



HAL
open science

Interactions fonctionnelles entre voies signalétiques intrinsèques et voie des hormones thyroïdiennes dans les cellules souches et progéniteurs de l'épithélium intestinal

Matthias Godart

► To cite this version:

Matthias Godart. Interactions fonctionnelles entre voies signalétiques intrinsèques et voie des hormones thyroïdiennes dans les cellules souches et progéniteurs de l'épithélium intestinal. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1138 . tel-03349926

HAL Id: tel-03349926

<https://theses.hal.science/tel-03349926v1>

Submitted on 21 Sep 2021

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

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



N°d'ordre NNT : 2019LYSE1138

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
I'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

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

Soutenue publiquement le 20/09/2019, par :

Matthias GODART

Interactions fonctionnelles entre voies signalétiques intrinsèques et voie des hormones thyroïdiennes dans les cellules souches et progéniteurs de l'épithélium intestinal

Devant le jury composé de :

Moyret-Lalle, Caroline	Professeur des Universités/UCBL, CRCL	Présidente
De Santa Barbara, Pascal	Directeur de Recherche/Inserm, Phymedexp	Rapporteur
Schubert, Michael	Directeur de Recherche/CNRS, LBD	Rapporteur
Moyret-Lalle, Caroline	Professeur des Universités/UCBL, CRCL	Examinatrice
Sachs, Laurent	Directeur de Recherche/CNRS, MNHN	Examineur
Plateroti, Michelina	Directeur de Recherche/Inserm, CRCL	Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Éducation

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Je tenais à adresser tous mes remerciements les plus sincères,

À chacun des membres du jury,

À Monsieur Schubert, Directeur de recherche CNRS, pour avoir accepté la responsabilité de rapporteur,

À Monsieur De Santa Barbara, Directeur de recherche INSERM, pour avoir également accepté la responsabilité de rapporteur,

À Monsieur Sachs, Directeur de recherche CNRS, pour avoir accepté d'être examinateur de thèse mais également d'avoir été membre de mon comité de thèse,

À Mme Moyret-Lalle, Professeure des universités à l'UDL, pour avoir accepté d'être à la fois examinatrice et présidente du jury de thèse,

Je tiens à remercier spécialement Michela Plateroti, Directrice de recherche INSERM, qui a été ma directrice de thèse et mon encadrante directe.

Merci de m'avoir permis d'exercer mon stage de Master 2 dans ton laboratoire, merci de m'avoir donné une chance et de m'avoir fait confiance. Merci de m'avoir laissé « carte blanche » pour la préparation de mon oral BMIC. Un très grand merci, pour m'avoir permis de travailler sur le modèle organoïde qui me fascine. Merci de m'avoir accompagné durant ces cinq années passées ensemble. J'avais 23 ans lorsque j'ai intégré ton équipe, je pense que j'aurais appris beaucoup de choses avec toi et que tout me servira à l'avenir à la fois dans ma vie professionnelle comme dans la vie privée.

Un grand merci aux membres actuels de l'équipe.

Merci à Carla, Docteure en pharmacie, Post-doctorante de l'équipe, « le soleil du labo ». Tu auras subi mes imitations pendant toutes ces années... Mais ne t'inquiète pas, tu n'as rien à changer. Je me rappelle encore quand on se parlait à moitié en français et en anglais dans la salle de culture au 4^{ème} étage. Finalement tu es devenue complètement bilingue mais ne perd pas ton accent car il est très charmant. Tu me connais depuis longtemps, quasiment depuis mon arrivé au laboratoire ! Espérons que nos chemins ne se séparent pas. Je ferai l'effort, un jour, de découvrir ta terre d'origine, la Sardaigne dont tu nous as souvent parlé. PS : je suis pas contre un « dernier » petit Tiramisu café ou un gâteau au citron.

Merci à Catherine, Technicienne INSERM, alias la force tranquille, travailleuse, rigoureuse, calme, drôle. J'ai vraiment apprécié travailler avec toi. Tu m'as été d'une grande aide pour plusieurs aspects de mon projet ! Peut-être qu'un jour je m'inscrirai à la « Sainté-Lyon » et que j'aurai l'occasion de passer devant chez toi pour observer ces chevaux dont on a souvent parlé. Je te souhaite bonne continuation et si à l'avenir tu organises des gouters (Tartes poire chocolat ?) compte sur ma présence.

Je n'ai malheureusement pas eu trop le temps de vous connaître mais je pense également à vous Léo, Gaspard, étudiants stagiaires, et Virginia, doctorante de l'équipe. On aura interagi uniquement dans le cadre professionnel ; c'est dommage, je pense qu'on se serait bien entendus ! À toi Léo, je te souhaite bonne continuation dans ton parcours en biologie. Sache que nos quelques discussions m'ont fait très bonne impression et je pense que si tu continues à être motivé et déterminé comme tu l'es tu feras un bon biologiste ! Gaspard, je reste persuadé que ta patience, ta discrétion et ta facilité d'apprentissage sont d'autant de qualités requises pour devenir un très bon biologiste. De la même manière que pour Léo et Gaspard, Virginia...continue ! De ce que j'ai pu voir, tu apprends vite, tu as le sens de l'observation et de la déduction. À mon avis, tes qualités font déjà de toi une très bonne doctorante. Je tenais à t'écrire en français car tu fais beaucoup de progrès. Je suis certain que dans quelques temps tu seras comme un poisson dans l'eau. Bienvenue en France, je te souhaite de passer de très bons moments parmi nous. Bonne route !

Un grand merci à tous les anciens membres de l'équipe.

Merci à Elsa Kress, Docteure en biologie, ancienne post-doctorante de l'équipe. Merci de m'avoir montré le chemin à suivre, d'avoir été un exemple. Merci de m'avoir appris à prendre du recul sur les choses de la vie et sur mon projet de thèse. Merci pour les Sub', les pizzas, bobuns et les repas raclette avec toute la bande ! Merci de m'avoir permis de rencontrer Valérie Morin qui m'a été d'un grand soutien pendant mon M2 (Valérie, on doit se revoir !). Merci de nous avoir transmis ta bonne humeur au quotidien. Tu auras beaucoup manqué à l'équipe après ton départ...

Merci à Julien Nadjar, Ingénieur d'études, ancien assistant ingénieur de l'équipe. Merci d'avoir été là pour m'apprendre à bien manier la pipette et pour nos nombreuses discussions sans fin (sur la manière d'étudier la protéine λ ou sur le rendement énergétique des congélateurs à -80°C !) D'ailleurs ça me fait penser que ça fait longtemps qu'on n'est pas allé papoter autour d'un burger et d'une bière. D'ailleurs je profite de cette partie « remerciements » et m'engage à trouver du temps pour qu'on y aille prochainement ! Un grand merci Julien.

Merci à mon ami Joël Uchuya-Castillo, Docteur en biologie, ancien doctorant de l'équipe. Tu sais tout le bien que je pense de toi, mon ami péruvien (et maintenant français également !). Tu étais et tu resteras mon « codétenu » de thèse, merci pour ça ! Tu ne pouvais pas partir comme ça, si vite...! Avec qui regarder des 9GaGs et partager la passion du football ??? En tout cas j'espère que tu es très heureux où tu es, je te souhaite toute la réussite du monde dans ta carrière professionnelle et tout le bonheur du monde dans ta vie privée.

Evidemment, je ne peux pas vous oublier Clémentine Lenevé, ancienne technicienne de l'équipe, Dounia Ben Amar, Sandrine Magat, Huong Hoang et Marie Brunchaut, anciennes étudiantes stagiaires de l'équipe. Merci pour toutes ces discussions sur les dernières séries du moment, émissions Top Chef et...la science ! Entre les potins, les anecdotes Harry Potter et j'en passe, il y en aura eu des discussions à la paillasse ! D'ailleurs Dounia je retiens que tu n'as pas fait d'escape-game avec la team, comme on a pu le faire Clem', Sandrine et moi, mais tu dois bien être occupée avec ta thèse... bon courage ! Sandrine, merci pour cet instant magique avec ton raisonnement mathématique dans le bureau de Stéphane. Clémentine merci, sincèrement, de m'avoir énormément aidé au laboratoire notamment quand je me suis cassé le bras au Ski ! Hâte de partager une boisson glacée avec vous en période de canicule ! Huong et Marie, grosse pensée pour vous qui avez déjà bien entamé votre doctorat. Je vous souhaite toutes la meilleure réussite du monde et plein de courage.

Merci à Romain Boisseau, ancien étudiant stagiaire M2. Merci pour ton amitié. Merci pour toutes ces discussions scientifiques fort intéressantes. Merci pour ta motivation. Grâce à toi je me suis remis plus sérieusement au sport avec de nouveaux objectifs. J'espère que je vais arriver à m'y tenir. On se sera juste croisé quelques mois au laboratoire ; tu auras eu le temps de vivre avec

nous la retraite du département ... Heureusement que Nico était là pour te dire d'aller te coucher !

Merci à Nicolas Aznar, Chargé de recherche CNRS, et Stéphane Ansicau, Directeur de recherche INSERM.

Stéphane je te remercie pour ton soutien. Je n'oublierai pas le temps que tu as sacrifié pour que je sois parfait au concours BMIC et que je puisse obtenir ma bourse d'études. Tu auras été un des seuls statutaires, en dehors de mon encadrant direct, à avoir fait l'effort de venir m'écouter en salle Requin. Je t'en suis très reconnaissant et c'est en grande partie grâce à tes conseils que j'ai pu être à l'aise lors des questions réponses. Évidemment, je me rappellerai toujours de tes blagues, qui aussi taquines soient-elles, étaient les bienvenues. Je regrette seulement quelques choses, on ne sera ni allés faire du sport ensemble (un petit foot ?), ni allés goûter les bières de ta région. Mais ce n'est que partie remise. J'espère qu'on aura l'occasion de partager encore des choses ensemble que ce soit professionnellement ou dans un cadre privé.

Je ne pouvais pas parler de Stéphane sans écrire avec un paragraphe sur toi Nicolas. Je ne vais pas trop m'étaler car tu sais ce que je pense de toi. On aura bu beaucoup de cafés, on aura beaucoup parlé de TRs et d'organoïdes. Sans toi le projet STEMNESS n'aurait peut-être jamais vu le jour. Tu m'as boosté et je t'en suis reconnaissant. Il y a eu des périodes de vagues, des creux et des remontés mais finalement le destin a bien fait les choses. Tu auras intégré l'équipe, eu ton poste dans la foulée, obtenu une bourse européenne. Peut-être finirons nous associés...

Un grand merci à tous les autres collègues du centre avec qui j'ai pu travailler.

Je remercie toute l'équipe Bernard ! Je ne vais pas faire de liste car vous êtes trop nombreux et j'aurais peur d'oublier quelqu'un ! En tout cas, merci pour les discussions à l'étage, merci d'avoir été là quand j'en avais besoin, merci de votre bonne humeur. Je suis très fier d'avoir pu travailler à vos côtés. Merci pour vos conseils. Merci pour les moments de détente à Monplaisir. Merci pour les sorties ! Merci à tous ! Merci à ceux qui sont encore là et merci à ceux qui sont partis mais que je n'ai pas oubliés (et qui, pour certains, ont même relu ma thèse !). Bon vent à toutes et à tous !

J'ai un petit pincement au cœur quand je pense à mes collègues de l'AS Lioris, club de foot loisir du CLB. « Since 2012 » ! Merci pour les matchs sympatiques malgré cette saison 2018/2019... Merci pour la bonne ambiance, les barbecues. Remerciement spécial pour Anthony Ferrari qui gère toute l'organisation. Je m'excuse pour toutes mes messages envoyés à la dernière minute qui ont du te faire perdre beaucoup de cheveux ! J'espère vraiment pouvoir continuer l'aventure avec vous en signant la saison prochaine !

Je remercie également tous mes collègues et amis du Master GBC (Υβχ) de l'Université Lyon1. Special thank for Anissa Guillemin, la présidente qui nous a abandonnés pour aller en Australie ! Merci Léo Laoubi dixit la pince, Marie et Marie, Ommar, Nono le ptit robot, Lulu, Sésé, Sysy, Claire, Sandrine, Manon, Alysée, Claudine, Anne-Line, Thomas, Paul, Marlène « sasoeur », Jordan, Kévin (faudrait se refaire une session guitare non ?). Désolé si j'ai oublié quelqu'un la liste est longue !

Enfin, je remercie également tout mon entourage proche.

J'ai une pensée particulière pour les membres de la famille Vittori qui m'ont motivé et encouragé. Merci de s'être portés volontaire pour la relecture de ma thèse. Merci également pour les soirées détentes à la campagne. Désolé de ne pas être plus souvent venu vous voir.

Thomas, Cyril, mes amis de longue date, merci d'avoir supporté mes absences, mes excuses. Merci d'être là et d'avoir partagé de très bons moments avec moi (Colloc, ski, rando et j'en passe). Je vous remercie de m'avoir aidé à prendre du recul sur moi-même et mon travail durant ces quatre années. Rendez-vous après ma soutenance pour de nouvelles aventures !

Évidemment, je ne peux pas oublier de remercier toute ma famille. Il faut savoir que sans vous, très chers parents, jamais je ne serais allé aussi loin dans ma formation universitaire. Merci de m'avoir poussé à réussir. Merci avoir été là pour moi quand j'en avais besoin. Merci de vous être battus pour moi. J'aurai mille fois l'occasion de vous embrasser mais je tenais quand même à vous inclure dans les remerciements officiels. Un grand merci également à Jessica et Elisa, mes petites soeurs ! Bon courage pour vos études, maintenant c'est votre tour !

