 1178-1187.

-Boehnke, K., P. W. Iversen, D. Schumacher, M. J. Lallena, R. Haro, J. Amat, J. Haybaeck, S. Liebs, M. Lange, R. Schafer, C. R. Regenbrecht, C. Reinhard and J. A. Velasco (2016). "Assay Establishment and Validation of a High-Throughput Screening Platform for Three-Dimensional Patient-Derived Colon Cancer Organoid Cultures." *J Biomol Screen* **21**(9): 931-941.

-Boire, A., L. Covic, A. Agarwal, S. Jacques, S. Sherifi and A. Kuliopulos (2005). "PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells." *Cell* **120**(3): 303-313.

-Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." *Nat Med* **3**(7): 730-737.

-Brown, E. M., M. Sadarangani and B. B. Finlay (2013). "The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine." *Nat Immunol* **14**(7): 660-667.

-Bullen, T. F., S. Forrest, F. Campbell, A. R. Dodson, M. J. Hershman, D. M. Pritchard, J. R. Turner, M. H. Montrose and A. J. Watson (2006). "Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine." *Lab Invest* **86**(10): 1052-1063.

-Buresi, M. C., E. Schleihauf, N. Vergnolle, A. Buret, J. L. Wallace, M. D. Hollenberg and W. K. MacNaughton (2001). "Protease-activated receptor-1 stimulates Ca(2+)-dependent Cl(-) secretion in human intestinal epithelial cells." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**(2): G323-332.

-Burger, D. and S. Travis (2011). "Conventional medical management of inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* **140**(6): 1827-1837 e1822.

-Bustos, D., G. Negri, J. A. De Paula, M. Di Carlo, V. Yapur, A. Facente and A. De Paula (1998). "Colonic proteinases: increased activity in patients with ulcerative colitis." *Medicina (B Aires)* **58**(3): 262-264.

-Calle, E. E. and M. J. Thun (2004). "Obesity and cancer." *Oncogene* **23**(38): 6365-6378.

-Camargo, F. D., S. Gokhale, J. B. Johnnidis, D. Fu, G. W. Bell, R. Jaenisch and T. R. Brummelkamp (2007). "YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells." *Curr Biol* **17**(23): 2054-2060.

-Camerer, E., H. Kataoka, M. Kahn, K. Lease and S. R. Coughlin (2002). "Genetic evidence that protease-activated receptors mediate factor Xa signaling in endothelial cells." *J Biol Chem* **277**(18): 16081-16087.

-Carmon, K. S., X. Gong, Q. Lin, A. Thomas and Q. Liu (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**(28): 11452-11457.

-Carter, W. J., E. Cama and J. A. Huntington (2005). "Crystal structure of thrombin bound to heparin." *J Biol Chem* **280**(4): 2745-2749.

-Cenac, N., A. M. Coelho, C. Nguyen, S. Compton, P. Andrade-Gordon, W. K. MacNaughton, J. L. Wallace, M. D. Hollenberg, N. W. Bunnett, R. Garcia-Villar, L. Bueno and N. Vergnolle (2002). "Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2." *Am J Pathol* **161**(5): 1903-1915.

-Chambard, M., J. Gabrion and J. Mauchamp (1981). "Influence of collagen gel on the orientation of epithelial cell polarity: follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers." *J Cell Biol* **91**(1): 157-166.

-Chapman, P. B., A. Hauschild, C. Robert, J. B. Haanen, P. Ascierto, J. Larkin, R. Dummer, C. Garbe, A. Testori, M. Maio, D. Hogg, P. Lorigan, C. Lebbe, T. Jouary, D. Schadendorf, A. Ribas, S. J. O'Day, J. A. Sosman, J. M. Kirkwood, A. M. Eggermont, B. Dreno, K. Nolop, J. Li, B. Nelson, J. Hou, R. J. Lee, K. T. Flaherty, G. A. McArthur and B.-S. Group (2011). "Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation." *N Engl J Med* **364**(26): 2507-2516.

-Cheifetz, A. S., R. Gianotti, R. Luber and P. R. Gibson (2017). "Complementary and Alternative Medicines Used by Patients With Inflammatory Bowel Diseases." *Gastroenterology* **152**(2): 415-429 e415.

-H. Chen, (2011). "The effect of B27 supplement on promoting in vitro propagation of Her2/neu-transformed mammary tumorspheres." *J. Biotech. Res*, **3**, p. 7.

-Cheng, H. (1974). "Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. II. Mucous cells." *Am J Anat* **141**(4): 481-501.

-Cheng, H. (1974). "Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. IV. Paneth cells." *Am J Anat* **141**(4): 521-535.

-Cheng, H. and C. P. Leblond (1974). "Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell." *Am J Anat* **141**(4): 461-479.

-Cheng, L. and M. D. Lai (2003). "Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer." *World J Gastroenterol* **9**(12): 2642-2649.

-Chiba, H., M. Osanai, M. Murata, T. Kojima and N. Sawada (2008). "Transmembrane proteins of tight junctions." *Biochim Biophys Acta* **1778**(3): 588-600.

-Chin, A. C., W. Y. Lee, A. Nusrat, N. Vergnolle and C. A. Parkos (2008). "Neutrophil-mediated activation of epithelial protease-activated receptors-1 and -2 regulates barrier function and transepithelial migration." *J Immunol* **181**(8): 5702-5710.

-Chin, A. C., N. Vergnolle, W. K. MacNaughton, J. L. Wallace, M. D. Hollenberg and A. G. Buret (2003). "Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19): 11104-11109.

-Chow, E., C. Thirlwell, F. Macrae and L. Lipton (2004). "Colorectal cancer and inherited mutations in base-excision repair." *Lancet Oncol* **5**(10): 600-606.

-Cleary, S. P., M. Cotterchio, M. A. Jenkins, H. Kim, R. Bristow, R. Green, R. Haile, J. L. Hopper, L. LeMarchand, N. Lindor, P. Parfrey, J. Potter, B. Younghusband and S. Gallinger (2009). "Germline MutY human homologue mutations and colorectal cancer: a multisite case-control study." *Gastroenterology* **136**(4): 1251-1260.

-Coelho, A. M., N. Vergnolle, B. Guiard, J. Fioramonti and L. Bueno (2002). "Proteinases and proteinase-activated receptor 2: a possible role to promote visceral hyperalgesia in rats." *Gastroenterology* **122**(4): 1035-1047.

-Coeshott, C., C. Ohnemus, A. Pilyavskaya, S. Ross, M. Wieczorek, H. Kroona, A. H. Leimer and J. Cheronis (1999). "Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(11): 6261-6266.

-Cole, J. W. and A. McKalen (1963). "Studies on the Morphogenesis of Adenomatous Polyps in the Human Colon." *Cancer* **16**: 998-1002.

-Colman, R. J. and D. T. Rubin (2014). "Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis." *J Crohns Colitis* **8**(12): 1569-1581.

-Coppens, M., J. W. Eikelboom, D. Gustafsson, J. I. Weitz and J. Hirsh (2012). "Translational success stories: development of direct thrombin inhibitors." *Circ Res* **111**(7): 920-929.

-Cosnes, J. (2004). "Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**(3): 481-496.

-Cosnes, J., C. Gower-Rousseau, P. Seksik and A. Cortot (2011). "Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases." *Gastroenterology* **140**(6): 1785-1794.

-Cottone, M., S. Renna, A. Orlando and F. Mocchiari (2011). "Medical management of Crohn's disease." *Expert Opin Pharmacother* **12**(16): 2505-2525.

-Coughlin, S. R. (2000). "Thrombin signalling and protease-activated receptors." *Nature* **407**(6801): 258-264.

-Creamer, B., R. G. Shorter and J. Bamforth (1961). "The turnover and shedding of epithelial cells. I. The turnover in the gastrointestinal tract." *Gut* **2**: 110-118.

-Crohn, B. B., L. Ginzburg and G. D. Oppenheimer (1984). "Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer." *JAMA* **251**(1): 73-79.

-Darmoul, D., V. Gratio, H. Devaud, T. Lehy and M. Laburthe (2003). "Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells." *Am J Pathol* **162**(5): 1503-1513.

-Darmoul, D., J. C. Marie, H. Devaud, V. Gratio and M. Laburthe (2001). "Initiation of human colon cancer cell proliferation by trypsin acting at protease-activated receptor-2." *Br J Cancer* **85**(5): 772-779.

-Date, S. and T. Sato (2015). "Mini-gut organoids: reconstitution of the stem cell niche." *Annu Rev Cell Dev Biol* **31**: 269-289.

de Santa Barbara, P., G. R. van den Brink and D. J. Roberts (2003). "Development and differentiation of the intestinal epithelium." *Cell Mol Life Sci* **60**(7): 1322-1332.

-DeFea, K. A., J. Zalevsky, M. S. Thoma, O. Dery, R. D. Mullins and N. W. Bunnett (2000). "beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2." *J Cell Biol* **148**(6): 1267-1281.

-Dekkers, J. F., G. Berkens, E. Kruisselbrink, A. Vonk, H. R. de Jonge, H. M. Janssens, I. Bronsveld, E. A. van de Graaf, E. E. Nieuwenhuis, R. H. Houwen, F. P. Vleggaar, J. C. Escher, Y. B. de Rijke, C. J. Majoer, H. G. Heijerman, K. M. de Winter-de Groot, H. Clevers, C. K. van der Ent and J. M. Beekman (2016). "Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis." *Sci Transl Med* **8**(344): 344ra384.

-Dekkers, J. F., C. L. Wiegerinck, H. R. de Jonge, I. Bronsveld, H. M. Janssens, K. M. de Winter-de Groot, A. M. Brandsma, N. W. de Jong, M. J. Bijvelds, B. J. Scholte, E. E. Nieuwenhuis, S. van den Brink, H. Clevers, C. K. van der Ent, S. Middendorp and J. M. Beekman (2013). "A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids." *Nat Med* **19**(7): 939-945.

-Dementiev, A., M. Petitou, J. M. Herbert and P. G. Gettins (2004). "The ternary complex of antithrombin-anhydrothrombin-heparin reveals the basis of inhibitor specificity." *Nat Struct Mol Biol* **11**(9): 863-867.

-Deplancke, B. and H. R. Gaskins (2001). "Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer." *Am J Clin Nutr* **73**(6): 1131S-1141S.

-Dharmani, P., V. Srivastava, V. Kissoon-Singh and K. Chadee (2009). "Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens." *J Innate Immun* **1**(2): 123-135.

-Di Cera, E. (2003). "Thrombin interactions." *Chest* **124**(3 Suppl): 11S-17S.

-Di Cera, E. (2007). "Thrombin as procoagulant and anticoagulant." *J Thromb Haemost* **5** Suppl 1: 196-202.

-Di Cera, E. (2008). "Thrombin." *Mol Aspects Med* **29**(4): 203-254.

-Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanese, P. D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti and A. M. Gianni (2002). "Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli." *Blood* **99**(10): 3838-3843.

-Dotti, I., R. Mora-Buch, E. Ferrer-Picon, N. Planell, P. Jung, M. C. Masamunt, R. F. Leal, J. Martin de Carpi, J. Llach, I. Ordas, E. Batlle, J. Panes and A. Salas (2016). "Alterations in the epithelial stem cell compartment could contribute to permanent changes in the mucosa of patients with ulcerative colitis." Gut.

-Douaiher, J., A. Ravipati, B. Grams, S. Chowdhury, O. Alatise and C. Are (2017). "Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations." J Surg Oncol **115**(5): 619-630.

-Doumas, S., A. Kolokotronis and P. Stefanopoulos (2005). "Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor." Infect Immun **73**(3): 1271-1274.

-Dulon, S., C. Cande, N. W. Bunnett, M. D. Hollenberg, M. Chignard and D. Pidard (2003). "Proteinase-activated receptor-2 and human lung epithelial cells: disarming by neutrophil serine proteinases." Am J Respir Cell Mol Biol **28**(3): 339-346.

-Dyson, J. K. and M. D. Rutter (2012). "Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk?" World J Gastroenterol **18**(29): 3839-3848.

-Edge, S. B. and C. C. Compton (2010). "The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM." Ann Surg Oncol **17**(6): 1471-1474.

-Ehrmann, R. L. and G. O. Gey (1956). "The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen." J Natl Cancer Inst **16**(6): 1375-1403.

-Eiraku, M., K. Watanabe, M. Matsuo-Takasaki, M. Kawada, S. Yonemura, M. Matsumura, T. Wataya, A. Nishiyama, K. Muguruma and Y. Sasai (2008). "Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals." Cell Stem Cell **3**(5): 519-532.

-Eirew, P., A. Steif, J. Khattra, G. Ha, D. Yap, H. Farahani, K. Gelmon, S. Chia, C. Mar, A. Wan, E. Laks, J. Biele, K. Shumansky, J. Rosner, A. McPherson, C. Nielsen, A. J. Roth, C. Lefebvre, A. Bashashati, C. de Souza, C. Siu, R. Aniba, J. Brimhall, A. Oloumi, T. Osako, A. Bruna, J. L. Sandoval, T. Algara, W. Greenwood, K. Leung, H. Cheng, H. Xue, Y. Wang, D. Lin, A. J. Mungall, R. Moore, Y. Zhao, J. Lorette, L. Nguyen, D. Huntsman, C. J. Eaves, C. Hansen, M. A. Marra, C. Caldas, S. P. Shah and S. Aparicio (2015). "Dynamics of genomic clones in breast cancer patient xenografts at single-cell resolution." Nature **518**(7539): 422-426.

-Emerman, J. T. and D. R. Pitelka (1977). "Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes." In Vitro **13**(5): 316-328.

-Esmon, C. T. (2003). "The protein C pathway." Chest **124**(3 Suppl): 26S-32S.

-Evans, M. (1981). "Origin of mouse embryonal carcinoma cells and the possibility of their direct isolation into tissue culture." J Reprod Fertil **62**(2): 625-631.

-Evans, R. A., Y. C. Tian, R. Steadman and A. O. Phillips (2003). "TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins." Exp Cell Res **282**(2): 90-100.

-Fan, Y. Y., L. A. Davidson, E. S. Callaway, J. S. Goldsby and R. S. Chapkin (2014). "Differential effects of 2- and 3-series E-prostaglandins on in vitro expansion of Lgr5+ colonic stem cells." Carcinogenesis **35**(3): 606-612.

-Fang, M., K. J. Kovacs, L. L. Fisher and A. A. Larson (2003). "Thrombin inhibits NMDA-mediated nociceptive activity in the mouse: possible mediation by endothelin." J Physiol **549**(Pt 3): 903-917.

-Farin, H. F., J. H. Van Es and H. Clevers (2012). "Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells." Gastroenterology **143**(6): 1518-1529 e1517.

-Fearon, E. R. (2011). "Molecular genetics of colorectal cancer." Annu Rev Pathol **6**: 479-507.

-Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.

-Fedirko, V., I. Tramacere, V. Bagnardi, M. Rota, L. Scotti, F. Islami, E. Negri, K. Straif, I. Romieu, C. La Vecchia, P. Boffetta and M. Jenab (2011). "Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies." Ann Oncol **22**(9): 1958-1972.

-Feng, D. M., D. F. Veber, T. M. Connolly, C. Condra, M. J. Tang and R. F. Nutt (1995). "Development of a potent thrombin receptor ligand." J Med Chem **38**(20): 4125-4130.

-Fevr, T., S. Robine, D. Louvard and J. Huelsken (2007). "Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells." Mol Cell Biol **27**(21): 7551-7559.

-Fiorucci, S., A. Mencarelli, B. Palazzetti, E. Distrutti, N. Vergnolle, M. D. Hollenberg, J. L. Wallace, A. Morelli and G. Cirino (2001). "Proteinase-activated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13936-13941.

-Flynn, A. N. and A. G. Buret (2004). "Proteinase-activated receptor 1 (PAR-1) and cell apoptosis." Apoptosis **9**(6): 729-737.

-Fodde, R., J. Kuipers, C. Rosenberg, R. Smits, M. Kielman, C. Gaspar, J. H. van Es, C. Breukel, J. Wiegant, R. H. Giles and H. Clevers (2001). "Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability." Nat Cell Biol **3**(4): 433-438.

-Fong, C. J., E. R. Sherwood, D. M. Sutkowski, G. M. Abu-Jawdeh, H. Yokoo, K. D. Bauer, J. M. Kozlowski and C. Lee (1991). "Reconstituted basement membrane promotes morphological and functional differentiation of primary human prostatic epithelial cells." Prostate **19**(3): 221-235.

-Foty, R. A. and M. S. Steinberg (2005). "The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation." Dev Biol **278**(1): 255-263.

-Fouquet, C., J. F. Gilles, N. Heck, M. Dos Santos, R. Schwartzmann, V. Cannaya, M. P. Morel, R. S. Davidson, A. Trembleau and S. Bolte (2015). "Improving axial resolution in confocal microscopy with new high refractive index mounting media." PLoS One **10**(3): e0121096.

-Gahmberg, C. G. and S. I. Hakomori (1973). "External labeling of cell surface galactose and galactosamine in glycolipid and glycoprotein of human erythrocytes." J Biol Chem **248**(12): 4311-4317.

-Gan, Z. R., Y. Li, Z. Chen, S. D. Lewis and J. A. Shafer (1994). "Identification of basic amino acid residues in thrombin essential for heparin-catalyzed inactivation by antithrombin III." J Biol Chem **269**(2): 1301-1305.

-Gandini, S., E. Botteri, S. Iodice, M. Boniol, A. B. Lowenfels, P. Maisonneuve and P. Boyle (2008). "Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis." Int J Cancer **122**(1): 155-164.

-Ganji-Arjenaki, M. and M. Rafieian-Kopaei (2017). "Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: A meta analysis and systematic review." J Cell Physiol.

-Gao, L., L. Chao and J. Chao (2010). "A novel signaling pathway of tissue kallikrein in promoting keratinocyte migration: activation of proteinase-activated receptor 1 and epidermal growth factor receptor." *Exp Cell Res* **316**(3): 376-389.

-Gargett, C. E. (2007). "Uterine stem cells: what is the evidence?" *Hum Reprod Update* **13**(1): 87-101.

-Gerbe, F., B. Brulin, L. Makrini, C. Legraverend and P. Jay (2009). "DCAMKL-1 expression identifies Tuft cells rather than stem cells in the adult mouse intestinal epithelium." *Gastroenterology* **137**(6): 2179-2180; author reply 2180-2171.

-Gerbe, F., C. Legraverend and P. Jay (2012). "The intestinal epithelium tuft cells: specification and function." *Cell Mol Life Sci* **69**(17): 2907-2917.

-Gerbe, F., J. H. van Es, L. Makrini, B. Brulin, G. Mellitzer, S. Robine, B. Romagnolo, N. F. Shroyer, J. F. Bourgaux, C. Pignodel, H. Clevers and P. Jay (2011). "Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium." *J Cell Biol* **192**(5): 767-780.

-Gettins, P. G. (2002). "The F-helix of serpins plays an essential, active role in the proteinase inhibition mechanism." *FEBS Lett* **523**(1-3): 2-6.

-Ginzberg, H. H., V. Cherapanov, Q. Dong, A. Cantin, C. A. McCulloch, P. T. Shannon and G. P. Downey (2001). "Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigrating: role of elastase." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**(3): G705-717.

-Goessling, W., T. E. North, S. Loewer, A. M. Lord, S. Lee, C. L. Stoick-Cooper, G. Weidinger, M. Puder, G. Q. Daley, R. T. Moon and L. I. Zon (2009). "Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration." *Cell* **136**(6): 1136-1147.

-Gregorieff, A., D. Pinto, H. Begthel, O. Destree, M. Kielman and H. Clevers (2005). "Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine." *Gastroenterology* **129**(2): 626-638.

-Grimwade, D. and T. Enver (2004). "Acute promyelocytic leukemia: where does it stem from?" *Leukemia* **18**(3): 375-384.

-Groden, J., A. Thliveris, W. Samowitz, M. Carlson, L. Gelbert, H. Albertsen, G. Joslyn, J. Stevens, L. Spirio, M. Robertson and et al. (1991). "Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene." *Cell* **66**(3): 589-600.

-Gryfe, R., C. Swallow, B. Bapat, M. Redston, S. Gallinger and J. Couture (1997). "Molecular biology of colorectal cancer." *Curr Probl Cancer* **21**(5): 233-300.

-Gullapalli, A., B. L. Wolfe, C. T. Griffin, T. Magnuson and J. Trejo (2006). "An essential role for SNX1 in lysosomal sorting of protease-activated receptor-1: evidence for retromer-, Hrs-, and Tsg101-independent functions of sorting nexins." *Mol Biol Cell* **17**(3): 1228-1238.

-Guraya, S. Y. (2015). "Association of type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis and systematic review." *World J Gastroenterol* **21**(19): 6026-6031.

-Hadley, M. A., S. W. Byers, C. A. Suarez-Quian, H. K. Kleinman and M. Dym (1985). "Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro." *J Cell Biol* **101**(4): 1511-1522.

-Hamilton, S. R. (1992). "The adenoma-adenocarcinoma sequence in the large bowel: variations on a theme." *J Cell Biochem Suppl* **16G**: 41-46.

-Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.

-Hansen, K. K., K. Oikonomopoulou, Y. Li and M. D. Hollenberg (2008). "Proteinases, proteinase-activated receptors (PARs) and the pathophysiology of cancer and diseases of the cardiovascular, musculoskeletal, nervous and gastrointestinal systems." *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **377**(4-6): 377-392.

-Hansen, K. K., P. M. Sherman, L. Cellars, P. Andrade-Gordon, Z. Pan, A. Baruch, J. L. Wallace, M. D. Hollenberg and N. Vergnolle (2005). "A major role for proteolytic activity and proteinase-activated receptor-2 in the pathogenesis of infectious colitis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(23): 8363-8368.

-Hardie, D. G., F. A. Ross and S. A. Hawley (2012). "AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(4): 251-262.

-Hasdemir, B., J. E. Murphy, G. S. Cottrell and N. W. Bunnett (2009). "Endosomal deubiquitinating enzymes control ubiquitination and down-regulation of protease-activated receptor 2." *J Biol Chem* **284**(41): 28453-28466.

-He, T. C., A. B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L. T. da Costa, P. J. Morin, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." *Science* **281**(5382): 1509-1512.

-Hidalgo, M., E. Bruckheimer, N. V. Rajeshkumar, I. Garrido-Laguna, E. De Oliveira, B. Rubio-Viqueira, S. Strawn, M. J. Wick, J. Martell and D. Sidransky (2011). "A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer." *Mol Cancer Ther* **10**(8): 1311-1316.

-J. Holtfreter, (1944). "Experimental studies on the development of the pronephros." *Rev. Can. Biol.* **3**, 220-250.

-Hollander, D., C. M. Vadheim, E. Brettholz, G. M. Petersen, T. Delahunty and J. I. Rotter (1986). "Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor." *Ann Intern Med* **105**(6): 883-885.