Enfin je tenais à remercier Caroline celle qui a été auprès de moi tous les jours depuis maintenant quatre ans. Merci d'avoir supporté mes nombreuses périodes de stress. Merci de m'apporter beaucoup de stabilité. Merci d'avoir fini par céder pour que nous puissions adopter Malice, qui finalement aura bien contribué à ma dette de sommeil !

*« La science a fait de nous des Dieux avant même que nous
méritions d'être des Hommes »*

Pensées d'un biologiste, Jean Rostand

RÉSUMÉ

Interactions fonctionnelles entre voies signalétiques intrinsèques et voie des hormones thyroïdiennes dans les cellules souches et progéniteurs de l'épithélium intestinal

Résumé

Les hormones thyroïdiennes (HTs) contrôlent plusieurs aspects du développement et de l'homéostasie intestinale. Elles agissent *via* des récepteurs nucléaires (TRs), facteurs de transcription modulés par la T3. Le paradigme est la métamorphose des amphibiens où elles sont responsables du remodelage du tube digestif et de l'émergence des cellules souches. Des études précédentes ont montré que les HTs jouent un rôle fondamental en régulant la balance entre prolifération et différenciation des précurseurs épithéliaux murins. Du point de vue moléculaire, le récepteur nucléaire TR α 1 contrôle plusieurs gènes du cycle cellulaire/prolifération ainsi que les voies de signalisation Wnt et Notch. En accord avec ces fonctions, l'expression ciblée de TR α 1 dans l'épithélium intestinal (souris *vil-TR α 1*) est suffisante pour induire des cryptes aberrantes, hyper-prolifératives et confère une sensibilité accrue au programme de tumorigénèse intestinale dépendant de la mutation dans le gène *Apc* (*vil-TR α 1/Apc^{+1638N}*). Durant ma thèse, j'ai étudié le contrôle des cellules souches intestinales, dépendant des HTs/TRs. En effet, j'ai utilisé des souris *Lgr5-EGFP-CreERT2* permettant de traquer, trier et cibler les cellules souches que j'ai croisées avec le modèle murin inductible au tamoxifène TR α 1-LOF (Loss-of-function). J'ai étudié les effets de l'altération de la voie HTs/TR α 1 *in vivo* et dans des organoïdes intestinaux (*ex vivo*). J'ai pu montrer que les HTs et la modulation de l'expression ou de l'activité de TR α 1 affectent rapidement et fortement les cellules souches intestinales. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude des signaux dépendants des HTs/ TR α 1 dans la physiopathologie des cellules souches intestinales.

Mots clés: Épithélium intestinal, cellules souches, hormones thyroïdiennes, organoïdes

Summary

Thyroid hormones (THs) control several aspects of gut development and homeostasis. They act through the thyroid hormone nuclear receptors (TRs) that are T3-modulated transcription factors. The paradigm is the amphibian metamorphosis, where they are responsible for gut remodeling and emergence of the stem cells. In previous studies we showed that THs play a fundamental role in regulating the balance between cell proliferation and cell differentiation of the murine intestinal epithelial precursors. From a molecular point of view the nuclear receptor TR α 1 controls several proliferation/cell-cycle genes as well as the Wnt and Notch. In accordance with these functions, targeted expression of TR α 1 in the intestinal epithelium (*vil-TR α 1* mice) is sufficient to induce aberrant and hyper-proliferative crypts and confers increased susceptibility to *Apc*-mutation dependent intestinal tumorigenic program (*vil-TR α 1/Apc^{+1638N}* mice). During my PhD, I studied TH- and TR α 1-dependent control of intestinal stem cells. Indeed, I used the *Lgr5-EGFP-CreERT2* mice enable tracking, sorting and targeting the stem cells crossed with tamoxifen inducible TR α 1 loss-of-function mouse model (TR α 1-LOF). I studied the effect of TH/TR α 1 alteration *in vivo* and in intestinal organoids (*ex vivo*). My results indicate that HTs and modulating TR α 1 expression or activity have a rapid and strong effect on the intestinal stem cells. This work opens a new perspective in the study of TH/TR α 1-dependent signal on the physiopathology of the intestinal stem cells.

Keywords: Intestinal epithelium, stem cells, thyroid hormones, organoids

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	4
RESUME.....	12
TABLE DES MATIERES.....	14
LISTE DES ABREVIATIONS.....	16
INTRODUCTION.....	18
PREMIERE PARTIE.....	20
L'INTESTIN.....	20
I. <u>PHYSIOLOGIE DE L'INTESTIN</u>.....	20
A. TUBE DIGESTIF ET ROLE DE L'INTESTIN.....	20
B. STRUCTURE DE L'INTESTIN.....	20
1. La muqueuse et ses replis.....	21
a) Les villosités et microvillosités.....	21
b) Les cryptes de Lieberkhün.....	22
2. Les supports de la muqueuse.....	22
a) La lamina propria (ou chorion).....	22
b) La musculaire muqueuse.....	23
3. La sous-muqueuse.....	23
4. La musculuse.....	23
5. La séreuse.....	23
II. <u>L'EPITHELIUM INTESTINAL</u>.....	25
A. STRUCTURE GENERALE DE L'EPITHELIUM INTESTINAL.....	25
B. LES CELLULES DIFFERENCIEES DE L'EI.....	27
1. Les entérocytes.....	27
2. Les cellules caliciformes.....	27
3. Les cellules entéroendocrines.....	28
4. Les cellules Tuft.....	29
5. Les cellules de Paneth.....	29
III. <u>L'AUTORENOUVELLEMENT DE L'EI</u>.....	32
A. LES CELLULES SOUCHES.....	32
1. La quête des cellules souches.....	32
2. Une « zone souche ».....	36
3. Asymétrie ou symétrie ?.....	39
4. La niche des cellules souches.....	41
B. DETERMINATION DES LIGNAGES CELLULAIRES.....	47
1. Les grandes voies moléculaires impliquées.....	47
a) La voie de signalisation Wnt/ β -caténine.....	47
b) La voie de signalisation Notch.....	49
c) La voie de signalisation Shh.....	53
d) La voie de signalisation TGF- β /BMP.....	54
e) La voie de signalisation Hippo/YAP.....	55
2. Un équilibre dynamique entre les lignages.....	57
IV. <u>UN MODELE : LES ORGANOÏDES INTESTINAUX</u>.....	63
A. PREMIERS MODELES DE CULTURE PRIMAIRE D'EI.....	63
B. LE MODELE « ORGANOÏDE » PAR T. SATO.....	64

C. ORGANOÏDES ET CONDITIONS DE CULTURE.....	65
DEUXIEME PARTIE	69
LES HORMONES THYROÏDIENNES	69
I. <u>PHYSIOLOGIE DE LA GLANDE THYROÏDIENNE</u>.....	69
A. STRUCTURE ET ROLE DE LA GLANDE THYROÏDIENNE	69
B. HISTOLOGIE DE LA GLANDE THYROÏDIENNE	70
C. BIOSYNTHESE DES HORMONES THYROÏDIENNES.....	72
1. Présentation des hormones thyroïdiennes.....	72
2. Production des hormones thyroïdiennes	74
3. Contrôle de la production des hormones thyroïdiennes	75
4. Transport des hormones thyroïdiennes	76
II. <u>LES RECEPTEURS NUCLEAIRES DES HORMONES THYROÏDIENNES</u>	78
A. LA SUPERFAMILLE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES	78
B. LA STRUCTURE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES	78
C. CAS DES RECEPTEURS NUCLEAIRES DES HORMONES THYROÏDIENNES	79
1. Généralités	79
2. Modes d'action des TRs	83
a) Les séquences régulatrices.....	83
b) La dimérisation des récepteurs.....	84
c) Liaisons à des co-facteurs.....	84
III. <u>INTESTIN ET HORMONES THYROÏDIENNES</u>	87
A. INTERVENTION DES HORMONES THYROÏDIENNES LORS DE LA METAMORPHOSE CHEZ XENOPUS LAEVIS.....	87
1. Induction de la métamorphose	87
2. L'avantage du modèle amphibien par rapport aux mammifères	88
3. Récepteurs des hormones thyroïdiennes et métamorphose	88
4. Remodelage de l'intestin et cellules souches	90
B. LES HORMONES THYROÏDIENNES CHEZ LES MAMMIFERES.....	93
1. Hormones thyroïdiennes et développement	93
2. Hormones thyroïdiennes et développement de l'intestin.....	95
3. Voie des TRs et intestin	96
RESULTATS	104
ARTICLE DE REVUE.....	107
DISCUSSION.....	108
I. <u>CONTEXTE DE LA DISCUSSION</u>.....	109
II. <u>IMPACT DES HTS SUR L'AUTORENOUVELLEMENT</u>	111
A. ORGANOÏDES, T3 ET ALTERATION DE CROISSANCE.....	111
B. ORGANOÏDES, T3 ET PERTES DES CELLULES SOUCHES.....	117
C. ORGANOÏDES, UN EFFET PARADOXE DE LA T3	120
III. <u>ETUDE DE LA VOIE DES HTS/TRS</u>.....	122
IV. <u>HYPOTHESES & PERSPECTIVES</u>	125
A. ORGANOÏDES, T3 ET VOIES METABOLIQUES.....	125
B. HYPOTHESE DE L'IMPLICATION D'AMPK, PGC-1A ET PPAR.....	131
C. HYPOTHESE D'UN DEFICIT EN SUBSTRATS	134
D. REcul SUR LE MODELE EXPERIMENTAL.....	136
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	139

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT : Sérotonine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ALI : Air-liquid interface
ATP : Adénosine triphosphate
BHLH : Basic helix-loop-helix
BMP : Bone morphogenic proteins
CBC : Columnar base cells
CH : Chylomycrons
CRC : Colorectal cancer
DIO : Deiodinase
DIT : Di-iodo-tyrosines
DR : Direct repeat
EGF : Epidermal growth factor
EI : Epithélium intestinal
FAO : Fatty acid oxidation
FGF : Fibroblast growth factor
GFP : Green fluorescent protein
ID : Intestin distal
IFABP : intestinal fatty acid protein
IG : Intestin grêle
IP : Intestin proximal
LRC : Label-retaining cells
MET : Microscopie électronique en transmission
miRNA : micro Ribonucleic acid
MIT : Mono-iodo-tyrosines
MRF : Myogenic regulatory factors
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
NRR : Negative regulatory region
NTS : Neurotensine
OXPHOS : Oxidative phosphorylation system
PAS : Periodic acid shiff

PPRE : Peroxisome proliferator response element
PTU : Propylthiouracile
RFP : Red fluorescent protein
RN : Récepteur nucléaire
SNC : Système nerveux central
T3 : 3,5,3'-triiodothyronine
T4 : 3,5,3',5'-tetraiodothyronine
TA : Transit amplifying
TCGA : The cancer genome atlas
TG : Thyroglobuline
TGD : Tryglycérides
TGF : Tumor growth factor
TRE : Thyroid hormone response element
TRH : Thyrotropin-releasing hormone
TRs : Récepteur nucléaire des hormones thyroïdiennes
TR α : Thyroid hormone receptor alpha
TR α 1-LOF : TR α 1-Loss of function
TR β : Thyroid hormone receptor beta
TSH : Thyroid stimulating hormone
VPA : Valproate/Valproic acid
WRE : Wnt response element

INTRODUCTION

Mes résultats de thèse étant centrés sur la compréhension de la physiologie de l'intestin et en particulier de l'impact des hormones thyroïdiennes sur l'épithélium intestinal, j'ai délibérément choisi de vous présenter une introduction principalement focalisée sur des mécanismes physiologiques chez la souris. De ce fait, j'ai volontairement omis de décrire les cancers et plus précisément les cancers du tube digestif ainsi que l'impact des hormones thyroïdiennes sur ces derniers.

PREMIÈRE PARTIE

L'intestin

I. Physiologie de l'intestin

A. Tube digestif et rôle de l'intestin

Par définition, le tube digestif sert de conduit, de guide aux aliments ingérés par l'organisme. Tout au long de leur trajet les aliments transitent dans différents compartiments, organes, ayant chacun une fonction particulière dans le processus de digestion. L'intestin fait partie intégrante de ce tube et son rôle est majeur dans la survie des organismes car il est responsable de l'absorption de l'eau et des nutriments contenus dans le chyme provenant de l'estomac (Kiela & Ghishan, 2016). Cette fonction est soutenue par des glandes annexes telles que le pancréas et le foie et est pilotée par le système nerveux entérique (Furness et al, 2014). C'est un organe important car son rôle va au-delà du processus de digestion. Il constitue par exemple une véritable barrière physique et biologique face aux agents pathogènes de l'environnement extérieur (Maldonado-Contreras & McCormick, 2011).

B. Structure de l'intestin

L'intestin est situé entre l'estomac et l'anus. Il est segmenté en deux grandes régions : l'intestin grêle (IG) et le gros intestin (cæcum, côlon, rectum). L'IG est lui-même sous-divisé en trois sous-régions. Entre l'estomac et l'anus on trouve dans l'ordre : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Durant mon travail de thèse, je me suis focalisé sur ces deux derniers que je décris par la suite. De fait, quand je parlerai généralement de l'IG j'évoquerai le jéjunum et l'iléon.