-Hollenberg, M. D. and S. J. Compton (2002). "International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors." *Pharmacol Rev* **54**(2): 203-217.

-Hollenberg, M. D., M. Saifeddine, B. Al-Ani and Y. Gui (1999). "Proteinase-activated receptor 4 (PAR4): action of PAR4-activating peptides in vascular and gastric tissue and lack of cross-reactivity with PAR1 and PAR2." *Can J Physiol Pharmacol* **77**(6): 458-464.

-Hynds, R. E. and A. Giangreco (2013). "Concise review: the relevance of human stem cell-derived organoid models for epithelial translational medicine." *Stem Cells* **31**(3): 417-422.

-Hyun, E., P. Andrade-Gordon, M. Steinhoff and N. Vergnolle (2008). "Protease-activated receptor-2 activation: a major actor in intestinal inflammation." *Gut* **57**(9): 1222-1229.

-Iablokov, V., C. L. Hirota, M. A. Peplowski, R. Ramachandran, K. Mihara, M. D. Hollenberg and W. K. MacNaughton (2014). "Proteinase-activated receptor 2 (PAR2) decreases apoptosis in colonic epithelial cells." *J Biol Chem* **289**(49): 34366-34377.

-Ishihara, H., A. J. Connolly, D. Zeng, M. L. Kahn, Y. W. Zheng, C. Timmons, T. Tram and S. R. Coughlin (1997). "Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans." *Nature* **386**(6624): 502-506.

-Jadhav, U., M. Saxena, N. K. O'Neill, A. Saadatpour, G. C. Yuan, Z. Herbert, K. Murata and R. A. Shivdasani (2017). "Dynamic Reorganization of Chromatin Accessibility Signatures during Dedifferentiation of Secretory Precursors into Lgr5+ Intestinal Stem Cells." *Cell Stem Cell* **21**(1): 65-77 e65.

-Jager, S., E. F. Stange and J. Wehkamp (2010). "Antimicrobial peptides in gastrointestinal inflammation." *Int J Inflam* **2010**: 910283.

-Jain, R. N. and L. C. Samuelson (2006). "Differentiation of the gastric mucosa. II. Role of gastrin in gastric epithelial cell proliferation and maturation." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**(5): G762-765.

-Jarvinen, H. J. (1985). "Time and type of prophylactic surgery for familial adenomatosis coli." *Ann Surg* **202**(1): 93-97.

-Johansson, M. E., J. M. Larsson and G. C. Hansson (2011). "The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** Suppl 1: 4659-4665.

-Jonker, D. J., C. J. O'Callaghan, C. S. Karapetis, J. R. Zalcborg, D. Tu, H. J. Au, S. R. Berry, M. Krahn, T. Price, R. J. Simes, N. C. Tebbutt, G. van Hazel, R. Wierzbicki, C. Langer and M. J. Moore (2007). "Cetuximab for the treatment of colorectal cancer." *N Engl J Med* **357**(20): 2040-2048.

-Jonkers, D. and R. Stockbrugger (2003). "Probiotics and inflammatory bowel disease." *J R Soc Med* **96**(4): 167-171.

-Jung, P., T. Sato, A. Merlos-Suarez, F. M. Barriga, M. Iglesias, D. Rossell, H. Auer, M. Gallardo, M. A. Blasco, E. Sancho, H. Clevers and E. Batlle (2011). "Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells." *Nat Med* **17**(10): 1225-1227.

-Kadric, N., D. Mesic and M. Bazardzanovic (2003). "[Anatomy of the colon, rectum and anus]." *Med Arh* **57**(3 Suppl 1): 29-31.

-Kahn, M. L., S. R. Hammes, C. Botka and S. R. Coughlin (1998). "Gene and locus structure and chromosomal localization of the protease-activated receptor gene family." *J Biol Chem* **273**(36): 23290-23296.

-Kalra, J., A. K. Chaudhary and K. Prasad (1991). "Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers." *Int J Exp Pathol* **72**(1): 1-7.

-Kaneider, N. C., A. J. Leger, A. Agarwal, N. Nguyen, G. Perides, C. Derian, L. Covic and A. Kuliopulos (2007). "'Role reversal' for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage." *Nat Immunol* **8**(12): 1303-1312.

-Karam, S. M. (1999). "Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut." *Front Biosci* **4**: D286-298.

-Kawabata, A., T. Kanke, D. Yonezawa, T. Ishiki, M. Saka, M. Kabeya, F. Sekiguchi, S. Kubo, R. Kuroda, M. Iwaki, K. Katsura and R. Plevin (2004). "Potent and metabolically stable agonists for protease-activated receptor-2: evaluation of activity in multiple assay systems in vitro and in vivo." *J Pharmacol Exp Ther* **309**(3): 1098-1107.

-Kawabata, A., R. Kuroda and M. D. Hollenberg (1999). "[Physiology of protease-activated receptors (PARs): involvement of PARs in digestive functions]." *Nihon Yakurigaku Zasshi* **114** Suppl 1: 173P-179P.

-Kellermayer, R. (2012). "Epigenetics and the developmental origins of inflammatory bowel diseases." *Can J Gastroenterol* **26**(12): 909-915.

-Kim, D. W., I. J. Kim, H. C. Kang, H. W. Park, Y. Shin, J. H. Park, S. G. Jang, B. C. Yoo, M. R. Lee, C. W. Hong, K. J. Park, N. G. Oh, N. K. Kim, M. K. Sung, B. W. Lee, Y. J. Kim, H. Lee and J. G. Park (2005). "Mutation spectrum of the APC gene in 83 Korean FAP families." *Hum Mutat* **26**(3): 281.

-Kim, Y. S. and S. B. Ho (2010). "Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress." *Curr Gastroenterol Rep* **12**(5): 319-330.

-Kleinman, H. K. and G. R. Martin (2005). "Matrigel: basement membrane matrix with biological activity." *Semin Cancer Biol* **15**(5): 378-386.

-Knecht, W., G. S. Cottrell, S. Amadesi, J. Mohlin, A. Skaregarde, K. Gedda, A. Peterson, K. Chapman, M. D. Hollenberg, N. Vergnolle and N. W. Bunnett (2007). "Trypsin IV or mesotrypsin and p23 cleave protease-activated receptors 1 and 2 to induce inflammation and hyperalgesia." *J Biol Chem* **282**(36): 26089-26100.

-Knoblich, J. A. (2008). "Mechanisms of asymmetric stem cell division." *Cell* **132**(4): 583-597.

-Kolodner, R. D. (1995). "Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility." *Trends Biochem Sci* **20**(10): 397-401.

-Komuro, T. and Y. Hashimoto (1990). "Three-dimensional structure of the rat intestinal wall (mucosa and submucosa)." *Arch Histol Cytol* **53**(1): 1-21.

-Korinek, V., N. Barker, G. Willert, M. Molenaar, J. Roose, G. Wagenaar, M. Markman, W. Lamers, O. Destree and H. Clevers (1998). "Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse." *Mol Cell Biol* **18**(3): 1248-1256.

-Kosinski, C., V. S. Li, A. S. Chan, J. Zhang, C. Ho, W. Y. Tsui, T. L. Chan, R. C. Mifflin, D. W. Powell, S. T. Yuen, S. Y. Leung and X. Chen (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**(39): 15418-15423.

-Koutroubakis, I., O. N. Manousos, S. G. Meuwissen and A. S. Pena (1996). "Environmental risk factors in inflammatory bowel disease." *Hepatogastroenterology* **43**(8): 381-393.

-Kramps, J. A. and E. C. Klasen (1985). "Characterization of a low molecular weight anti-elastase isolated from human bronchial secretion." *Exp Lung Res* **9**(1-2): 151-165.

-Krausz, E., R. de Hoogt, E. Gustin, F. Cornelissen, T. Grand-Perret, L. Janssen, N. Vloemans, D. Wuyts, S. Frans, A. Axel, P. J. Peeters, B. Hall and M. Cik (2013). "Translation of a tumor microenvironment mimicking 3D tumor growth co-culture assay platform to high-content screening." *J Biomol Screen* **18**(1): 54-66.

-Krowarsch, D., T. Cierpicki, F. Jelen and J. Otlewski (2003). "Canonical protein inhibitors of serine proteases." *Cell Mol Life Sci* **60**(11): 2427-2444.

-Krupnick, J. G. and J. L. Benovic (1998). "The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 289-319.

-Kuipers, E. J., W. M. Grady, D. Lieberman, T. Seufferlein, J. J. Sung, P. G. Boelens, C. J. van de Velde and T. Watanabe (2015). "Colorectal cancer." *Nat Rev Dis Primers* **1**: 15065.

-Kuliopulos, A., L. Covic, S. K. Seeley, P. J. Sheridan, J. Helin and C. E. Costello (1999). "Plasmin desensitization of the PAR1 thrombin receptor: kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy." *Biochemistry* **38**(14): 4572-4585.

-Kunz-Schughart, L. A., J. P. Freyer, F. Hofstaedter and R. Ebner (2004). "The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model." *J Biomol Screen* **9**(4): 273-285.

-Laforge, M., N. Bidere, S. Carmona, A. Devocelle, B. Charpentier and A. Senik (2006). "Apoptotic death concurrent with CD3 stimulation in primary human CD8+ T lymphocytes: a role for endogenous granzyme B." *J Immunol* **176**(7): 3966-3977.

-L'Allemain G, Pouyssegur J, Weber MJ. (1991). "p42/mitogen-activated protein kinase as a converging target for different growth factor signaling pathways : use of pertussis toxin as a discrimination factor." *Cell Regul* ; 2 : 675-84.

-Lancaster, M. A. and J. A. Knoblich (2014). "Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies." *Science* **345**(6194): 1247125.

-Lasfargues, E. Y. (1957). "Cultivation and behavior in vitro of the normal mammary epithelium of the adult mouse." *Anat Rec* **127**(1): 117-129.

-Lau, C., C. Lytle, D. S. Straus and K. A. DeFea (2011). "Apical and basolateral pools of proteinase-activated receptor-2 direct distinct signaling events in the intestinal epithelium." *Am J Physiol Cell Physiol* **300**(1): C113-123.

-Lechago, J. (1990). "Neuroendocrine cells of the gut and their disorders." *Monogr Pathol*(31): 181-219.

-Leger, A. J., S. L. Jacques, J. Badar, N. C. Kaneider, C. K. Derian, P. Andrade-Gordon, L. Covic and A. Kuliopulos (2006). "Blocking the protease-activated receptor 1-4 heterodimer in platelet-mediated thrombosis." *Circulation* **113**(9): 1244-1254.

-Li, F. P., J. F. Fraumeni, Jr., J. J. Mulvihill, W. A. Blattner, M. G. Dreyfus, M. A. Tucker and R. W. Miller (1988). "A cancer family syndrome in twenty-four kindreds." *Cancer Res* **48**(18): 5358-5362.

-Li, L. and T. Xie (2005). "Stem cell niche: structure and function." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 605-631.

-Li, L., Q. Zhou, T. C. Voss, K. L. Quick and D. V. LaBarbera (2016). "High-throughput imaging: Focusing in on drug discovery in 3D." *Methods* **96**: 97-102.

-Li, M. L., J. Aggeler, D. A. Farson, C. Hatier, J. Hassell and M. J. Bissell (1987). "Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(1): 136-140.

-Li, N., A. Nakauka-Ddamba, J. Tobias, S. T. Jensen and C. J. Lengner (2016). "Mouse Label-Retaining Cells Are Molecularly and Functionally Distinct From Reserve Intestinal Stem Cells." *Gastroenterology* **151**(2): 298-310 e297.

-Li, W., D. J. Johnson, C. T. Esmon and J. A. Huntington (2004). "Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin." *Nat Struct Mol Biol* **11**(9): 857-862.

-Lin, H., A. P. Liu, T. H. Smith and J. Trejo (2013). "Cofactoring and dimerization of proteinase-activated receptors." *Pharmacol Rev* **65**(4): 1198-1213.

-Lin, H. and J. Trejo (2013). "Transactivation of the PAR1-PAR2 heterodimer by thrombin elicits beta-arrestin-mediated endosomal signaling." *J Biol Chem* **288**(16): 11203-11215.

-Liu, J. Z., S. van Sommeren, H. Huang, S. C. Ng, R. Alberts, A. Takahashi, S. Ripke, J. C. Lee, L. Jostins, T. Shah, S. Abedian, J. H. Cheon, J. Cho, N. E. Dayani, L. Franke, Y. Fuyuno, A. Hart, R. C. Juyal, G. Juyal, W. H. Kim, A. P. Morris, H. Poustchi, W. G. Newman, V. Midha, T. R. Orchard, H. Vahedi, A. Sood, J. Y. Sung, R. Malekzadeh, H. J. Westra, K. Yamazaki, S. K. Yang, C. International Multiple Sclerosis Genetics, I. B. D. G. C. International, J. C. Barrett, B. Z. Alizadeh, M. Parkes, T. Bk, M. J. Daly, M. Kubo, C. A. Anderson and R. K. Weersma (2015). "Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations." *Nat Genet* **47**(9): 979-986.

-Loew, D., C. Perrault, M. Morales, S. Moog, C. Ravanat, S. Schuhler, R. Arcone, C. Pietropaolo, J. P. Cazenave, A. van Dorselaer and F. Lanza (2000). "Proteolysis of the exodomain of recombinant protease-activated receptors: prediction of receptor activation or inactivation by MALDI mass spectrometry." *Biochemistry* **39**(35): 10812-10822.

-Louvard, D., M. Kedinger and H. P. Hauri (1992). "The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures." *Annu Rev Cell Biol* **8**: 157-195.

-Ludeman, M. J., H. Kataoka, Y. Srinivasan, N. L. Esmon, C. T. Esmon and S. R. Coughlin (2005). "PAR1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin." *J Biol Chem* **280**(13): 13122-13128.

-Lynch, H. T., J. F. Lynch and T. A. Attard (2009). "Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes: Lynch syndrome as a model." *CMAJ* **181**(5): 273-280.

-Lynch, T. J., D. W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R. A. Okimoto, B. W. Brannigan, P. L. Harris, S. M. Haserlat, J. G. Supko, F. G. Haluska, D. N. Louis, D. C. Christiani, J. Settleman and D. A. Haber (2004). "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib." *N Engl J Med* **350**(21): 2129-2139.

-Macfarlane, S. R., M. J. Seatter, T. Kanke, G. D. Hunter and R. Plevin (2001). "Proteinase-activated receptors." *Pharmacol Rev* **53**(2): 245-282.

-Mahe, M. M., N. Sundaram, C. L. Watson, N. F. Shroyer and M. A. Helmrath (2015). "Establishment of human epithelial enteroids and colonoids from whole tissue and biopsy." *J Vis Exp*(97).

-Manichanh, C., L. Rigottier-Gois, E. Bonnaud, K. Gloux, E. Pelletier, L. Frangeul, R. Nalin, C. Jarrin, P. Chardon, P. Marteau, J. Roca and J. Dore (2006). "Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach." *Gut* **55**(2): 205-211.

-Mann, K. G. (2003). "Thrombin formation." *Chest* **124**(3 Suppl): 4S-10S.

-Mao, Y., J. Jin and S. P. Kunapuli (2008). "Characterization of a new peptide agonist of the protease-activated receptor-1." *Biochem Pharmacol* **75**(2): 438-447.

-Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12): 7634-7638.

-Maryanoff, B. E., R. J. Santulli, D. F. McComsey, W. J. Hoekstra, K. Hoey, C. E. Smith, M. Addo, A. L. Darrow and P. Andrade-Gordon (2001). "Protease-activated receptor-2 (PAR-2): structure-function study of receptor activation by diverse peptides related to tethered-ligand epitopes." *Arch Biochem Biophys* **386**(2): 195-204.

- Masahata, K., E. Umemoto, H. Kayama, M. Kotani, S. Nakamura, T. Kurakawa, J. Kikuta, K. Gotoh, D. Motooka, S. Sato, T. Higuchi, Y. Baba, T. Kurosaki, M. Kinoshita, Y. Shimada, T. Kimura, R. Okumura, A. Takeda, M. Tajima, O. Yoshie, M. Fukuzawa, H. Kiyono, S. Fagarasan, T. Iida, M. Ishii and K. Takeda (2014). "Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch." *Nat Commun* **5**: 3704.
- Matano, M., S. Date, M. Shimokawa, A. Takano, M. Fujii, Y. Ohta, T. Watanabe, T. Kanai and T. Sato (2015). "Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids." *Nat Med* **21**(3): 256-262.
- Maxwell, G. D. and M. E. Forbes (1987). "Exogenous basement-membrane-like matrix stimulates adrenergic development in avian neural crest cultures." *Development* **101**(4): 767-776.
- McCormack, P. L. and S. J. Keam (2008). "Bevacizumab: a review of its use in metastatic colorectal cancer." *Drugs* **68**(4): 487-506.
- McCormick, D. A., L. W. Horton and A. S. Mee (1990). "Mucin depletion in inflammatory bowel disease." *J Clin Pathol* **43**(2): 143-146.
- McGovern, D. P., S. Kugathasan and J. H. Cho (2015). "Genetics of Inflammatory Bowel Diseases." *Gastroenterology* **149**(5): 1163-1176 e1162.
- McGuire, J. J. (2004). "Proteinase-activated Receptor 2 (PAR2): a challenging new target for treatment of vascular diseases." *Curr Pharm Des* **10**(22): 2769-2778.
- McLaughlin, J. N., M. M. Patterson and A. B. Malik (2007). "Protease-activated receptor-3 (PAR3) regulates PAR1 signaling by receptor dimerization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(13): 5662-5667.
- Medema, J. P. and L. Vermeulen (2011). "Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer." *Nature* **474**(7351): 318-326.
- Meier, J. and A. Sturm (2011). "Current treatment of ulcerative colitis." *World J Gastroenterol* **17**(27): 3204-3212.
- Michalopoulos, G. and H. C. Pitot (1975). "Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations." *Exp Cell Res* **94**(1): 70-78.
- Mihara, K., R. Ramachandran, M. Saifeddine, K. K. Hansen, B. Renaux, D. Polley, S. Gibson, C. Vanderboor and M. D. Hollenberg (2016). "Thrombin-Mediated Direct Activation of Proteinase-Activated Receptor-2: Another Target for Thrombin Signaling." *Mol Pharmacol* **89**(5): 606-614.
- Molecular Mechanisms of Bacterial Infection via the Gut pp 1-35. Part of the Current Topics in Microbiology and Immunology book series (CT MICROBIOLOGY, volume 337) Functional Morphology of the Gastrointestinal Tract.
- Molino, M., E. S. Barnathan, R. Numerof, J. Clark, M. Dreyer, A. Cumashi, J. A. Hoxie, N. Schechter, M. Woolkalis and L. F. Brass (1997). "Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2." *J Biol Chem* **272**(7): 4043-4049.
- Molino, M., N. Blanchard, E. Belmonte, A. P. Tarver, C. Abrams, J. A. Hoxie, C. Cerletti and L. F. Brass (1995). "Proteolysis of the human platelet and endothelial cell thrombin receptor by neutrophil-derived cathepsin G." *J Biol Chem* **270**(19): 11168-11175.
- Monjotin, N., J. Gillespie, M. Farrie, B. Le Grand, D. Junquero and N. Vergnolle (2016). "F16357, a novel protease-activated receptor 1 antagonist, improves urodynamic parameters in a rat model of interstitial cystitis." *Br J Pharmacol* **173**(14): 2224-2236.
- Morohoshi, Y., K. Matsuoka, H. Chinen, N. Kamada, T. Sato, T. Hisamatsu, S. Okamoto, N. Inoue, H. Takaishi, H. Ogata, Y. Iwao and T. Hibi (2006). "Inhibition of neutrophil elastase prevents the development of murine dextran sulfate sodium-induced colitis." *J Gastroenterol* **41**(4): 318-324.
- Moscona, A. and H. Moscona (1952). "The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo." *J Anat* **86**(3): 287-301.
- Motley, R. J., J. Rhodes, G. Williams, I. A. Tavares and A. Bennett (1990). "Smoking, eicosanoids and ulcerative colitis." *J Pharm Pharmacol* **42**(4): 288-289.
- Motta, J. P., L. G. Bermudez-Humaran, C. Deraison, L. Martin, C. Rolland, P. Rousset, J. Boue, G. Dietrich, K. Chapman, P. Kharrat, J. P. Vinel, L. Alric, E. Mas, J. M. Sallenave, P. Langella and N. Vergnolle (2012). "Food-grade bacteria expressing elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis." *Sci Transl Med* **4**(158): 158ra144.
- Moxey, P. C. and J. S. Trier (1979). "Development of villus absorptive cells in the human fetal small intestine: a morphological and morphometric study." *Anat Rec* **195**(3): 463-482.
- Mule, F., M. C. Baffi, A. Capparelli and R. Pizzuti (2003). "Involvement of nitric oxide and tachykinins in the effects induced by protease-activated receptors in rat colon longitudinal muscle." *Br J Pharmacol* **139**(3): 598-604.
- Mule, F., M. C. Baffi and M. C. Cerra (2002). "Dual effect mediated by protease-activated receptors on the mechanical activity of rat colon." *Br J Pharmacol* **136**(3): 367-374.
- Murillo, L. S., S. A. Morre and A. S. Pena (2003). "Toll-like receptors and NOD/CARD proteins: pattern recognition receptors are key elements in the regulation of immune response." *Drugs Today (Barc)* **39**(6): 415-438.
- Nakanishi-Matsui, M., Y. W. Zheng, D. J. Sulciner, E. J. Weiss, M. J. Ludeman and S. R. Coughlin (2000). "PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin." *Nature* **404**(6778): 609-613.
- Nara, K., S. Ito, T. Ito, Y. Suzuki, M. A. Ghoneim, S. Tachibana and S. Hirose (1994). "Elastase inhibitor elafin is a new type of proteinase inhibitor which has a transglutaminase-mediated anchoring sequence termed "cementoin"." *J Biochem* **115**(3): 441-448.
- Nasri, I., D. Bonnet, B. Zwarycz, E. d'Aldebert, S. Khou, R. Mezghani-Jarraya, M. Quaranta, C. Rolland, C. Bonnart, E. Mas, A. Ferrand, N. Cenac, S. Magness, L. Van Landeghem, N. Vergnolle and C. Racaud-Sultan (2016). "PAR2-dependent activation of GSK3beta regulates the survival of colon stem/progenitor cells." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **311**(2): G221-236.
- Nazemalhosseini Mojarad, E., P. J. Kuppen, H. A. Aghdaei and M. R. Zali (2013). "The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer." *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* **6**(3): 120-128.
- Nieminen, U., A. Jussila, S. Nordling, H. Mustonen and M. A. Farkkila (2014). "Inflammation and disease duration have a cumulative effect on the risk of dysplasia and carcinoma in IBD: a case-control observational study based on registry data." *Int J Cancer* **134**(1): 189-196.