La paroi de l'IG présente différentes couches de tissu. De manière générale, on retrouve toujours une couche muqueuse, une sous-muqueuse, une musculuse et une séreuse. Si on ouvre l'intestin et qu'on le pose à plat, la muqueuse est la partie la plus superficielle de l'organe. En effet, c'est la couche de tissu qui borde ce qu'on appelle la lumière intestinale, l'espace où transite le bol alimentaire et les agents pathogènes extérieurs.

1. La muqueuse et ses replis

La muqueuse est également appelée membrane muqueuse. Cette couche de revêtement n'est pas lisse, bien au contraire, elle possède de nombreux replis appelés plis circulaires (ou valvules conniventes ou plis de Kerckring) qui lui permettent d'augmenter sa surface afin d'accroître l'efficacité d'absorption des nutriments (Maldonado-Contreras & McCormick, 2011).

a) Les villosités et microvillosités

La muqueuse intestinale est bordée par des villosités. Ce sont des structures en doigts de gants, des protrusions aplaties de muqueuse, qui pointent en direction de la lumière et qui sont tapissées d'un épithélium de surface monocouche (une seule couche de cellules) que je décris plus loin. Les valvules conniventes (gros replis de muqueuse) impliquent la sous-muqueuse tandis que les villosités n'impliquent que la muqueuse (**figure 1**). On retrouve ces structures uniquement dans l'IG, pas dans le gros intestin. À noter que les villosités ont la particularité d'être plus longues et plus fines dans l'IG proximal (jéjunum, IP) que dans l'IG distal (iléon, ID) (Gulbinowicz et al, 2004).

Les cellules de l'épithélium intestinal (EI) qui tapissent les villosités sont des cellules dites différenciées, c'est à dire des cellules qui ont acquis une ou des fonctions bien déterminée(s). Dans ce compartiment, on observe différents types de cellules. On trouve par exemple des cellules absorbantes, les entérocytes. Ces derniers sont également pourvus de micro-replis, côté apical, qu'on appelle les microvillosités. Tout comme les valvules conniventes, ces microvillosités ont pour but d'augmenter la surface de cellules et ainsi d'accroître l'efficacité d'absorption. Les cellules mises côte-à-côte, pourvues de microvillosités, forme une bordure de micro-replis dynamique car les microvillosités qui la composent sont formées de filaments d'actine qui battent en rythme pour faciliter le transit et l'absorption des nutriments (Gayer & Basson, 2009). On peut très bien l'observer en MET (microscopie électronique à transmission).

Les villosités sont orientées, on parle alors de base lorsqu'on se situe en bas de la villosité et d'apex lorsqu'on se situe à la pointe de la protrusion (**figure 1**), endroit où les cellules qui sont en fin de vie se décrochent dans la lumière pour être expulsées hors de l'organisme. En parallèle, les cellules mortes sont remplacées par de plus jeunes cellules qui prennent vie dans les cryptes de Lieberkhün.

b) Les cryptes de Lieberkhün

À chaque villosité sont associées plusieurs cryptes de Lieberkhün. Il y a donc plus de cryptes que de villosités dans l'IG (Cheng & Bjerknes, 1985) et elles font corps avec ces dernières. En effet la monocouche de cellules épithéliales est continue tout le long de l'axe crypte-villosité. Ces structures aussi appelées glandes intestinales, sont de forme tubulaire et s'invaginent en direction de la sous-muqueuse jusqu'à la musculaire muqueuse. Au fond de ces petits compartiments se trouvent des cellules souches (décrites plus loin) qui sont à la base du renouvellement cellulaire de l'épithélium. En donnant naissance à de nouvelles cellules dites « filles » (cellules hautement prolifératives de la zone TA « transit amplifying ») dont le but est de remplacer les cellules plus vieilles situées en haut des villosités, les cellules souches garantissent le maintien de l'état de l'épithélium. Il est renouvelé entièrement tous les 4 à 5 jours chez les mammifères (van der Flier & Clevers, 2009) (**figure 1**).

2. Les supports de la muqueuse

a) La *lamina propria* (ou chorion)

Cette partie de la muqueuse qu'on appelle aussi le mésenchyme est au contact direct de l'épithélium. En effet, en étant située sous la monocouche de cellules elle lui sert de base, de support physique. Une série d'études effectuées dans les années 80 et 90 a montré que le chorion est structuré en feuillets (Roulis & Flavell, 2016). Au contact direct de l'épithélium se trouve le premier feuillet, une fine couche de polymères de protéines, essentiellement des laminines et des fibronectines associées à des collagènes et protéoglycane, qu'on appelle la lame basale. Ces protéines sont sécrétées en partie par les cellules mésenchymateuses du second feuillet, des fibroblastes subépithéliaux organisés en un réseau (réticulaire) fin de 3 à 7 μ m d'épaisseur (Frantz et al, 2010; Roulis & Flavell, 2016). L'ensemble protéines-cellules forme ce qu'on appelle la membrane basale (**figure 2**). À noter que les fibroblastes subépithéliaux sont de type myofibroblastique (α -Sma+) et ont été montrés dans plusieurs études comme étant la source de facteurs moléculaires (ex : ligands Wnt) participant à la constitution de la niche des cellules souches des cryptes (Roulis & Flavell, 2016) (Puschhof & Clevers, 2018) (**figure 6** et **figure 8**). Sous la membrane basale, le dernier feuillet est constitué d'autres fibroblastes qui s'organisent dans un réseau plus lâche et dont la l'organisation structurale varie selon le placement : autour de la crypte ou sous la villosité (Furuya & Furuya, 2007).

Le chorion est également traversé par d'autres structures telles que des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques, des fibres nerveuses et d'autres cellules immunitaires

libres (macrophages et plasmocytes essentiellement) (**figure 1**). L'ensemble forme un véritable système de capillaires en réseau qui draine le sang et la lymphe au contact de l'épithélium. Une ou deux artérioles se dirigent jusqu'au sommet de la villosité et le réseau capillaire qui en émane s'étale sous l'épithélium. Des fibres nerveuses parasymphatiques (système nerveux autonome) innervent les faisceaux fins de cellules musculaires lisses enrobant les capillaires (muscles de Brücke) de manière à ce que l'ensemble forme une véritable pompe, la pompe villositaire.

b) La musculaire muqueuse

La musculaire muqueuse est la partie de tissu située sous le chorion (**Figure 1**). Comme son nom l'indique elle est constituée d'une mince couche de cellules musculaires lisses. C'est de cette fine couche de cellules que se projettent de fins faisceaux musculaires qui enrobent les vaisseaux sanguins présents dans le chorion sus-jacent.

3. La sous-muqueuse

La sous-muqueuse est, comme son nom l'indique, située sous la muqueuse (**figure 1**). Elle est composée d'un tissu conjonctif essentiellement fourni en collagènes et en élastine dans le but de favoriser la dilatation et l'allongement du tube intestinal. Elle est traversée par de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques et est également le lieu où se trouvent les plexi de Meissner (plexi sous-muqueux) qui projettent des fibres nerveuses dans la musculaire muqueuse.

4. La musculuse

Elle est bien plus épaisse que la couche musculaire muqueuse et s'organise en deux zones (**figure 1**). Une couche interne épaisse circulaire et une couche plus fine longitudinale. Son rôle intervient dans le péristaltisme, c'est à dire dans la contraction (couche interne) et le raccourcissement (couche externe) du tube digestif de manière à ce que le contenu du tube digestif transite progressivement jusqu'à la sortie.

5. La séreuse

La membrane séreuse est la couche la plus externe de l'intestin. Son rôle est d'enrober les organes de la cavité abdominale. Elle est composée d'un tissu conjonctif lâche bordé sur sa face externe par un mésothélium c'est à dire un épithélium pavimenteux simple.

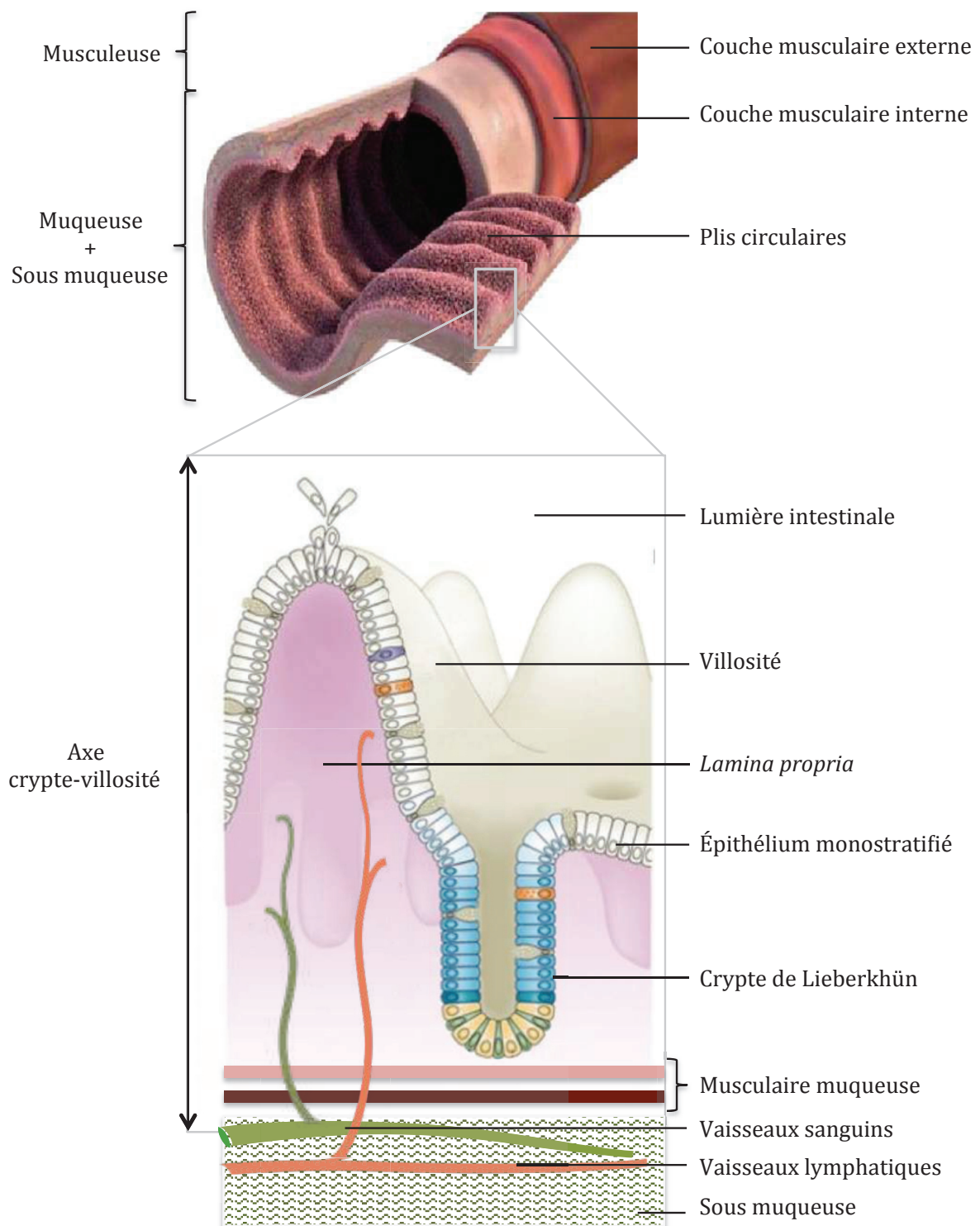


Figure 1 : Structure générale de l'intestin. Le tube intestinal est composé de plusieurs couches de tissus. La muqueuse présente de grands replis circulaires (plis de Kerckring) et de plus petits replis (villosités, cryptes). Des vaisseaux lymphatiques et sanguins qui traversent la musculaire muqueuse puis la *lamina propria* irriguent la muqueuse jusqu'au contact de l'épithélium monostratifié. Fonds d'images tirés et adaptés de la littérature (Barker, 2014) et (Schuijers & Clevers, 2012).

II. L'épithélium intestinal

A. Structure générale de l'épithélium intestinal

Ce qui caractérise un épithélium c'est la présence d'une lumière mais également le fait que les cellules soient cohésives, jointives les unes par rapport aux autres. Les épithélia sont regroupés en trois grandes catégories : les épithélia simples, stratifiés ou pseudostratifiés. Dans le cas de l'EI, il s'agit d'un épithélium cylindrique simple (monostratifié), c'est à dire qu'il comporte une unique couche de cellules cylindriques qui borde la lumière intestinale et qui repose sur la membrane basale. Pour assurer son rôle de barrière biologique et physique, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre I, les cellules de l'EI sont étroitement collées les unes aux autres par des molécules d'adhérence et complexes jonctionnels toujours organisés de la même manière par rapport à l'axe de polarité de la cellule.

On trouve dans l'ordre les jonctions serrées, les jonctions d'ancrage, les jonctions communicantes et les hémidesmosomes (apical → basal : microvillosités → lame basale) (**figure 2**):

- La *zonula occludens* (complexes de jonctions serrées) : complexes protéiques (claudines et occludines) étanches situés côté apical (proche de la bordure en brosse, côté lumière). Elle délimite les domaines de membrane apicaux/basolatéraux et empêche de passage de molécules entre les cellules.
- La *zonula adherens* : jonction d'ancrage située sous les jonctions serrées, dans le domaine basolatéral de la cellule épithéliale. Elle est formée de complexes protéiques caténines-cadhérines eux-mêmes liés aux microfilaments d'actine du cytosquelette.
- La *macula adherens* : comme la *zonula adherens*, c'est une jonction d'ancrage à la différence près que celle-ci est formée de complexes protéiques liés aux filaments intermédiaires du cytosquelette.
- Les jonctions communicantes (jonctions GAP) : formées à base de 6 protéines qu'on appelle les connexines, reliées entre elles pour former des structures poreuses en forme de « tonneau », les connexons. Elles garantissent les échanges de molécules entre le cytoplasme des cellules épithéliales et les capillaires présents dans la membrane basale.
- Les hémidesmosomes : jonctions protéiques de support dont le but est de lier la lame basale extérieure aux filaments intermédiaires du cytosquelette.

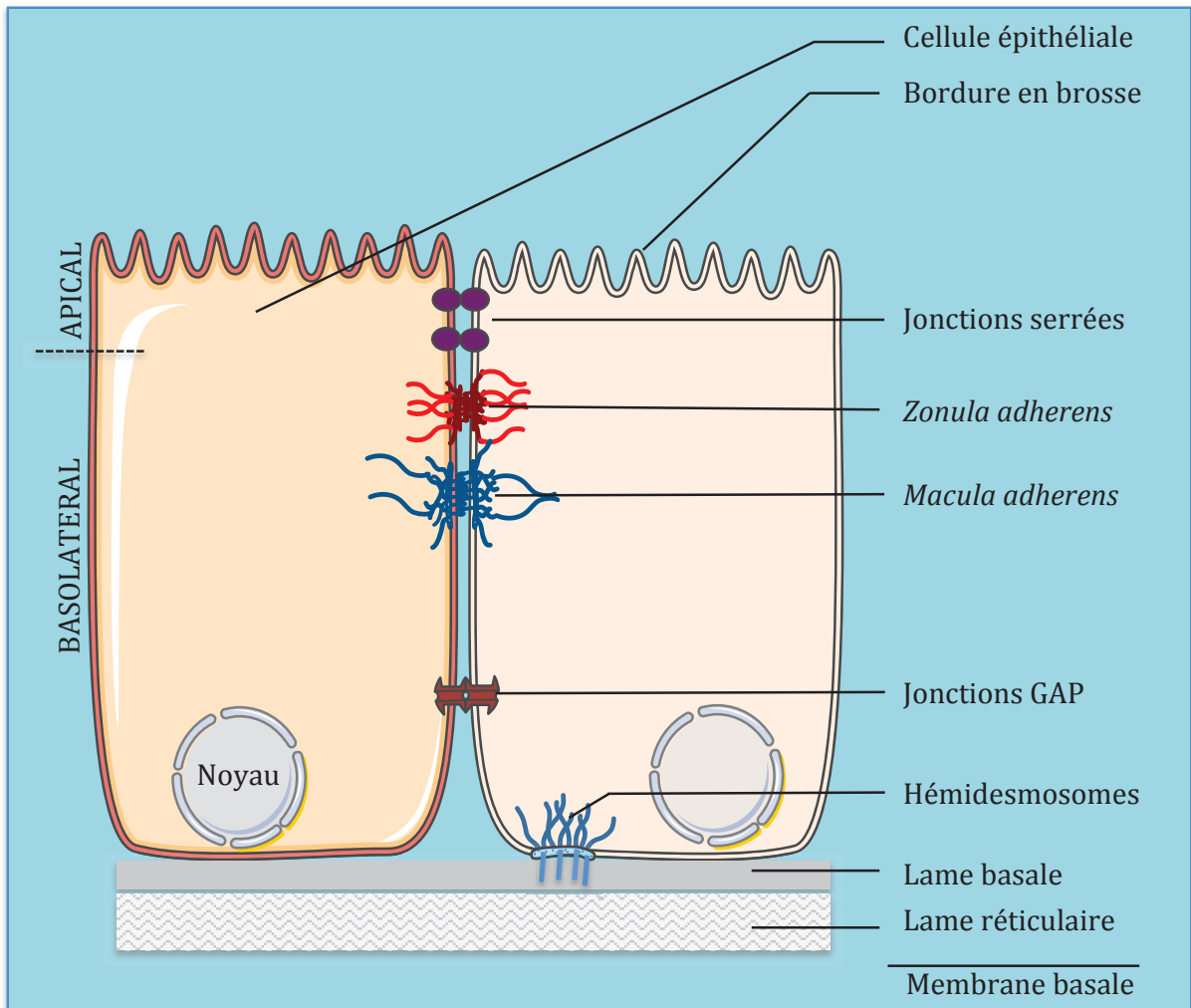


Figure 2 : Les jonctions d'adhérence. Deux cellules épithéliales sont représentées, des entérocytes. On observe la bordure en brosse à leur pôle apical et les cellules sont jointives. De nombreuses jonctions favorisent les contacts Cellule-Cellule (serrées, adhérence) et Cellule-Membrane basale (hémidesmosomes). Le transfert de molécules entre cellules et vers les capillaires sanguins se fait par des jonctions GAP.

B. Les cellules différenciées de l'EI

1. Les entérocytes

On les appelle également cellules colonnaires du fait de leur forme prismatique (cellules hautes et étroites). Ces cellules absorbantes représentent la majeure population de l'épithélium intestinal puisque plus de 80% des cellules sont des entérocytes (Karam, 1999) (**figure 2** et **figure 3**).

Comme on a pu le voir, ces cellules portent les microvillosités sur leur pôle apical formant une structure appelée la bordure en brosse. Elles sont également coiffées d'un gel de glycoprotéines et de glycolipides des mucines comme par exemple Muc2 (Schneider et al, 2018) d'une épaisseur qui varie entre 0,1 et 0,5µm d'épaisseur, qu'on appelle le glycocalyx (Maury et al, 1995). Ce gel très hydrophile, car chargé en eau, sert à protéger la bordure en brosse (Pelaseyed et al, 2014) face aux agressions de l'environnement luminal (agents bactériens, autres) (Johansson & Hansson, 2011).

Au niveau des microvillosités, on note la présence d'enzymes capables de digérer des hydrates de carbones (telles que des lactases, maltases, sucrases) et des protéines (protéases). Elles digèrent des peptides (bi et tri-peptides) et des hexoses (monosaccharides) qui sont pris en charge par des transporteurs protéiques situés dans la membrane plasmique. Dans le cytoplasme, les peptides sont digérés en acides-aminés qui diffusent, comme les sucres, jusqu'au domaine membranaire basolatéral pour rejoindre la circulation sanguine *via* le plexus vilieux (réseau de capillaires sous-villositaire). Les cellules colonnaires absorbent aussi des lipides présents sous forme de micelles. Dans le cytoplasme, la machine intracellulaire prend en charge les micelles. Dès lors qu'elles sont liées à des protéines de liaison aux acides gras (Fatty acid binding proteins, FABP), le réticulum (réticulum endoplasmique lisse, REL) les estérifie en triglycérides (TGD) qui seront transformés en chylomicrons (Ch) dans l'appareil de Golgi. Ces derniers fusionnent alors avec la membrane basolatérale et rejoignent la circulation lymphatique du chorion (chylifère central).

2. Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes (ou « Goblet cells ») sont des cellules épithéliales cylindriques particulières car leur pôle apical est plus évasé que leur pôle basal ce qui leur donne ainsi une forme de calice ou d'amphore, d'où leur nom (**figure 3**). Si ce pôle apical est élargi par rapport

au reste de la cellule c'est parce qu'il contient de nombreuses granules contenant des protéines, qu'on appelle les mucines (essentiellement Muc2). Lors de l'exocytose les mucines sont libérées sur le revêtement épithélial et se mélangent à l'eau pour y former du mucus, un lubrifiant nécessaire facilitant le passage des fèces. Au pôle basal se localisent le noyau et les autres organites de la cellule. Les mucines étant des protéoglycanes et donc des hydrates de carbones, elle peuvent être marquées avec par coloration PAS (Periodic acid Schiff). Ainsi, les granules des cellules caliciformes apparaissent rouge magenta. En terme de récurrence, plus on avance vers le colon plus on trouve de cellules caliciformes. Elles représentent environ 4% des cellules dans le duodénum contre environ 16% dans le colon descendant (Karam, 1999; van der Flier & Clevers, 2009).

3. Les cellules entéroendocrines

Elles représentent une population très restreinte puisque seulement environ 1% des cellules de l'EI sont des cellules endocrines (Cheng & Leblond, 1974b) (**figure 3**). Elles sont également appelées cellules neuroendocrines. En effet, même s'il a été démontré que ces cellules proviennent du feuillet embryonnaire originaire de l'intestin (endoderme) et non des neurones (crête neurale) (Andrew, 1976; Andrew et al, 1998; Fontaine et al, 1977; Le Douarin & Teillet, 1973) elles partagent tout de même des marqueurs communs avec ces derniers. D'ailleurs, à leur pôle apical elles présentent quelques microvillosités tandis qu'à leur pôle basal un neuropode pourrait communiquer avec le système nerveux entérique (Bohorquez et al, 2015). Si on retrouve des similarités entre ces deux types de cellules provenant de tissus bien distincts c'est parce que le processus moléculaire de différenciation intestinale endocrine est régulé de manière similaire au processus de différenciation dans le système nerveux (Schonhoff et al, 2004). En effet, la différenciation endocrine et la différenciation nerveuse semblent être régulées par des gènes similaires, voire parfois identiques, codant pour des facteurs de transcription de type bHLH (basic Helix-Loop-Helix) régulés par la voie Notch (Schonhoff et al, 2004).

Leur rôle est d'envoyer des signaux *via* la circulation sanguine dont la fonction va indirectement influencer le comportement physiologique des organes du tube digestif, par exemple en préparant le corps à l'absorption des nutriments *via* des signaux qui vont promouvoir la sécrétion d'insuline. Ces cellules sécrètent par exemple (dans le jéjunum et l'iléon) de la sérotonine (5-HT), de la neurotensine (Nts), du GLP1 ou 2 (Glucagon-like peptide 1 ou 2) et qui répondent à la présence des nutriments dans la lumière intestinale (monosaccharides, acides aminés, acides gras etc..) (Gribble & Reimann, 2016). Le type d'hormones sécrétées va varier en fonction des cellules endocrines et de leur localisation dans le

tube digestif (ex : cellules sécrétant de la gastrine dans l'estomac, cellules à cholecystokinine et sécrétine dans le duodénum).

4. Les cellules Tuft

La caractéristique structurale de ces cellules leur vaut leur nom. En effet, la présence d'une « touffe » (Tuft) de microvillosités coiffe leur pôle apical (**figure 3**). Il y a une dizaine d'années, des chercheurs ont décrit la présence de cellules « atypiques » (« peculiar cells ») dans la trachée et l'estomac de rongeurs (Jarvi & Keyrilainen, 1956; Rhodin & Dalhamn, 1956). Alors qu'elles ont d'abord été classées comme des cellules entéroendocrines (Formeister et al, 2009; Kokrashvili et al, 2009) et que leur processus de différenciation présente des similitudes avec celui des autres cellules sécrétoires intestinales (Gerbe et al, 2011), aujourd'hui elles ont leur place en tant qu'entité propre du lignage sécrétoire de l'EI. Un des rôles des cellules Tuft est leur implication dans la réception de signaux parasites dans des mécanisme de réaction immunitaire de type 2 (Gerbe & Jay, 2016; Gerbe et al, 2016).

5. Les cellules de Paneth

Les dernières cellules du lignage sécrétoire sont les cellules de Paneth (**figure 3**). Contrairement aux autres cellules différenciées qui se localisent au dessus des progéniteurs, c'est à dire en haut des cryptes et le long des villosités, les cellules de Paneth se trouvent tout en bas des cryptes où elles s'intercalent avec les cellules souches et y vivent pendant plusieurs semaines (Clevers & Batlle, 2013; Date & Sato, 2015). Lorsqu'elles meurent, ces cellules se fragmentent et sont phagocytées par les macrophages infiltrés dans la *lamina propria*.

Les cellules de Paneth ont un véritable rôle dans le maintien de l'homéostasie (état d'équilibre physiologique) de l'EI (**figure 6** et **figure 8**) :

- Elles agissent en tant que cellules sécrétrices de peptides antimicrobiens (tels que les défensines et les lysozymes), des substances importantes dans l'interaction hôte-microbiote. Leur capacité sécrétoire réside dans leur architecture avec un pôle apical riche en granules sécrétoires éosinophiles, un réticulum endoplasmique et appareil de Golgi bien développé (Gassler, 2017)
- Elles sont la source de ligands intervenant dans la constitution de la niche (microenvironnement) des cellules souches intestinales. En fait, cela va même au delà de

la simple production de ligands (Wnt3, EGF, et Notch) car elle constitue un support important pour les cellules souches. En effet, le laboratoire du professeur Hans Clevers a montré que les cellules Panethiennes sont essentielles pour le maintien des cryptes et des cellules souches de l'EI (Sato et al, 2011b). Je détaille cet aspect dans le paragraphe « la niche des cellules souches ».