-Nierodzik, M. L., F. Kajumo and S. Karpatkin (1992). "Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo." *Cancer Res* **52**(12): 3267-3272.

-Noben, M., B. Verstockt, M. de Bruyn, N. Hendriks, G. Van Assche, S. Vermeire, C. Verfaillie and M. Ferrante (2017). "Epithelial organoid cultures from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease: a truly long-term model to study the molecular basis for inflammatory bowel disease?" *Gut*.

-Nosho, K., T. Kawasaki, M. Ohnishi, Y. Suemoto, G. J. Kirkner, D. Zepf, L. Yan, J. A. Longtine, C. S. Fuchs and S. Ogino (2008). "PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations." *Neoplasia* **10**(6): 534-541.

-Nozaki, K., W. Mochizuki, Y. Matsumoto, T. Matsumoto, M. Fukuda, T. Mizutani, M. Watanabe and T. Nakamura (2016). "Co-culture with intestinal epithelial organoids allows efficient expansion and motility analysis of intraepithelial lymphocytes." *J Gastroenterol* **51**(3): 206-213.

-Nystedt, S., K. Emilsson, C. Wahlestedt and J. Sundelin (1994). "Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(20): 9208-9212.

-O'Brien, P. J., N. Prevost, M. Molino, M. K. Hollinger, M. J. Woolkalis, D. S. Wouffe and L. F. Brass (2000). "Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1." *J Biol Chem* **275**(18): 13502-13509.

-Oakhill, J. S., R. Steel, Z. P. Chen, J. W. Scott, N. Ling, S. Tam and B. E. Kemp (2011). "AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase." *Science* **332**(6036): 1433-1435.

-Ogura, Y., D. K. Bonen, N. Inohara, D. L. Nicolae, F. F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R. H. Duerr, J. P. Achkar, S. R. Brant, T. M. Bayless, B. S. Kirschner, S. B. Hanauer, G. Nunez and J. H. Cho (2001). "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease." *Nature* **411**(6837): 603-606.

-Ohlsson, K., M. Bergenfeldt and P. Bjork (1988). "Functional studies of human secretory leukocyte protease inhibitor." *Adv Exp Med Biol* **240**: 123-131.

-Oikonomopoulou, K., K. K. Hansen, M. Saifeddine, I. Tea, M. Blaber, S. I. Blaber, I. Scarisbrick, P. Andrade-Gordon, G. S. Cottrell, N. W. Bunnett, E. P. Diamandis and M. D. Hollenberg (2006). "Proteinase-activated receptors, targets for kallikrein signaling." *J Biol Chem* **281**(43): 32095-32112.

-Oldham, W. M. and H. E. Hamm (2008). "Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 60-71.

-Oliver, C., J. F. Waters, C. L. Tolbert and H. K. Kleinman (1987). "Growth of exocrine acinar cells on a reconstituted basement membrane gel." *In Vitro Cell Dev Biol* **23**(7): 465-473.

-Orkin, R. W., P. Gehron, E. B. McGoodwin, G. R. Martin, T. Valentine and R. Swarm (1977). "A murine tumor producing a matrix of basement membrane." *J Exp Med* **145**(1): 204-220.

-Ossovskaya, V. S. and N. W. Bunnett (2004). "Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease." *Physiol Rev* **84**(2): 579-621.

-Ostrowska, E. and G. Reiser (2008). "The protease-activated receptor-3 (PAR-3) can signal autonomously to induce interleukin-8 release." *Cell Mol Life Sci* **65**(6): 970-981.

-Packey, C. D. and R. B. Sartor (2008). "Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases." *J Intern Med* **263**(6): 597-606.

Padrines, M., M. Wolf, A. Walz and M. Baggiolini (1994). "Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3." *FEBS Lett* **352**(2): 231-235.

-Page, M. J. and E. Di Cera (2006). "Role of Na⁺ and K⁺ in enzyme function." *Physiol Rev* **86**(4): 1049-1092.

-Pastula, A., M. Middelhoff, A. Brandtner, M. Tobiasch, B. Hohl, A. H. Nuber, I. E. Demir, S. Neupert, P. Kollmann, G. Mazzuoli-Weber and M. Quante (2016). "Three-Dimensional Gastrointestinal Organoid Culture in Combination with Nerves or Fibroblasts: A Method to Characterize the Gastrointestinal Stem Cell Niche." *Stem Cells Int* **2016**: 3710836.

-Patel, V. A., D. Massenburg, S. Vujcic, L. Feng, M. Tang, N. Litbarg, A. Antoni, J. Rauch, W. Lieberthal and J. S. Levine (2015). "Apoptotic cells activate AMP-activated protein kinase (AMPK) and inhibit epithelial cell growth without change in intracellular energy stores." *J Biol Chem* **290**(37): 22352-22369.

-Pauli, C., B. D. Hopkins, D. Prandi, R. Shaw, T. Fedrizzi, A. Sboner, V. Sailer, M. Augello, L. Puca, R. Rosati, T. J. McNary, Y. Churakova, C. Cheung, J. Triscott, D. Pisapia, R. Rao, J. M. Mosquera, B. Robinson, B. M. Faltas, B. E. Emerling, V. K. Gadi, B. Bernard, O. Elemento, H. Beltran, F. Demichelis, C. J. Kemp, C. Grandori, L. C. Cantley and M. A. Rubin (2017). "Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine." *Cancer Discov* **7**(5): 462-477.

-Perez, M., M. Lamothe, C. Maraval, E. Mirabel, C. Loubat, B. Planty, C. Horn, J. Michaux, S. Marrot, R. Letienne, C. Pignier, A. Bocquet, F. Nadal-Wollbold, D. Cussac, L. de Vries and B. Le Grand (2009). "Discovery of novel protease activated receptors 1 antagonists with potent antithrombotic activity in vivo." *J Med Chem* **52**(19): 5826-5836.

-Pickl, M. and C. H. Ries (2009). "Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab." *Oncogene* **28**(3): 461-468.

-Pino, M. S. and D. C. Chung (2010). "The chromosomal instability pathway in colon cancer." *Gastroenterology* **138**(6): 2059-2072.

-Pithadia, A. B. and S. Jain (2011). "Treatment of inflammatory bowel disease (IBD)." *Pharmacol Rep* **63**(3): 629-642.

-Potten, C. S. (1977). "Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation." *Nature* **269**(5628): 518-521.

-Potten, C. S., L. Kovacs and E. Hamilton (1974). "Continuous labelling studies on mouse skin and intestine." *Cell Tissue Kinet* **7**(3): 271-283.

-Potten, C. S. and M. Loeffler (1990). "Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt." *Development* **110**(4): 1001-1020.

-Potten, C. S., G. Owen and D. Booth (2002). "Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands." *J Cell Sci* **115**(Pt 11): 2381-2388.

-Potter, J. D. (1999). "Colorectal cancer: molecules and populations." *J Natl Cancer Inst* **91**(11): 916-932.

-Powell, A. E., Y. Wang, Y. Li, E. J. Poulin, A. L. Means, M. K. Washington, J. N. Higginbotham, A. Juchheim, N. Prasad, S. E. Levy, Y. Guo, Y. Shyr, B. J. Aronow, K. M. Haigis, J. L. Franklin and R. J. Coffey (2012). "The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor." *Cell* **149**(1): 146-158.

-Prager, M., J. Buettner and C. Buening (2015). "Genes involved in the regulation of intestinal permeability and their role in ulcerative colitis." *J Dig Dis* **16**(12): 713-722.

-Prasad, S., R. Mingrino, K. Kaukinen, K. L. Hayes, R. M. Powell, T. T. MacDonald and J. E. Collins (2005). "Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells." *Lab Invest* **85**(9): 1139-1162.

-Pretlow, T. P., B. J. Barrow, W. S. Ashton, M. A. O'Riordan, T. G. Pretlow, J. A. Jurcisek and T. A. Stellato (1991). "Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa." *Cancer Res* **51**(5): 1564-1567.

-Puente, X. S., L. M. Sanchez, A. Gutierrez-Fernandez, G. Velasco and C. Lopez-Otin (2005). "A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 2): 331-334.

-Pullan, R. D. (1996). "Colonic mucus, smoking and ulcerative colitis." *Ann R Coll Surg Engl* **78**(2): 85-91.

-Pullan, R. D., G. A. Thomas, M. Rhodes, R. G. Newcombe, G. T. Williams, A. Allen and J. Rhodes (1994). "Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis." *Gut* **35**(3): 353-359.

-Quinton, T. M., S. Kim, C. K. Derian, J. Jin and S. P. Kunapuli (2004). "Plasmin-mediated activation of platelets occurs by cleavage of protease-activated receptor 4." *J Biol Chem* **279**(18): 18434-18439.

-Radtke, F. and H. Clevers (2005). "Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin." *Science* **307**(5717): 1904-1909.

-Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg and R. Medzhitov (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis." *Cell* **118**(2): 229-241.

-Ramachandran, R. and M. D. Hollenberg (2008). "Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more." *Br J Pharmacol* **153** Suppl 1: S263-282.

-Ramachandran, R., K. Mihara, H. Chung, B. Renaux, C. S. Lau, D. A. Muruve, K. A. DeFea, M. Bouvier and M. D. Hollenberg (2011). "Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase-activated receptor-2 (PAR2)." *J Biol Chem* **286**(28): 24638-24648.

-Ramachandran, R., K. Mihara, M. Mathur, M. D. Rochdi, M. Bouvier, K. Defea and M. D. Hollenberg (2009). "Agonist-biased signaling via proteinase activated receptor-2: differential activation of calcium and mitogen-activated protein kinase pathways." *Mol Pharmacol* **76**(4): 791-801.

-Ramachandran, R., F. Noorbakhsh, K. Defea and M. D. Hollenberg (2012). "Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges." *Nat Rev Drug Discov* **11**(1): 69-86.

-Rath, H. C., H. H. Herfarth, J. S. Ikeda, W. B. Grenther, T. E. Hamm, Jr., E. Balish, J. D. Taurog, R. E. Hammer, K. H. Wilson and R. B. Sartor (1996). "Normal luminal bacteria, especially Bacteroides species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats." *J Clin Invest* **98**(4): 945-953.

-Renesto, P., M. Si-Tahar, M. Moniatte, V. Balloy, A. Van Dorsselaer, D. Pidard and M. Chignard (1997). "Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor." *Blood* **89**(6): 1944-1953.

-Rhee, K. J., S. Wu, X. Wu, D. L. Huso, B. Karim, A. A. Franco, S. Rabizadeh, J. E. Golub, L. E. Mathews, J. Shin, R. B. Sartor, D. Golenbock, A. R. Hamad, C. M. Gan, F. Housseau and C. L. Sears (2009). "Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic Bacteroides fragilis, in wild-type C57BL/6 mice." *Infect Immun* **77**(4): 1708-1718.

-Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle and R. De Maria (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." *Nature* **445**(7123): 111-115.

-Richmond, C. A., M. S. Shah, L. T. Deary, D. C. Trotter, H. Thomas, D. M. Ambruzs, L. Jiang, B. B. Whiles, H. D. Rickner, R. K. Montgomery, A. Tovaglieri, D. L. Carlone and D. T. Breault (2015). "Dormant Intestinal Stem Cells Are Regulated by PTEN and Nutritional Status." *Cell Rep* **13**(11): 2403-2411.

-Riewald, M., R. J. Petrovan, A. Donner, B. M. Mueller and W. Ruf (2002). "Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway." *Science* **296**(5574): 1880-1882.

-Rothwell, P. M., F. G. Fowkes, J. F. Belch, H. Ogawa, C. P. Warlow and T. W. Meade (2011). "Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials." *Lancet* **377**(9759): 31-41.

-Royle, N. J., D. M. Irwin, M. L. Koschinsky, R. T. MacGillivray and J. L. Hamerton (1987). "Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively." *Somat Cell Mol Genet* **13**(3): 285-292.

-Russo, A., U. J. Soh, M. M. Paing, P. Arora and J. Trejo (2009). "Caveolae are required for protease-selective signaling by protease-activated receptor-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(15): 6393-6397.

-Rydel, T. J., A. Tulinsky, W. Bode and R. Huber (1991). "Refined structure of the hirudin-thrombin complex." *J Mol Biol* **221**(2): 583-601.

-Sahami, S., I. A. Kooij, S. L. Meijer, G. R. Van den Brink, C. J. Buskens and A. A. Te Velde (2016). "The Link between the Appendix and Ulcerative Colitis: Clinical Relevance and Potential Immunological Mechanisms." *Am J Gastroenterol* **111**(2): 163-169.

-Sailaja, B. S., X. C. He and L. Li (2016). "The regulatory niche of intestinal stem cells." *J Physiol* **594**(17): 4827-4836.

-Sambrano, G. R., W. Huang, T. Faruqi, S. Mahrus, C. Craik and S. R. Coughlin (2000). "Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets." *J Biol Chem* **275**(10): 6819-6823.

-Sancho, E., E. Battle and H. Clevers (2004). "Signaling pathways in intestinal development and cancer." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 695-723.

-Sander, G. R. and B. C. Powell (2004). "Expression of notch receptors and ligands in the adult gut." *J Histochem Cytochem* **52**(4): 509-516.

-Sanders, N. L., S. P. Bajaj, A. Zivelin and S. I. Rapaport (1985). "Inhibition of tissue factor/factor VIIa activity in plasma requires factor X and an additional plasma component." *Blood* **66**(1): 204-212.

-Sasaki, N., N. Sachs, K. Wiebrands, S. I. Ellenbroek, A. Fumagalli, A. Lyubimova, H. Begthel, M. van den Born, J. H. van Es, W. R. Karthaus, V. S. Li, C. Lopez-Iglesias, P. J. Peters, J. van Rheenen, A. van Oudenaarden and H. Clevers (2016). "Reg4+ deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5+ stem cells in colon." *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**(37): E5399-5407.

-Sato, T., D. E. Stange, M. Ferrante, R. G. Vries, J. H. Van Es, S. Van den Brink, W. J. Van Houdt, A. Pronk, J. Van Gorp, P. D. Siersema and H. Clevers (2011). "Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium." *Gastroenterology* **141**(5): 1762-1772.

-Sato, T., R. G. Vries, H. J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D. E. Stange, J. H. van Es, A. Abo, P. Kujala, P. J. Peters and H. Clevers (2009). "Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche." *Nature* **459**(7244): 262-265.

-Scarborough, R. M., M. A. Naughton, W. Teng, D. T. Hung, J. Rose, T. K. Vu, V. I. Wheaton, C. W. Turck and S. R. Coughlin (1992). "Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function." *J Biol Chem* **267**(19): 13146-13149.

-Schmid, M., K. Fellermann, P. Fritz, O. Wiedow, E. F. Stange and J. Wehkamp (2007). "Attenuated induction of epithelial and leukocyte serine antiproteases elafin and secretory leukocyte protease inhibitor in Crohn's disease." *J Leukoc Biol* **81**(4): 907-915.

-Schmidt A (1872). "Neue Untersuchungen ueber die Fasserstoffesgerinnung". *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie*. 6: 413-538.

-Schmitz, H., M. Fromm, C. J. Bentzel, P. Scholz, K. Detjen, J. Mankertz, H. Bode, H. J. Epple, E. O. Riecken and J. D. Schulzke (1999). "Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6." *J Cell Sci* **112** (Pt 1): 137-146.

-Schwabe, R. F. and C. Jobin (2013). "The microbiome and cancer." *Nat Rev Cancer* **13**(11): 800-812.

-Schwank, G., B. K. Koo, V. Sasselli, J. F. Dekkers, I. Heo, T. Demircan, N. Sasaki, S. Boymans, E. Cuppen, C. K. van der Ent, E. E. Nieuwenhuis, J. M. Beekman and H. Clevers (2013). "Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients." *Cell Stem Cell* **13**(6): 653-658.

-Scoville, D. H., T. Sato, X. C. He and L. Li (2008). "Current view: intestinal stem cells and signaling." *Gastroenterology* **134**(3): 849-864.

-Scudamore, C. L., M. A. Jepson, B. H. Hirst and H. R. Miller (1998). "The rat mucosal mast cell chymase, RMCP-II, alters epithelial cell monolayer permeability in association with altered distribution of the tight junction proteins ZO-1 and occludin." *Eur J Cell Biol* **75**(4): 321-330.

-Scuderi, P., P. A. Nez, M. L. Duerr, B. J. Wong and C. M. Valdez (1991). "Cathepsin-G and leukocyte elastase inactivate human tumor necrosis factor and lymphotoxin." *Cell Immunol* **135**(2): 299-313.

-Senda, T., A. Iizuka-Kogo, T. Onouchi and A. Shimomura (2007). "Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia." *Med Mol Morphol* **40**(2): 68-81.

-Shannon, J. M., R. J. Mason and S. D. Jennings (1987). "Functional differentiation of alveolar type II epithelial cells in vitro: effects of cell shape, cell-matrix interactions and cell-cell interactions." *Biochim Biophys Acta* **931**(2): 143-156.

-Shi, X., B. Gangadharan, L. F. Brass, W. Ruf and B. M. Mueller (2004). "Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis." *Mol Cancer Res* **2**(7): 395-402.

-Simian, M. and M. J. Bissell (2017). "Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions." *J Cell Biol* **216**(1): 31-40.

-Simon-Assmann, P. and M. Kedinger (1993). "Heterotypic cellular cooperation in gut morphogenesis and differentiation." *Semin Cell Biol* **4**(3): 221-230.

-Sirenko, O., T. Mitlo, J. Hesley, S. Luke, W. Owens and E. F. Cromwell (2015). "High-content assays for characterizing the viability and morphology of 3D cancer spheroid cultures." *Assay Drug Dev Technol* **13**(7): 402-414.

-Smith, A. J., H. S. Stern, M. Penner, K. Hay, A. Mitri, B. V. Bapat and S. Gallinger (1994). "Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons." *Cancer Res* **54**(21): 5527-5530.

-Smith, R. J., A. Rao-Bhatia and T. H. Kim (2017). "Signaling and epigenetic mechanisms of intestinal stem cells and progenitors: insight into crypt homeostasis, plasticity, and niches." *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **6**(5).

-Smith, T. H., L. J. Coronel, J. G. Li, M. R. Dores, M. T. Nieman and J. Trejo (2016). "Protease-activated Receptor-4 Signaling and Trafficking Is Regulated by the Clathrin Adaptor Protein Complex-2 Independent of beta-Arrestins." *J Biol Chem* **291**(35): 18453-18464.

-Soh, U. J., M. R. Dores, B. Chen and J. Trejo (2010). "Signal transduction by protease-activated receptors." *Br J Pharmacol* **160**(2): 191-203.

-Sokol, H., B. Pigneur, L. Watterlot, O. Lakhdari, L. G. Bermudez-Humaran, J. J. Gratadoux, S. Blugeon, C. Bridonneau, J. P. Furet, G. Corthier, C. Grangette, N. Vasquez, P. Pochart, G. Trugnan, G. Thomas, H. M. Blottiere, J. Dore, P. Marteau, P. Seksik and P. Langella (2008). "Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(43): 16731-16736.

-Song, M., W. S. Garrett and A. T. Chan (2015). "Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention." *Gastroenterology* **148**(6): 1244-1260 e1216.

-Spehlmann, M. E., A. Z. Begun, J. Burghardt, P. Lepage, A. Raedler and S. Schreiber (2008). "Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study." *Inflamm Bowel Dis* **14**(7): 968-976.

-Spence, J. R., R. Lauf and N. F. Shroyer (2011). "Vertebrate intestinal endoderm development." *Dev Dyn* **240**(3): 501-520.

-Srinivasan, T., E. B. Than, P. Bu, K. L. Tung, K. Y. Chen, L. Augenlicht, S. M. Lipkin and X. Shen (2016). "Notch signalling regulates asymmetric division and inter-conversion between Lgr5 and bmi1 expressing intestinal stem cells." *Sci Rep* **6**: 26069.

-Srivastava, E. D., M. A. Russell, C. Feyerabend and J. Rhodes (1990). "Effect of ulcerative colitis and smoking on rectal blood flow." *Gut* **31**(9): 1021-1024.

-Steele, S. P., S. J. Melchor and W. A. Petri, Jr. (2016). "Tuft Cells: New Players in Colitis." *Trends Mol Med* **22**(11): 921-924.

-M. S. Steinberg, (1964), in Cellular Membranes in Development, M. Locke, Ed. (Academic Press, New York,), pp. 321–366.

-Steinberg, M. S. (1970). "Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells." J Exp Zool **173**(4): 395-433.

-Stelzner, M., M. Helmrath, J. C. Dunn, S. J. Henning, C. W. Houchen, C. Kuo, J. Lynch, L. Li, S. T. Magness, M. G. Martin, M. H. Wong, J. Yu and N. I. H. I. S. C. Consortium (2012). "A nomenclature for intestinal in vitro cultures." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **302**(12): G1359-1363.

-Stenman, S. and A. Vaheri (1978). "Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues." J Exp Med **147**(4): 1054-1064.

-Stevens, L. C. (1967). "Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice." J Natl Cancer Inst **38**(4): 549-552.

-Sugawara, S., A. Uehara, T. Nochi, T. Yamaguchi, H. Ueda, A. Sugiyama, K. Hanzawa, K. Kumagai, H. Okamura and H. Takada (2001). "Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells." J Immunol **167**(11): 6568-6575.

-Suidan, H. S., J. Bouvier, E. Schaerer, S. R. Stone, D. Monard and J. Tschopp (1994). "Granzyme A released upon stimulation of cytotoxic T lymphocytes activates the thrombin receptor on neuronal cells and astrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(17): 8112-8116.

-Sun, Z., X. Wang, R. Wallen, X. Deng, X. Du, E. Hallberg and R. Andersson (1998). "The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats." Scand J Gastroenterol **33**(4): 415-422.

-Swarm, R. L. (1963). "Transplantation of a Murine Chondrosarcoma in Mice of Different Inbred Strains." J Natl Cancer Inst **31**: 953-975.

-Swidsinski, A., A. Ladhoff, A. Pernthaler, S. Swidsinski, V. Loening-Baucke, M. Ortner, J. Weber, U. Hoffmann, S. Schreiber, M. Dietel and H. Lochs (2002). "Mucosal flora in inflammatory bowel disease." Gastroenterology **122**(1): 44-54.

-Tarzami, S. T., G. Wang, W. Li, L. Green and J. P. Singh (2006). "Thrombin and PAR-1 stimulate differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells." J Thromb Haemost **4**(3): 656-663.

-Terzic, J., S. Grivennikov, E. Karin and M. Karin (2010). "Inflammation and colon cancer." Gastroenterology **138**(6): 2101-2114 e2105.

-Tetsu, O. and F. McCormick (1999). "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells." Nature **398**(6726): 422-426.

-Thompson, N. P., A. J. Wakefield and R. E. Pounder (1995). "Inherited disorders of coagulation appear to protect against inflammatory bowel disease." Gastroenterology **108**(4): 1011-1015.

-Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-1147.