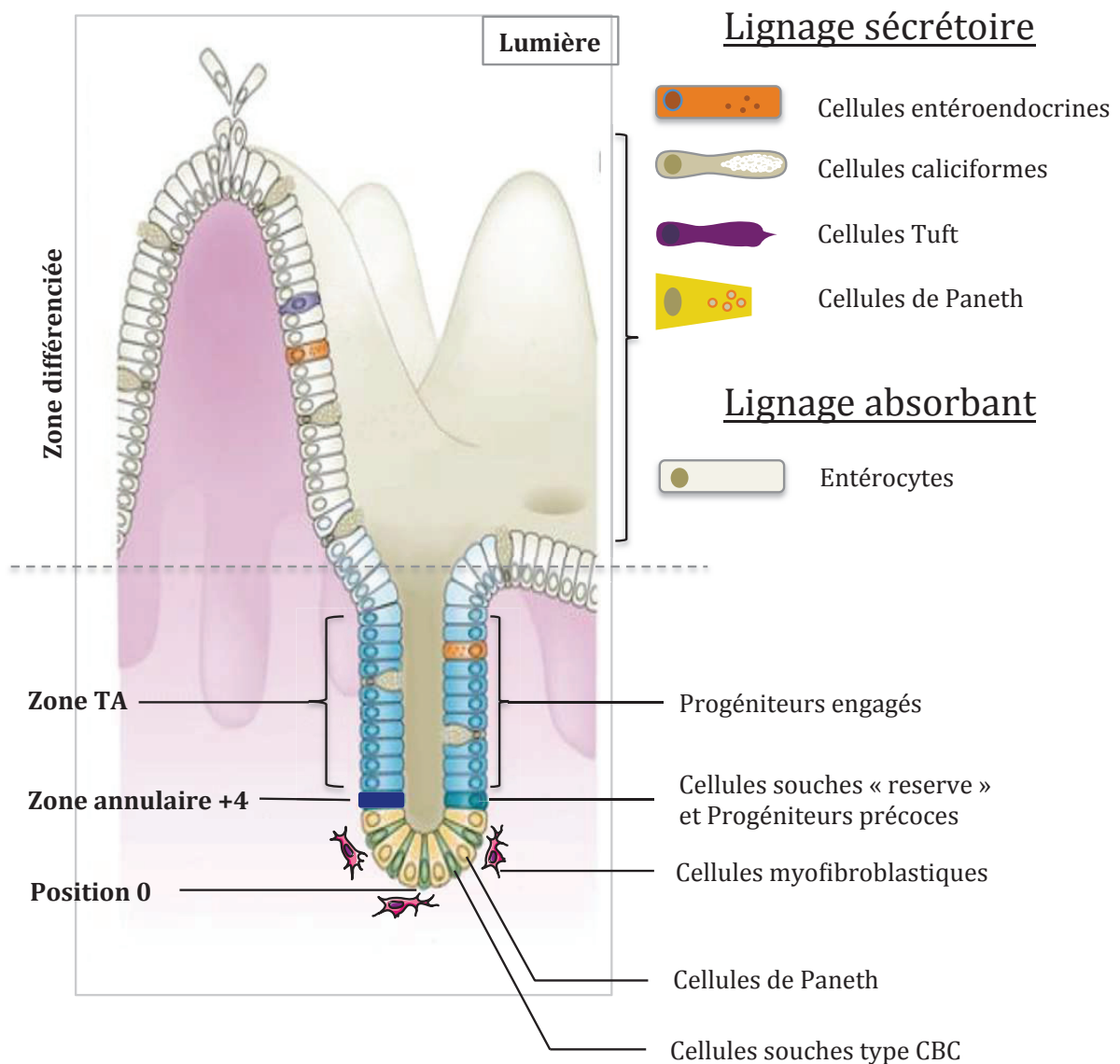


Figure 3 : Structure de l'épithélium intestinal. Les cellules souches à la base des cryptes s'autorenouvellent et donnent naissance à des progéniteurs qui prolifèrent rapidement et se différencient en cellules sécrétoires (cellules de Paneth, tuft, calciformes, entéroendocrines) et absorbantes (entérocytes). Les cellules de Paneth sont le seul cytotype différencié à migrer vers la position 0 de la crypte au contact des cellules souches. Les cellules mortes des villosités se déversent dans la lumière. Les cellules mortes du fond des cryptes sont phagocytées par des macrophages présents dans la *lamina propria*. Des cellules souches de « réserve » sont positionnées en position +4. Fond d'image tiré et adapté de la littérature (Barker, 2014).

III. L'autorenouvellement de l'EI

A. Les cellules souches

Avec un renouvellement complet d'environ 4 à 6 jours chez l'adulte l'EI est un tissu qui se régénère très rapidement. Ceci est le résultat de l'activité de cellules particulières localisées dans les cryptes intestinales et capables de générer tous les cytotypes de l'EI : les cellules souches multipotentes intestinales.

1. La quête des cellules souches

Durant le siècle dernier, la communauté scientifique s'est lancée dans une course effrénée : la découverte des cellules souches de l'EI. Elle a d'ailleurs vu naître deux modèles visant à caractériser ces cellules : le modèle +4 LRC (cellules souches situées en position +4 par rapport à la position 0, 0 étant le fond de la crypte) et le modèle CBC (cellules souches situées en bas des cryptes entre les cellules de Paneth) (**figure 4**).

Le modèle LRC. Pour comprendre ce modèle il faut reprendre l'historique scientifique depuis quelques dizaines d'années. En 1965, les travaux de Cairnie ont d'abord suggéré que l'origine cellulaire des cellules différenciées de l'EI était commune et localisée en position 4-5 par rapport au fond des cryptes, juste au dessus des cellules de Paneth (Cairnie et al, 1965). Puis, il a été montré dans les années 70 que des cellules situées en moyenne en position +4 par rapport au fond des cryptes avaient un phénotype caractéristique de cellules souches, le phénotype « LRC », c'est à dire qui ont un ADN qui reste marqué par un analogue nucléotidique (Marshman et al, 2002; Potten et al, 1974). Ce phénomène de rétention a été montré en 2002 comme résultant d'une ségrégation sélective de l'ADN lors de la mitose (Potten et al, 2002) alors qu'en réalité la ségrégation se fait de manière aléatoire (Steinhauser et al, 2012). De plus, il a été montré que ces cellules LRCs étaient des cellules sensibles aux radiations (Potten, 1977). D'après les chercheurs à cette époque, elles le seraient pour protéger leur ADN de l'accumulation d'anomalies génétiques qui pourraient se propager avec les mitoses, ce qui constituerait un atout majeur pour des cellules qui s'autorenouvelleraient rapidement. En toute logique, ces cellules ont donc été pensées comme étant les cellules à l'origine de tous les

cytotypes de l'EI : les cellules souches intestinales se divisant une fois par jour selon Christopher Potten (Potten et al, 1997; Potten et al, 2002).

Dans d'autres systèmes biologiques (moelle épinière, follicule pileux) les études indiquent qu'en général, chez les mammifères, les cellules souches sont soit quiescentes soit très faiblement cycliques (Cheshier et al, 1999; Fuchs, 2009). C'est en se basant sur ce principe et en étudiant les gènes impliqués dans l'autorenouvellement ralenti de ces systèmes que des chercheurs ont trouvé des cellules souches intestinales. Ces dernières sont situées au dessus des cellules de Paneth et sont décrites comme des cellules peu cycliques (Sangiorgi & Capecchi, 2008), ayant un cycle cellulaire ralenti et régulé par des gènes tels que *Pten* (suppresseur de tumeur) (He et al, 2007) et des facteurs extrinsèques (statut nutritionnel (Li et al, 2019; Richmond et al, 2015). Aujourd'hui, d'autres gènes tels que *Hopx* (Takeda et al, 2011), *Tert* (Montgomery et al, 2011) et *Lrig1* (Powell et al, 2012) sont utilisés pour traquer ces cellules puisqu'ils servent de marqueurs moléculaires. L'utilisation de nouveaux outils génétiques de « lineage tracing » (systèmes rapporteurs), basés sur ces gènes et non existants à l'époque, a permis de prouver que ces cellules *Bmi1+* se divisent lentement et qu'elles génèrent seulement une ou deux nouvelles cellules en cinq jours (Sangiorgi & Capecchi, 2008).

Si on devait résumer, il a donc d'abord été affirmé que les cellules en +4 sont cycliques (les « LRCs de Potten ») alors que d'autres prouvent la présence de cellules situées à la même position ayant un cycle de division ralenti. Néanmoins, à ce stade, on ne peut pas exclure l'hypothèse que toutes les cellules situées dans la zone annulaire en position +4 ne soient pas des cellules souches. On peut penser à un système dans lequel cette zone annulaire en contiendrait peu. C'est ce qui a d'ailleurs été proposé (Marshman et al, 2002; Potten et al, 1997) : une estimation de 4 à 6 cellules souches résidentes, au niveau de l'anneau +4, parmi 16 cellules au total. Cette proposition concorde avec des études plus récentes qui montrent de manière élégante que lesdites « LRCs » situées en position +4 sont en réalité des progéniteurs précoces du lignage sécrétoire (Buczacki et al, 2013; Li et al, 2016). Ces derniers gardent néanmoins quelques propriétés « souche » (van Es et al, 2012; Yan et al, 2017a) et représentent une population bien distincte des cellules souches quiescentes (Li et al, 2016) capables de contribuer à la régénération de l'EI en cas de dommage (Tian et al, 2011), ces dernières étant situées au même niveau dans la crypte (**figure 4** et **figure 5**).

Le modèle CBC. L'origine des cellules souches intestinales a été suggérée en 1971 par Chang et Leblond. En effet, leurs travaux sur le colon ont suggéré que les cellules différenciées pourraient provenir de cellules peu différenciées à la base des cryptes, fonctionnant comme des cellules souches (Chang & Leblond, 1971a; Chang & Leblond, 1971b). C'est à la suite de la réalisation d'expériences de microscopie électronique sur l'intestin grêle que ces chercheurs proposent, en 1974, un modèle dans lequel ils évoquent l'existence de cellules colonnaires indifférenciées et prolifératives, potentiellement à l'origine des cellules différenciées, situées entre les cellules de Paneth (Cheng & Leblond, 1974a). Dans leur modèle, contrairement au modèle LRC, des cellules indifférenciées (pensées comme souches) entre les cellules de Paneth donnent naissance à des cellules filles qui prolifèrent et se différencient graduellement à mesure qu'elles sont poussées hors de la crypte, dans le sens crypte-villosité (Cheng & Leblond, 1974a). Malgré les expériences de marquage cellulaires à la 3H-thymidine (thymidine tritiée) Cheng et Leblond ne sont malheureusement pas parvenus à apporter la preuve concrète que les CBC étaient les cellules souches multipotentes à l'origine de toutes les cellules différenciées de l'EI. L'absence de marqueurs robustes, visant à identifier les cellules souches intestinales, a largement contribué à limiter les recherches sur les cellules souches intestinales. Néanmoins, des travaux plus récents menés sur des souris transgéniques possédant un système rapporteur ont clairement démontré la présence de cellules souches intestinales multipotentes situées entre les cellules de Paneth (Barker et al, 2007) (**figure 4** et **figure 5**).

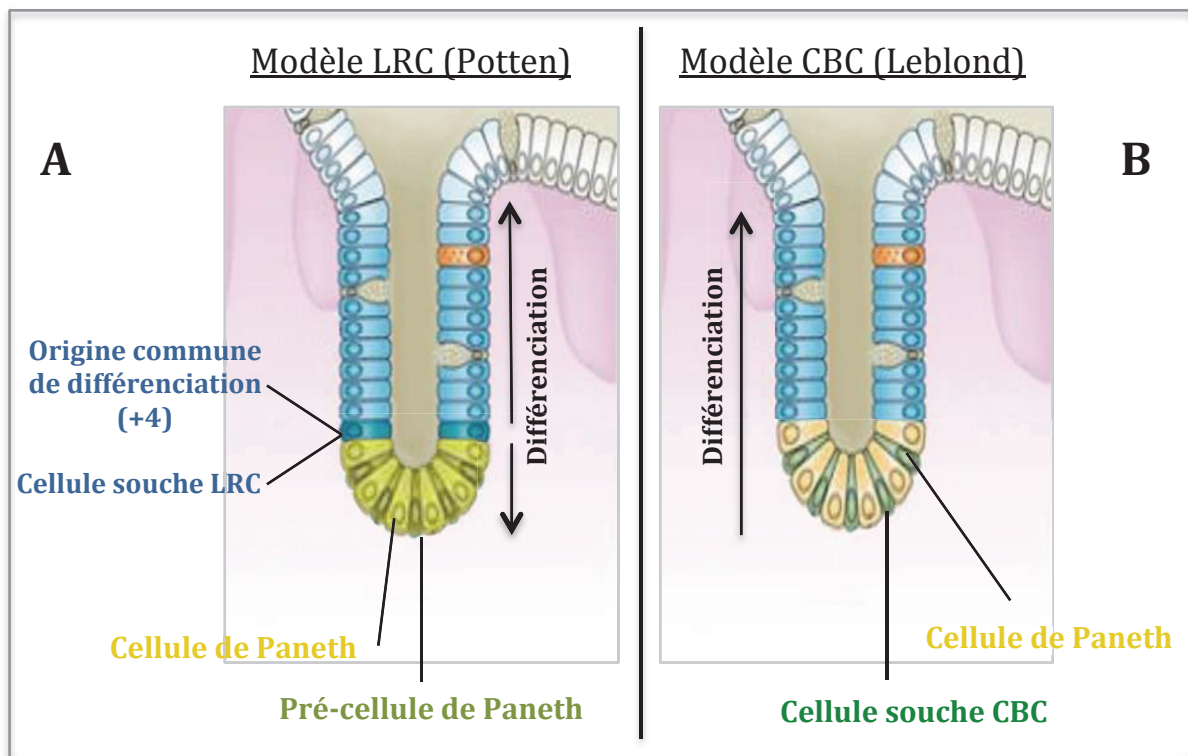


Figure 4 : Comparaison des modèles LRC de Potten et CBC de Leblond. A/ Dans le modèle LRC, Potten évoque une origine commune de différenciation située en position +4 et émet l'hypothèse de la présence de cellules souches à cette position. Les cellules situées entre les positions 0 et +4 sont des cellules de Paneth et leurs progéniteurs. B/ Dans le modèle CBC, Leblond émet l'hypothèse de la présence de cellules souches étroitement intercalées entre les cellules de Paneth. Dans ce modèle la différenciation se ferait à partir de cellules indifférenciées, générées par lesdites cellules souches, en migrant du bas de la crypte vers la villosité. Fond d'image tiré et adapté de la littérature (Barker, 2014).