-Tian, H., B. Biehs, C. Chiu, C. W. Siebel, Y. Wu, M. Costa, F. J. de Sauvage and O. D. Klein (2015). "Opposing activities of Notch and Wnt signaling regulate intestinal stem cells and gut homeostasis." Cell Rep **11**(1): 33-42.

-Tian, H., B. Biehs, S. Warming, K. G. Leong, L. Rangell, O. D. Klein and F. J. de Sauvage (2011). "A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable." Nature **478**(7368): 255-259.

-Timpl, R., H. Rohde, P. G. Robey, S. I. Rennard, J. M. Foidart and G. R. Martin (1979). "Laminin--a glycoprotein from basement membranes." J Biol Chem **254**(19): 9933-9937.

-Toyota, M., N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, J. G. Herman, S. B. Baylin and J. P. Issa (1999). "CpG island methylator phenotype in colorectal cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8681-8686.

-Trejo, J. (2003). "Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking." J Pharmacol Exp Ther **307**(2): 437-442.

-Triantafyllidis, J. K., E. Merikas and F. Georgopoulos (2011). "Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease." Drug Des Devel Ther **5**: 185-210.

-Tsiang, M., A. K. Jain, K. E. Dunn, M. E. Rojas, L. L. Leung and C. S. Gibbs (1995). "Functional mapping of the surface residues of human thrombin." J Biol Chem **270**(28): 16854-16863.

-Turpin, B., W. Miller, L. Rosenfeldt, K. Kombrinck, M. J. Flick, K. A. Steinbrecher, E. Harmel-Laws, E. S. Mullins, M. Shaw, D. P. Witte, A. Revenko, B. Monia and J. S. Palumbo (2014). "Thrombin drives tumorigenesis in colitis-associated colon cancer." Cancer Res **74**(11): 3020-3030.

-Ueo, T., I. Imayoshi, T. Kobayashi, T. Ohtsuka, H. Seno, H. Nakase, T. Chiba and R. Kageyama (2012). "The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation." Development **139**(6): 1071-1082.

-Ullman, T. A. and S. H. Itzkowitz (2011). "Intestinal inflammation and cancer." Gastroenterology **140**(6): 1807-1816.

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

-van de Wetering, M., E. Sancho, C. Verweij, W. de Lau, I. Oving, A. Hurlstone, K. van der Horn, E. Batlle, D. Coudreuse, A. P. Haramis, M. Tjon-Pon-Fong, P. Moerer, M. van den Born, G. Soete, S. Pals, M. Eilers, R. Medema and H. Clevers (2002). "The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells." Cell **111**(2): 241-250.

van der Flier, L. G. and H. Clevers (2009). "Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium." Annu Rev Physiol **71**: 241-260.

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

-Van der Flier, L. G., J. Sabates-Bellver, I. Oving, A. Haegbarth, M. De Palo, M. Anti, M. E. Van Gijn, S. Suijkerbuijk, M. Van de Wetering, G. Marra and H. Clevers (2007). "The Intestinal Wnt/TCF Signature." Gastroenterology **132**(2): 628-632.

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

-van Dop, W. A., A. Uhmman, M. Wijgerde, E. Sleddens-Linkels, J. Heijmans, G. J. Offerhaus, M. A. van den Bergh Weerman, G. E. Boeckxstaens, D. W. Hommes, J. C. Hardwick, H. Hahn and G. R. van den Brink (2009). "Depletion of the colonic epithelial precursor cell compartment upon conditional activation of the hedgehog pathway." *Gastroenterology* **136**(7): 2195-2203 e2191-2197.

-van Es, J. H. and H. Clevers (2005). "Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease." *Trends Mol Med* **11**(11): 496-502.

-van Es, J. H., A. Haegerbarth, P. Kujala, S. Itzkovitz, B. K. Koo, S. F. Boj, J. Korving, M. van den Born, A. van Oudenaarden, S. Robine and H. Clevers (2012). "A critical role for the Wnt effector Tcf4 in adult intestinal homeostatic self-renewal." *Mol Cell Biol* **32**(10): 1918-1927.

-van Es, J. H., T. Sato, M. van de Wetering, A. Lyubimova, A. N. Nee, A. Gregorieff, N. Sasaki, L. Zeinstra, M. van den Born, J. Korving, A. C. Martens, N. Barker, A. van Oudenaarden and H. Clevers (2012). "Dl1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage." *Nat Cell Biol* **14**(10): 1099-1104.

-Van Limbergen, J., D. C. Wilson and J. Satsangi (2009). "The genetics of Crohn's disease." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **10**: 89-116.

-Vergnolle, N. (2005). "Clinical relevance of proteinase activated receptors (pars) in the gut." *Gut* **54**(6): 867-874.

-Vermeulen, L., F. de Sousa e Melo, D. J. Richel and J. P. Medema (2012). "The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities." *Lancet Oncol* **13**(2): e83-89.

-Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits and J. L. Bos (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." *N Engl J Med* **319**(9): 525-532.

-Vouret-Craviari, V., E. Van Obberghen-Schilling, U. B. Rasmussen, A. Pavirani, J. P. Lecocq and J. Pouyssegur (1992). "Synthetic alpha-thrombin receptor peptides activate G protein-coupled signaling pathways but are unable to induce mitogenesis." *Mol Biol Cell* **3**(1): 95-102.

-Vousden, K. H. (2002). "Activation of the p53 tumor suppressor protein." *Biochim Biophys Acta* **1602**(1): 47-59.

Vrij, E. J., S. Espinoza, M. Heilig, A. Kolew, M. Schneider, C. A. van Blitterswijk, R. K. Truckenmuller and N. C. Rivron (2016). "3D high throughput screening and profiling of embryoid bodies in thermoformed microwell plates." *Lab Chip* **16**(4): 734-742.

-Vu, T. K., D. T. Hung, V. I. Wheaton and S. R. Coughlin (1991). "Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation." *Cell* **64**(6): 1057-1068.

-Wachs, F. P., S. Couillard-Despres, M. Engelhardt, D. Wilhelm, S. Ploetz, M. Vroemen, J. Kaesbauer, G. Uyanik, J. Klucken, C. Karl, J. Tebbing, C. Svendsen, N. Weidner, H. G. Kuhn, J. Winkler and L. Aigner (2003). "High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells." *Lab Invest* **83**(7): 949-962.

-Walker, A. W., J. D. Sanderson, C. Churcher, G. C. Parkes, B. N. Hudspith, N. Rayment, J. Brostoff, J. Parkhill, G. Dougan and L. Petrovska (2011). "High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease." *BMC Microbiol* **11**: 7.

-Watanabe, K., D. Kamiya, A. Nishiyama, T. Katayama, S. Nozaki, H. Kawasaki, Y. Watanabe, K. Mizuseki and Y. Sasai (2005). "Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells." *Nat Neurosci* **8**(3): 288-296.

-Weber, C. R., D. R. Raleigh, L. Su, L. Shen, E. A. Sullivan, Y. Wang and J. R. Turner (2010). "Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity." *J Biol Chem* **285**(16): 12037-12046.

-Weber, J. and P. L. McCormack (2008). "Panitumumab: in metastatic colorectal cancer with wild-type KRAS." *BioDrugs* **22**(6): 403-411.

-Weeber, F., M. van de Wetering, M. Hoogstraat, K. K. Dijkstra, O. Krijgsman, T. Kuilman, C. G. Gadellaa-van Hooijdonk, D. L. van der Velden, D. S. Peeper, E. P. Cuppen, R. G. Vries, H. Clevers and E. E. Voest (2015). "Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(43): 13308-13311.

-Weiss, P. and A. C. Taylor (1960). "Reconstitution of Complete Organs from Single-Cell Suspensions of Chick Embryos in Advanced Stages of Differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **46**(9): 1177-1185.

-Wells, C. M. and E. Di Cera (1992). "Thrombin is a Na(+)-activated enzyme." *Biochemistry* **31**(47): 11721-11730.

-Wen, W., S. E. Young, M. T. Duvernay, M. L. Schulte, K. D. Nance, B. J. Melancon, J. Engers, C. W. Locuson, 2nd, M. R. Wood, J. S. Daniels, W. Wu, C. W. Lindsley, H. E. Hamm and S. R. Stauffer (2014). "Substituted indoles as selective protease activated receptor 4 (PAR-4) antagonists: Discovery and SAR of ML354." *Bioorg Med Chem Lett* **24**(19): 4708-4713.

-Wenzel, C., B. Riefke, S. Grundemann, A. Krebs, S. Christian, F. Prinz, M. Osterland, S. Golfier, S. Rase, N. Ansari, M. Esner, M. Bickle, F. Pampaloni, C. Mattheyer, E. H. Stelzer, K. Parczyk, S. Prechtel and P. Steigemann (2014). "3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions." *Exp Cell Res* **323**(1): 131-143.

-Westphalen, C. B., S. Asfaha, Y. Hayakawa, Y. Takemoto, D. J. Lukin, A. H. Nuber, A. Brandtner, W. Setlik, H. Remotti, A. Muley, X. Chen, R. May, C. W. Houchen, J. G. Fox, M. D. Gershon, M. Quante and T. C. Wang (2014). "Long-lived intestinal tuft cells serve as colon cancer-initiating cells." *J Clin Invest* **124**(3): 1283-1295.

-Williams, C. D., J. A. Satia, L. S. Adair, J. Stevens, J. Galanko, T. O. Keku and R. S. Sandler (2010). "Associations of red meat, fat, and protein intake with distal colorectal cancer risk." *Nutr Cancer* **62**(6): 701-709.

-Wilks S., (1859). "Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes." *Lond Med Gaz*;2:264-265.

-Wilson, H. V. (1907). "A New Method by Which Sponges May Be Artificially Reared." *Science* **25**(649): 912-915.

-Wilson, T. J., K. C. Nannuru and R. K. Singh (2009). "Cathepsin G recruits osteoclast precursors via proteolytic activation of protease-activated receptor-1." *Cancer Res* **69**(7): 3188-3195.

-Wolfe, B. L., A. Marchese and J. Trejo (2007). "Ubiquitination differentially regulates clathrin-dependent internalization of protease-activated receptor-1." *J Cell Biol* **177**(5): 905-916.

-Wu, Q. Y., J. P. Sheehan, M. Tsiang, S. R. Lentz, J. J. Birktoft and J. E. Sadler (1991). "Single amino acid substitutions dissociate fibrinogen-clotting and thrombomodulin-binding activities of human thrombin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(15): 6775-6779.

-Wu, S., K. J. Rhee, E. Albesiano, S. Rabizadeh, X. Wu, H. R. Yen, D. L. Huso, F. L. Brancati, E. Wick, F. McAllister, F. Housseau, D. M. Pardoll and C. L. Sears (2009). "A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses." *Nat Med* **15**(9): 1016-1022.

-Xavier, R. J. and D. K. Podolsky (2007). "Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Nature* **448**(7152): 427-434.

-Xie, J. and S. H. Itzkowitz (2008). "Cancer in inflammatory bowel disease." *World J Gastroenterol* **14**(3): 378-389.

-Xie, Y., L. Chen, X. Lv, G. Hou, Y. Wang, C. Jiang, H. Zhu, N. Xu, L. Wu, X. Lou and S. Liu (2016). "The levels of serine proteases in colon tissue interstitial fluid and serum serve as an indicator of colorectal cancer progression." *Oncotarget* **7**(22): 32592-32606.

-Xu, W. F., H. Andersen, T. E. Whitmore, S. R. Presnell, D. P. Yee, A. Ching, T. Gilbert, E. W. Davie and D. C. Foster (1998). "Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 6642-6646.