2. Une « zone souche »

Dans les cryptes intestinales, plusieurs voies moléculaires qui seront décrites plus loin sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie. Une d'entre elles est la voie Wnt. Cette voie est la force prédominante de l'activité proliférative de l'épithélium intestinal en condition physiologique et dans les cancers colorectaux (van der Flier & Clevers, 2009). C'est pour cette raison que le laboratoire de Clevers a commencé à étudier le programme des gènes cibles activés par cette voie pour déterminer si l'un ou plusieurs d'entre eux pouvaient servir de marqueurs de cellules souches (Van der Flier et al, 2007). Parmi les gènes activés, certains le sont uniquement dans quelques cellules en bas des cryptes : les CBCs (columnar base cells) (**figure 5**). Parmi eux, on retrouve notamment le gène *Lgr5* qui code pour un récepteur à sept domaines transmembranaires. Il agit comme potentialisateur de la voie Wnt en se liant à des ligands de la famille des R-spondines (Carmon et al, 2011; de Lau et al, 2011; Glinka et al, 2011). Son profil d'expression a été confirmé par hybridation *in situ*, mais également par l'utilisation de systèmes rapporteurs de type LacZ et GFP dans le modèle murin *Lgr5-GFP-IRES-CREERT2 ; RosaLacZ* (Barker et al, 2007). C'est l'utilisation de tels outils qui a permis de confirmer que les CBCs sont des cellules souches et de les caractériser : 1) elles sont multipotentes, c'est-à-dire capables de s'autorenouveler et de générer tous les cytotypes de l'épithélium intestinal *in vivo* et *ex vivo*, 2) elles sont capables de persister jusqu'à 60 jours, 3) elles sont résistantes aux irradiations (Barker et al, 2007; Sato et al, 2009). En contraste par rapport au dogme que j'énonçais lors de la description du modèle LRC dans le paragraphe précédent, généralisant les cellules souches de mammifères comme quiescentes ou faiblement cycliques, les 10-15 cellules *Lgr5+* du fond des cryptes sont capables de se diviser toutes les 24h en condition homéostatique (Barker et al, 2007; Scoville et al, 2008). Depuis l'établissement de la signature souche par Munoz et ses collègues, d'autres marqueurs de ces cellules ont pu être découverts/validés chez la souris, ceux-ci incluant *Ascl2* (facteur de transcription bHLH dont l'expression est dépendante de Wnt) (Sansom et al, 2004; Van der Flier et al, 2007), *Olfm4* (gène indépendant de Wnt qui code pour une glycoprotéine sécrétée impliquée dans l'adhérence cellulaire) (van der Flier et al, 2009), *Rnf43* et *Znrf3* (codant toutes deux pour des protéines ligases E3 transmembranaires favorisant l'internalisation des ligands Frizzled, contrôlant ainsi la force du signal Wnt) (Hao et al, 2012; Koo et al, 2012), *Smoc2* (protéine sécrétée inhibitrice de la voie Bmp) (Munoz et al, 2012), *Troy*

(membre de la superfamille des « tumor necrosis factors », cible et modulateur négatif de la voie Wnt, situé au niveau de la membrane en complexe avec le récepteur Lgr5) (Fafilek et al, 2013) et *Msi1* (protéine liant l'ARN, activatrice indirecte des voies Wnt et Notch) (Maria Cambuli et al, 2013; Munoz et al, 2012; Plateroti et al, 2012; Rezza et al, 2010).

Même si aujourd'hui il a été clairement démontré que les CBCs sont de véritables cellules souches actives et même s'il a été démontré un certain recouvrement des profils d'expression de marqueurs entre cellules CBCs et cellules en position +4 (Itzkovitz et al, 2011; Munoz et al, 2012), au vu des nombreuses études qui ont été publiées sur les LRCs et les « reserve stem cells » (Buczacki et al, 2013; He et al, 2007; Li et al, 2016; Montgomery et al, 2011; Powell et al, 2012; Sangiorgi & Capecchi, 2008; Takeda et al, 2011; Tian et al, 2011; Yan et al, 2012) il serait aberrant de considérer la population de cellules CBCs comme « l'unique » population à caractère « souche ».

Même si le caractère de prolifération rapide de ces cellules témoigne de leur importance dans le renouvellement de l'EI en condition d'homéostasie, il ne permet pas d'ignorer le fait qu'une ou plusieurs populations cellulaires de « réserve », localisées en moyenne en position +4, aient des propriétés « souches » de secours capables de remplacer les CBCs en cas de dommage (Tian et al, 2011). Plus récemment, il a même été montré que des progéniteurs entérocytaires possédaient une telle caractéristique (Tetteh et al, 2016). Ainsi, il est préférable de parler d'une « zone souche » hétéroclite dans les cryptes, lieu où se localisent des cellules ayant des propriétés souches : les CBCs, les « reserve stem cells » et les progéniteurs précoces (**figure 5, figure 6**).

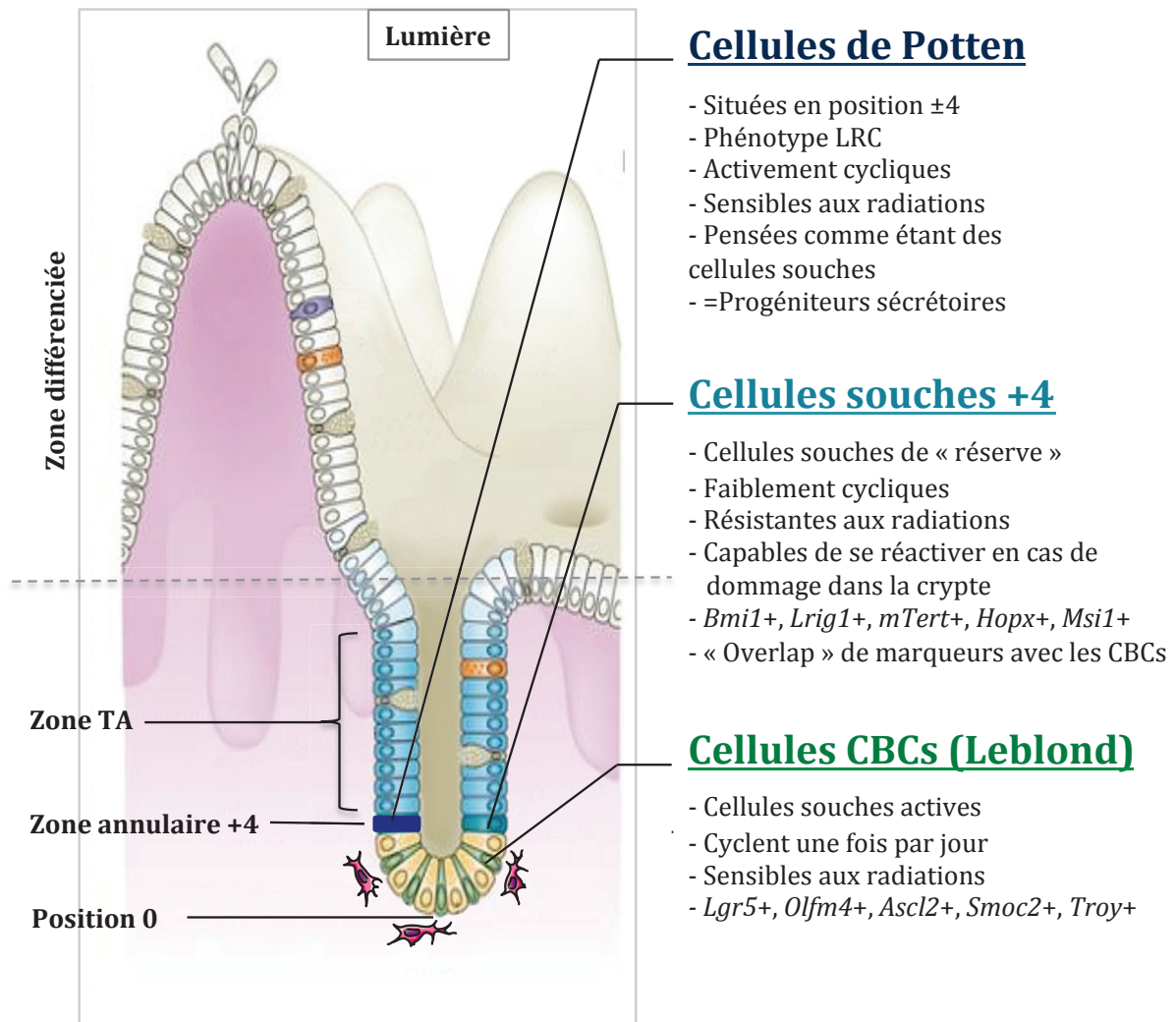


Figure 5 : Vision d'ensemble de la zone souche selon les données actuelles. Des cellules souches sont situées à la base des cryptes et sont intercalées entre les cellules de Paneth. Des cellules souches « de réserve » sont localisées dans la région en anneau située en position +4. Parmi les cellules à cette même position, on trouve également des progéniteurs précoces. Fond d'image tiré et adapté de la littérature (Barker, 2014).

3. Asymétrie ou symétrie ?

On a souvent considéré que les cellules souches d'un organisme étaient quiescentes et qu'elles se divisaient asymétriquement pour garantir le maintien de l'homéostasie d'un tissu (Klein & Simons, 2011; Lin, 2008; Potten & Loeffler, 1990). Une division de ce type peut-être contrôlée par des facteurs intrinsèques comme par exemple lors des premières divisions de l'embryon chez *C. elegans* (Cowan & Hyman, 2004) et par des facteurs extrinsèques comme c'est le cas dans la mise en place de la lignée germinale chez la drosophile (Fuller & Spradling, 2007). Basé sur ce principe, quand la division est asymétrique, c'est à dire quand la cellule souche (mère) donne naissance à deux cellules (filles) différentes avec un même taux de probabilité (une cellule fille souche et une cellule fille progénitrice engagée dans la différenciation) alors l'équilibre tissulaire est maintenu. Lorsque ce n'est pas le cas, quand il y a plus de chances que les deux cellules filles soient identiques (A : soit 2 cellules souches, B : soit 2 cellules progénitrices) l'équilibre homéostatique est altéré. Des études ont d'ailleurs fait la corrélation entre perte de division asymétrique et formation de tumeurs (Caussinus & Gonzalez, 2005; Caussinus & Hirth, 2007; Goulas et al, 2012). Néanmoins, ce modèle généralisé d'asymétrie a plusieurs fois été contesté. Dans certains organes tels que l'intestin, l'épithélium se renouvelle grâce à des cellules souches qui se divisent de manière symétrique et suivent un modèle dit de « dérive neutre » (Klein & Simons, 2011; Lopez-Garcia et al, 2010; Snippert et al, 2010).

C'est en utilisant des outils d'analyse basés sur des systèmes de traçages cellulaires inductibles chez la souris qu'il a été démontré que les cellules souches intestinales des cryptes forment une population de cellules équipotentes dans laquelle la perte d'une cellule souche est compensée par la multiplication d'une voisine. Dans ce modèle, la population de clones issue de chaque cellule souche s'étend ou se rétrécit de manière aléatoire jusqu'à ce qu'elle prenne en charge la crypte (qui devient alors monoclonale) ou qu'elle soit perdue (Lopez-Garcia et al, 2010). Plus simplement, les cellules filles qui sont générées sont en constante compétition, dite « neutre » (aucune n'a plus de chance que d'autres de « gagner »), pour maximiser leur surface de contact membranaire avec les cellules de Paneth (Sato et al, 2011b), contact qui va participer au maintien de l'identité « souche » de la cellule.