-Xu, Y. and B. Pasche (2007). "TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer." *Hum Mol Genet* **16 Spec No 1**: R14-20.

-Yan, H., A. Konstorum and J. S. Lowengrub (2017). "Three-Dimensional Spatiotemporal Modeling of Colon Cancer Organoids Reveals that Multimodal Control of Stem Cell Self-Renewal is a Critical Determinant of Size and Shape in Early Stages of Tumor Growth." *Bull Math Biol*.

-Yan, K. S., L. A. Chia, X. Li, A. Ootani, J. Su, J. Y. Lee, N. Su, Y. Luo, S. C. Heilshorn, M. R. Amieva, E. Sangiorgi, M. R. Capecchi and C. J. Kuo (2012). "The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(2): 466-471.

-Yan, K. S., O. Gevaert, G. X. Y. Zheng, B. Anchang, C. S. Probert, K. A. Larkin, P. S. Davies, Z. F. Cheng, J. S. Kaddis, A. Han, K. Roelf, R. I. Calderon, E. Cynn, X. Hu, K. Mandleywala, J. Wilhelmy, S. M. Grimes, D. C. Corney, S. C. Boutet, J. M. Terry, P. Belgrader, S. B. Ziraldo, T. S. Mikkelsen, F. Wang, R. J. von Furstenberg, N. R. Smith, P. Chandrakesan, R. May, M. A. S. Chrissy, R. Jain, C. A. Cartwright, J. C. Niland, Y. K. Hong, J. Carrington, D. T. Breault, J. Epstein, C. W. Houchen, J. P. Lynch, M. G. Martin, S. K. Plevritis, C. Curtis, H. P. Ji, L. Li, S. J. Henning, M. H. Wong and C. J. Kuo (2017). "Intestinal Enteroendocrine Lineage Cells Possess Homeostatic and Injury-Inducible Stem Cell Activity." *Cell Stem Cell* **21**(1): 78-90 e76.

-Yang, Q., N. A. Bermingham, M. J. Finegold and H. Y. Zoghbi (2001). "Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine." *Science* **294**(5549): 2155-2158.

-Yang, X. L., M. K. Ge, D. K. Mao, Y. T. Lv, S. Y. Sun and A. P. Yu (2016). "Thrombin Maybe Plays an Important Role in MK Differentiation into Platelets." *Biomed Res Int* **2016**: 9313269.

-Yazdanyar, S. and B. G. Nordestgaard (2010). "NOD2/CARD15 genotype and common gastrointestinal diseases in 43,600 individuals." *J Intern Med* **267**(2): 228-236.

-Young, M. and K. R. Reed (2016). "Organoids as a Model for Colorectal Cancer." *Curr Colorectal Cancer Rep* **12**(5): 281-287.

-Young, S. E., M. T. Duvernay, M. L. Schulte, K. D. Nance, B. J. Melancon, J. Engers, M. R. Wood, H. E. Hamm and C. W. Lindsley (2010). A Novel and Selective PAR4 Antagonist: ML354. *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*. Bethesda (MD).

-Yu, F. X., B. Zhao and K. L. Guan (2015). "Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer." *Cell* **163**(4): 811-828.

-Zain, J., Y. Q. Huang, X. Feng, M. L. Nierodzik, J. J. Li and S. Karparkin (2000). "Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells." *Blood* **95**(10): 3133-3138.

-Zeissig, S., N. Burgel, D. Gunzel, J. Richter, J. Mankertz, U. Wahnschaffe, A. J. Kroesen, M. Zeitz, M. Fromm and J. D. Schulzke (2007). "Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease." *Gut* **56**(1): 61-72.

-Zhai, Z., S. Kondo, N. Ha, J. P. Boquete, M. Brunner, R. Ueda and B. Lemaitre (2015). "Accumulation of differentiating intestinal stem cell progenies drives tumorigenesis." *Nat Commun* **6**: 10219.

-Zhang, F., S. S. Lau and T. J. Monks (2011). "The cytoprotective effect of N-acetyl-L-cysteine against ROS-induced cytotoxicity is independent of its ability to enhance glutathione synthesis." *Toxicol Sci* **120**(1): 87-97.

-Zheng, J., J. Meng, S. Zhao, R. Singh and W. Song (2008). "Campylobacter-induced interleukin-8 secretion in polarized human intestinal epithelial cells requires Campylobacter-secreted cytolethal distending toxin- and Toll-like receptor-mediated activation of NF-kappaB." *Infect Immun* **76**(10): 4498-4508.

-Zhu, L., P. Gibson, D. S. Curre, Y. Tong, R. J. Richardson, I. T. Bayazitov, H. Poppleton, S. Zakharenko, D. W. Ellison and R. J. Gilbertson (2009). "Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation." *Nature* **457**(7229): 603-607.

-Zuckerman, S. H., G. F. Evans and L. Guthrie (1991). "Transcriptional and post-transcriptional mechanisms involved in the differential expression of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA." *Immunology* **73**(4): 460-465.

Les effets de la thrombine sur l'épithélium colique humain, grâce aux organoïdes (modèle ex vivo 3D)

Morgane Sébert

La **thrombine**, une protéase à sérine connue pour être l'acteur clé de la cascade de coagulation, a été décrite pour réguler les processus apoptotiques au niveau du côlon via l'activation de récepteurs activés par des protéases ou PARs (Protease-Activated Receptors). Cependant, les effets de la thrombine sur la cellule épithéliale colique n'ont été étudiés qu'en utilisant des lignées cellulaires. Les conséquences d'une exposition à différentes doses de thrombine sur un épithélium complexe, composés de différents types cellulaires plus ou moins différenciés sont inconnues à ce jour. Un nouveau modèle cellulaire, nommé **organoïde**, permet de reconstituer un épithélium colique fonctionnel en 3-dimensions (3D) à partir de résections ou de biopsies humaines, et ce, grâce aux capacités d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules souches issues des cryptes coliques.

Le 1^{er} objectif de ma thèse a été d'évaluer les **effets de la thrombine sur la survie, la prolifération, l'apoptose et la différenciation** de l'épithélium colique humain, en utilisant le modèle organoïde. Puis, de déterminer l'implication des récepteurs PAR₁ et PAR₄ activés par la thrombine dans ces effets. Ainsi, l'ajout de thrombine (à faible dose : 10mU/mL et à forte dose : 50mU/mL) sur une culture d'organoïdes établis à partir de tissus colorectaux normaux entraîne une **diminution de moitié de l'activité métabolique** et de la **prolifération cellulaire**. Ces effets sont bloqués en présence d'un antagoniste de PAR₁. Le **processus apoptotique** est, cependant, **augmenté d'un facteur 8** en réponse à la thrombine (aux deux doses). Ce processus est inhibé en présence d'antagoniste de PAR₁ ou de PAR₄. Concernant la différenciation épithéliale, la thrombine **diminue le nombre de colonosphères** (structures immatures), au profit d'une **augmentation du nombre de structures apoptotiques et de colonoïdes** (structures plus matures présentant des néo-cryptes). Cet effet est dû à **l'activation à la fois de PAR₁ et de PAR₄** dans les cellules épithéliales coliques. Mes résultats démontrent que la thrombine exogène agit sur les processus d'apoptose, de prolifération et de différenciation sur un épithélium complexe, issu de la culture de tissus humains. L'utilisation de ce modèle *ex vivo* permet de comparer les organoïdes pathologiques et normaux, voire **de tester les effets d'approches pharmacologiques et de nouveaux médicaments sur ces cultures**. Ainsi, la 2nde partie de ce travail de thèse a été d'aborder la mise en place **des conditions de culture et d'imagerie nécessaires pour réaliser un screening à haut débit robuste et reproductible**, HCS (High-Content Screening), appliquée aux organoïdes. Les conditions de culture d'organoïdes en plaques 96-puits ont été mises au point de même que les conditions permettant d'acquérir des images répondant aux critères nécessaires pour une analyse via un système HCS. Le système Operetta HCS couplé au logiciel d'Analyse Harmony (PerkinElmer) a été utilisé pour mettre en place une procédure d'analyse permettant de **reconnaître les organoïdes, de les dénombrer, de les classer selon leur état de différenciation et de suivre leur croissance** tout au long de la culture.

Pour conclure, ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence les effets de la thrombine sur l'état métabolique, l'apoptose et la différenciation de l'épithélium colique humain, grâce au modèle 3D *ex vivo* d'organoïdes colorectaux. L'utilisation de ce modèle complète les approches jusque-là effectuées dans des modèles de lignées de cellules épithéliales, proposant une vision intégrée du comportement d'un épithélium complexe humain. L'approche HCS initiée lors de ces travaux de thèse pourrait permettre d'analyser de façon robuste et automatisée dans ce modèle, les effets d'autres composés et avoir ainsi un impact majeur sur notre compréhension des pathologies épithéliales et sur les tests de nouvelles approches thérapeutiques.

Thrombin, a serine protease known for its role in the coagulation cascade, was described for its effects on the induction of apoptosis in colonic epithelial cell lines, through the activation of Protease Activated Receptors (**PARs**). However, the effects of thrombin on complex epithelial structures such as the human intestinal epithelium composed of different cell types and cells at different stages of differentiation, has never been investigated. A new cellular model, named **organoid**, enables to reconstitute a **functional epithelium** in 3-dimensions (3D), from human resections or biopsies, thanks to **the self-renewal and differentiation** properties of stem cells isolated from colonic crypts.

The first objective of this thesis was to evaluate **thrombin's effects on survival, proliferation, apoptosis and differentiation in human colonic epithelium**, using the organoid model. Then, we aimed to determining the implication of **PAR₁ and PAR₄** in the thrombin's effects. Thus, thrombin added (at low dose: 10mU/mL and higher dose: 50mU/mL) to organoid cultures from control patients, led to a **decrease by half of metabolic activity and cell proliferation**. These effects were blocked by the addition of a **PAR₁** antagonist. **Apoptotic process was 8-fold higher in organoid cultures exposed to thrombin** (both doses) and this effect was inhibited by the addition of a **PAR₁** or a **PAR₄** antagonist. As per epithelial differentiation, thrombin **decreased the number of colonospheres** (immature structures) favoring the **increase of apoptotic structures and colonoids** (budding structures considered as more mature). This effect was due to **PAR₁ and PAR₄ activation as again, it was blocked both by PAR₁ and PAR₄ antagonist**. Taken together, these results reveal that exogenous thrombin acts on apoptosis, proliferation and differentiation processes in complex human colonic epithelium.

The use of this *ex vivo* model will allow to compare pathological *versus* normal organoid cultures, but also **to test the effects of pharmacological approaches and new treatment options directly in cultured human tissues**. Thus, the 2nd part of this thesis was to setup the best culture conditions and the best imaging conditions to perform **a robust and reproducible screening approach**, HCS (High-Content Screening), using organoid cultures. Culture conditions in 96-well plates were set up and allowed to acquire images with the HCS system. Operetta HCS coupled to an analysis software (Harmony, PerkinElmer) was used to develop a specific program enabling the **recognition of organoids, their counting, their classification according to their differentiation status and enabling to follow organoid growth in cultures**.

To sum up, the work performed allowed to highlight the effects of thrombin on metabolic status, apoptosis and differentiation of human colon epithelium, using an *ex vivo* 3D organoid model. The use this model nicely completed epithelial cell line approaches, offering an integrated view of the complex behavior of human epithelium. The HTS approach initiated within this thesis should allow the automated analysis of a number of drugs and treatments. It should help our understanding of epithelial pathologies and the testing of new therapeutic approaches.