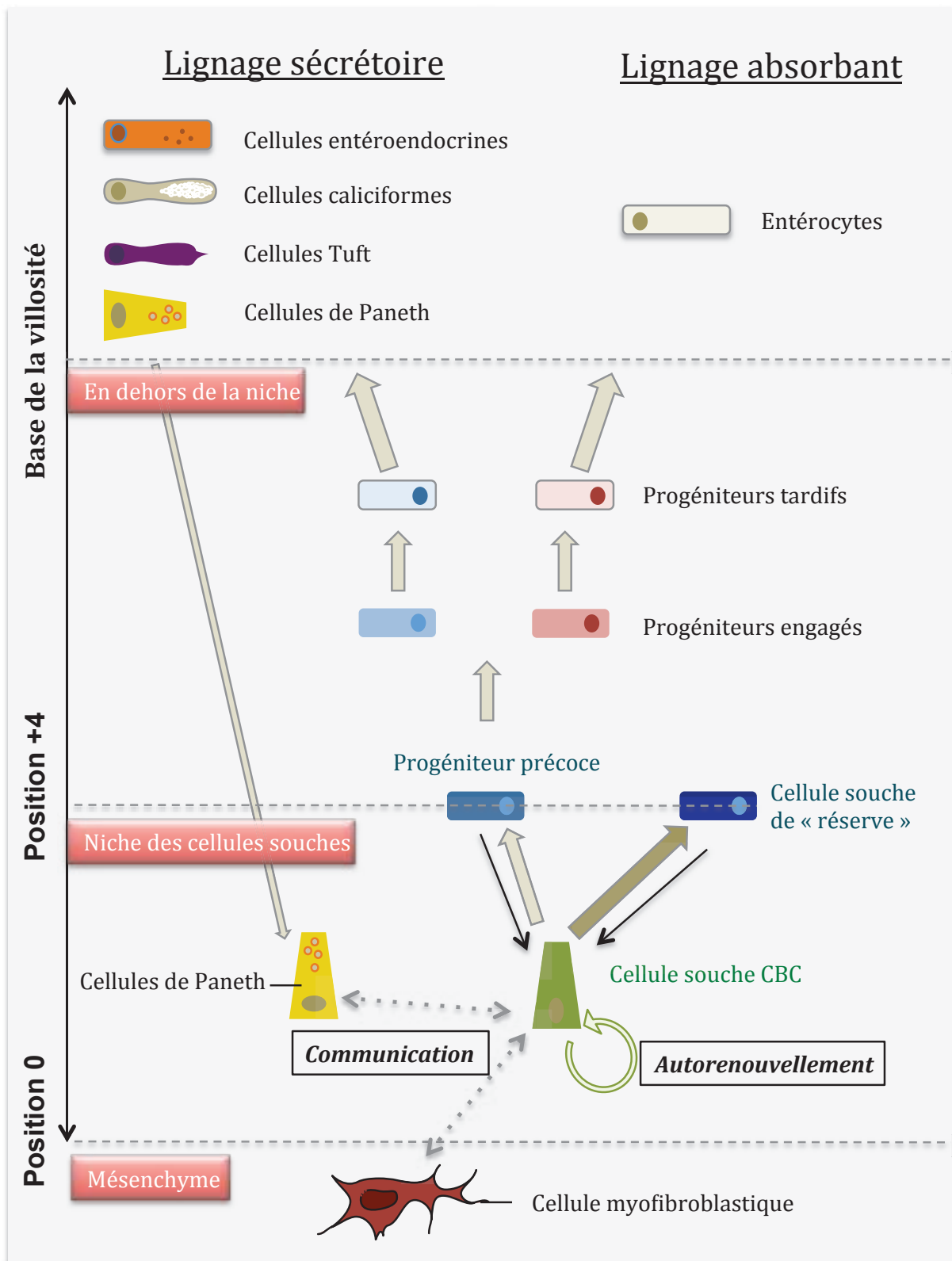


Figure 6 : Dynamique de l'épithélium intestinal. Des cellules souches sont situées dans les cryptes entre la position 0 et +4. Les cellules de Paneth fournissent les ligands nécessaires au maintien de l'identité souche. Les myofibroblastes subépithéliaux fournissent également de tels types de ligands. Des cellules souches de « réserve » et des progéniteurs précoces sont localisés dans la région en anneau située en position +4. Ces deux types de cellules sont capables de repeupler la crypte de cellules souches actives en cas de dommage. Les progéniteurs qui sont dans la crypte prolifèrent activement et s'engagent dans un des deux lignages alors qu'ils sont poussés vers la villosité par effet « tapis roulant », du fait de l'arrivée de nouvelles cellules en bas de la crypte. Les flèches pointillées indiquent une communication entre cellules.

De cette compétition, un clone prend aléatoirement l'avantage et il en résulte une crypte entièrement monoclonale trois mois plus tard. En d'autres termes et je cite : « À n'importe quel temps donné, toutes les cellules de la crypte dérivent uniquement d'une des quinze cellules souches qui coexistaient trois mois plus tôt » (Clevers, 2013). Dans ce modèle, les cellules se divisent donc symétriquement dans un espace restreint enrichi en cellules de Paneth. Les cellules qui se maintiennent au fond restent « souches » alors que les cellules qui sont physiquement exclues de la niche s'engagent dans un processus de différenciation progressif le long de l'axe crypte-villosité (**figure 6** et **figure 7**). L'EI est donc renouvelé grâce à un système de divisions symétriques dans un « environnement (niche) asymétrique ». Le concept d'asymétrie de niche est expliqué ci-dessous.

4. La niche des cellules souches

Le concept de niche a d'abord été proposé par Ray Schofield en 1978 pour décrire l'association des cellules souches à d'autres cellules environnantes (Schofield, 1978). Aujourd'hui le principe de « niche à cellules souches » en condition homéostatique est le suivant : dans un tissu, la niche est l'ensemble des éléments extrinsèques (cellules, matrice, ligands, facteurs de croissance, autres) constituant un microenvironnement dans lequel les cellules souches sont présentes et qui garantit le maintien de leur état « souche » au travers du maintien de l'autorenouvellement et de l'équilibre entre prolifération et différenciation (Ferraro et al, 2010; Lander et al, 2012). La niche est un environnement dynamique c'est à dire un environnement dans lequel la communication entre les différents éléments qui le constituent est multidirectionnelle, c'est à dire un environnement dont les éléments s'influencent les uns et les autres (**figure 6** et **figure 8**). C'est le cas en condition physiologique (Madison et al, 2005; Pastula & Marcinkiewicz, 2019; Tan & Barker, 2014) comme en condition pathologique (ex : cancers colorectaux) (Medema & Vermeulen, 2011).

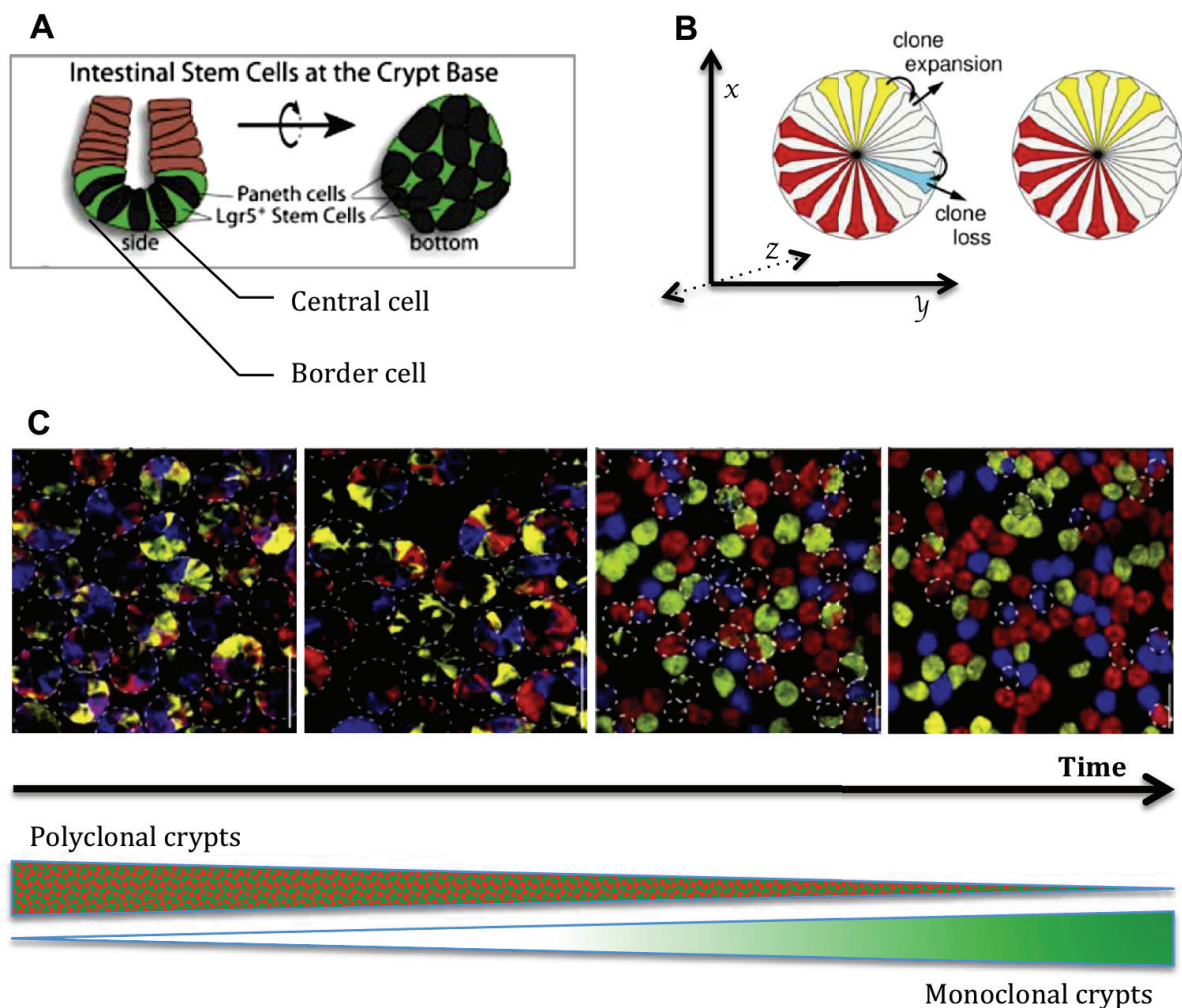


Figure 7 : Compétition neutre entre les cellules souches actives. A/ Des cellules souches sont situées dans les cryptes entre la position 0 et +4 et se divisent symétriquement. Les cellules de Paneth fournissent les ligands nécessaires au maintien de l'identité souche. B/ Les cellules souches sont en compétition neutre pour maintenir les contacts avec les cellules de Paneth (blanches) et garder leur identité. Dans cet encart, trois populations de cellules souches sont représentées (rouges, blanches, jaunes). Il y a compétition entre ces trois populations. Sur le schéma, les populations rouge et jaune agrandissent la taille de leur population avec l'apparition d'un nouveau clone tandis que la population blanche perd un clone qui est expulsé hors de la niche, en direction de la villosité, pour se différencier. C/ Cryptes issues de souris transgéniques type « confettis », photographiées dans le temps. Au départ, chaque crypte possède plusieurs clones de couleur différente (bleu, jaune, rouge, incolore). La compétition entre populations dans chaque crypte prend place. Avec le temps, toutes les populations disparaissent à l'exception d'une seule qui prend le contrôle de toute la crypte. La crypte devient alors monoclonale (unicolore) mais la compétition continue entre les clones de cette même population. Les cercles pointillés représentent les cryptes polyclonales. Les cryptes non entourées par ces cercles sont devenues monoclonales. Images en anglais tirées et adaptées de la littérature (Snippert et al, 2010).

Dans l'intestin grêle, le microenvironnement (la niche) est constitué en partie par les cellules de Paneth entre lesquelles sont intercalées les CBCs, au dessus desquelles se trouvent les cellules souches de « réserve » et les progéniteurs (dont les « LRCs »). D'autre part, il est aussi constitué par le stroma environnant (Chappell et al, 2003) et par l'ensemble des ligands/molécules (peptides, hormones, autres) qui sont présents dans cet environnement. D'autres paramètres, plus indirects, influencent également le comportement des cellules régénératrices de l'EI, c'est le cas par exemple du statut nutritionnel (Chappell et al, 2003; Choi et al, 2011; Richmond et al, 2015; Yilmaz et al, 2012). Est-ce que les hormones thyroïdiennes participent à l'équilibre dynamique de la niche ? C'est une des questions de mon travail de thèse.

Le rôle de niche des cellules de Paneth. Dans le paragraphe II.B.5 j'ai évoqué le rôle majeur des cellules de Paneth en tant que support des cellules souches puisqu'elles leur fournissent des ligands nécessaires à leur maintien : EGF, Wnt3 et ligands de la voie Notch (Sato et al, 2011b). Il est intéressant de noter qu'il existe dans d'autres systèmes biologiques des situations similaires où les cellules souches somatiques donnent naissance à une progéniture de cellules différenciées qui en retour participe à la constitution de la niche. C'est le cas par exemple dans le testicule de drosophile (Voog et al, 2008). Dans le cas de l'intestin grêle, une diminution drastique du nombre de cellules de Paneth impacte négativement le nombre de cellules souches dans les cryptes de l'EI (*in vivo*) alors qu'à l'inverse la présence des cellules de Paneth au contact des cellules souches augmente drastiquement leur capacité « souche » (potentiel de d'autorenouvellement) *ex vivo*. En effet, dans des expériences de « colony assay » qui consistent à faire pousser, à partir de cellules isolées, des « mini épithélia intestinaux » (« crypt-like structures » ou organoïdes cultivés en 3D que je décris plus loin) seulement 6% des cellules souches intestinales cultivées seules forment des organoïdes tandis que 75% des cellules souches cultivées en doublets (en contact) avec des cellules de Paneth forment des mini-intestins (Sato et al, 2011b). Puisque des ligands sécrétés tels que Wnt3 ne diffusent pas librement dans la niche mais sont très rapidement « transmis » des cellules de Paneth aux cellules avoisinantes (Farin et al, 2016) et que les cellules de Paneth sont aussi la source d'autres ligands membranaires tels que les ligands Notch (Dll1, Dll4), les cellules souches sont en compétition neutre (Lopez-Garcia et al, 2010; Snippert et al, 2010) pour se juxtaposer à ces cellules. L'activation des voies Wnt et Notch a été montrée comme étant requise pour maintenir l'identité « souche »

(Pellegrinet et al, 2011; Riccio et al, 2008; VanDussen et al, 2012) tandis que l'activation de la voie de signalisation de l'EGF est essentielle et nécessaire pour maintenir l'autorenouvellement de l'EI (Basak et al, 2017; Feng et al, 2011; Powell et al, 2012; Wong et al, 2012). Avec les divisions, les ligands captés par les cellules souches, notamment Wnt, se diluent (Sato et al, 2011b). Ainsi, le maintien de l'état « souche » des cellules Lgr5+ est plus efficace lorsqu'elles sont positionnées au milieu (« central cells ») des cellules de Paneth qu'en périphérie (« border cells ») (Ritsma et al, 2014). De manière intéressante, il a également été suggéré que le récepteur Lgr5 soit impliqué dans le renforcement de l'adhérence cellule-cellule des cellules souches (donc dans leur maintien dans le fond des cryptes) (Carmon et al, 2017) et que l'expression de Lgr5 est plus forte en position centrale qu'en position +4 où se localisent principalement des progéniteurs qui prolifèrent mais qui ont perdu leur capacité à former des organoïdes *ex vivo* (Basak et al, 2014). C'est cette architecture de la crypte, organisée en gradients moléculaires et cellulaires, qui caractérise cette asymétrie de niche (**figure 8**).

Cependant, comme le montrent d'autres études, les cellules de Paneth sont importantes mais pas indispensables. En leur absence, *in vivo*, les cellules souches continuent d'occuper la base de la crypte et survivent pendant plusieurs mois (Durand et al, 2012; Kim et al, 2012). En effet, la perte complète de ces cellules ne perturbe pas l'architecture de la crypte et permet la prolifération et le maintien des cellules souches (Durand et al, 2012), suggérant une compensation par d'autres cellules environnantes telles que les cellules stromales (Kim et al, 2012).

Le stroma environnant. Il est constitué de plusieurs types cellulaires dont les myofibroblastes (**figure 6** et **figure 8**). Comme leur nom l'indique les myofibroblastes sont des cellules qui exacerbent à la fois des propriétés de cellules fibroblastiques et des propriétés de cellules musculaires. Ils sont d'origine mésodermale et caractérisés par la présence d'actine alpha (α -Sma) exprimée aussi dans les muscles lisses (Pastula & Marcinkiewicz, 2019; Powell et al, 1999). Des études suggèrent également la capacité de les distinguer des autres cellules stromales par l'expression de miRNA204 et de miRNA211 (Sacchetti et al, 2017). Dans l'intestin grêle, ces cellules fusionnent entre elles, autour des cryptes, pour former des syncytia (Powell et al, 1999). Elles expriment des ligands de la voie Wnt tels que Wnt2b, Wnt4 et Wnt5b suggérant leur implication dans la régulation de la voie Wnt des cellules épithéliales avoisinantes (Farin et al, 2012;

Gregorieff et al, 2005; Kabiri et al, 2014; Valenta et al, 2016). Ceci est renforcé par le fait que les cellules stromales soient également la source des R-spondines (Sigal et al, 2017) (**figure 8**), ligands essentiels dans la potentialisation de la voie Wnt (au travers du récepteur membranaire Lgr5 et l'inhibition d'E3 ubiquitine ligases) (de Lau et al, 2011; Farin et al, 2016; Kim et al, 2005) et l'activation de l'autorenouvellement. En effet, les ligands Wnt et R-spondines coopèrent intimement puisque les ligands Wnt favorisent l'expression des récepteurs aux R-spondines (Lgr5) qui, eux, contrôlent l'expansion du pool de cellules souches (Hao et al, 2012; Yan et al, 2017b). Ces ligands (Wnt, R-spondines) sont notamment utilisés pour la culture d'organoïdes d'intestin grêle (Sato et al, 2009) mais aussi d'autres tissus requérant une voie Wnt activée tels que l'estomac et le colon (Barker et al, 2010; Bartfeld et al, 2015; Date & Sato, 2015; Sato et al, 2011a). Autour des cryptes, les cellules stromales sont également la source d'antagonistes (**figure 8**) de la voie de signalisation TGF- β /BMP tels que Noggin, Chordin-like 1 et Gremlin1/2, Angtpl2 (Horiguchi et al, 2017; Kosinski et al, 2007; Spit et al, 2018) qui agissent de manière à réprimer la différenciation induite par cette voie. En effet, la voie BMP agit comme un régulateur négatif de la formation des cryptes et commande la différenciation des cellules intestinales matures (Kosinski et al, 2007; Qi et al, 2017; Spit et al, 2018).

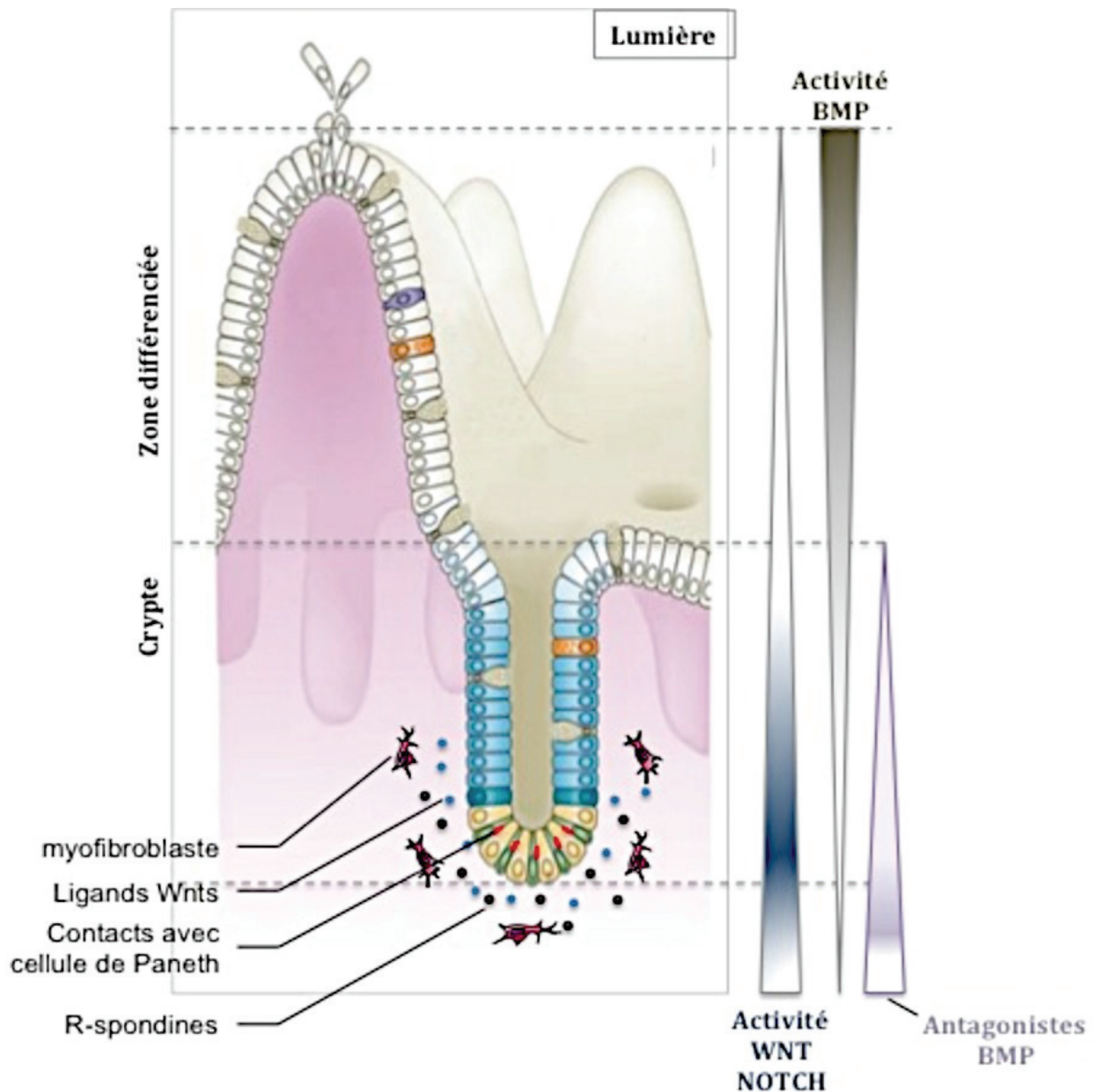


Figure 8 : Schéma mettant en évidence la niche des cellules souches. Les cellules souches sont dans une niche, une espace où l'activité des voies moléculaires Wnt et Notch est élevée. C'est la présence de cellules de soutien (cellules de Paneth et myofibroblastes), fournissant des ligands membranaires (ligands Notch) ou solubles (R-spondines, ligands Wnts), qui permet l'activation des voies Wnt et Notch. L'activité en Wnt et Notch est forte entre les positions 0 et +4 puis diminue jusqu'en haut de la crypte. L'activité de la voie BMP, qui promeut la différenciation cellulaire, est forte dans les villosités et diminue en direction des cryptes. La présence de molécules anti-BMP (Noggin) sécrétées par les myofibroblastes sous-épithéliaux permet de bloquer le signal BMP en bas des cryptes et de participer au maintien de l'identité souche. Fond d'image tiré et adapté de la littérature (Barker, 2014).

B. Détermination des lignages cellulaires

1. Les grandes voies moléculaires impliquées

a) La voie de signalisation Wnt/ β -caténine

La voie de signalisation canonique de Wnt (**figure 9**) (voie dépendante de la β -caténine) est une des forces majeures qui gouvernent l'autorenouvellement de l'EI. De manière plus générale, cette voie très conservée entre les espèces intervient dans de nombreux processus importants pour le développement mais également dans le maintien de l'homéostasie des tissus adultes (Kretschmar & Clevers, 2017; Logan & Nusse, 2004; MacDonald et al, 2009; Spit et al, 2018). Comme énoncé précédemment, les éléments du microenvironnement participent à la constitution de la niche des cellules souches, mais la signalisation intracellulaire joue aussi un rôle majeur dans le contrôle du comportement de la cellule. Pas moins de 19 gènes codants pour des ligands Wnt sont impliqués dans l'activation des voies de signalisation dépendantes ou indépendantes de la β -caténine (Kretschmar & Clevers, 2017; MacDonald et al, 2009; Seifert & Mlodzik, 2007; Wang & Nathans, 2007). Dans le schéma de fonctionnement classique de cette voie, les ligands Wnt (protéines glycosylées riches en cystines) se lient à des complexes de récepteurs/corécepteurs Frizzeld/Lrp5-6 apparentés. De l'engagement des ligands Wnt à leurs récepteurs de surface résulte la diminution du taux de β -caténine phosphorylée ce qui conduit à l'accumulation de cette protéine dans le cytoplasme et à sa translocation dans le noyau.

Voie Wnt inhibée. En l'absence de ligands Wnt, la β -caténine cytoplasmique est constamment dégradée par l'action d'un complexe de protéines constitué par la protéine d'échafaudage Axine, la protéine suppresseur de tumeur *adenomatous polyposis coli* (Apc), la caséine kinase 1 (Ck1) et la glycogène synthase kinase 3 (GSK3). Ck1 et GSK3 phosphorylent la partie C-terminale de la β -caténine au niveau de différents sites de sérines et de thréonines (Kimelman & Xu, 2006). La phosphorylation des sérines 33 et 37 permet de créer un site de liaison qui permet à la β -caténine d'être reconnue et consécutivement ubiquitinylée par la protéine β -Trcp, une E3 ubiquitine ligase. La protéine marquée par l'ubiquitine ligase est alors envoyée dans la machinerie de dégradation du protéasome (He et al, 2004a). La dégradation continue de cette protéine

limite son accumulation dans le cytoplasme et son action dans le noyau. En conséquence, les facteurs de transcription de la famille des DNA-bound T Cell Factors/Lymphoid Enhancer Factors (Tcf/Lef) répriment les gènes cibles de la voie Wnt (MacDonald et al, 2009).

Voie Wnt activée. En présence de ligands Wnt liés au complexe de récepteur Frizzeld/Lrp5-6, la β -caténine est stabilisée et s'accumule dans le cytoplasme. La formation du complexe ligand Wnt/récepteur frizzeld permet le recrutement de la protéine d'échafaudage dishevelled (Dvl) ainsi que la phosphorylation et l'activation du corécepteur Lrp6. Le complexe protéique Axine est alors recruté au niveau du récepteur membranaire et est inhibé. L'inhibition du complexe de protéines incluant la sérine/thréonine kinase GSK3- β ne permet plus de phosphoryler la β -caténine qui, dès lors, peut s'accumuler et transférer dans le noyau pour activer des gènes cibles. En revanche, la simple stabilisation de la β -caténine n'est pas suffisante pour qu'elle soit transférée dans le noyau. En effet, il a été montré que l'activation en parallèle de la protéine GTPase Rac1 est nécessaire (Wu et al, 2008b) pour qu'elle forme un complexe avec la β -caténine favorisant le transfert de cette dernière dans le noyau. Une fois localisée dans le compartiment nucléaire, la β -caténine s'associe en complexe à une multitude de co-facteurs incluant, de manière non exhaustive, des histones acétyltransférases (HATs), des histones méthyltransférases (HMTs), des ATPases pour le remodelage de la chromatine ainsi que d'autres protéines permettant d'initier la transcription de gènes cibles (Clevers & Nusse, 2012; Mosimann et al, 2009; Willert & Jones, 2006) en se liant à des éléments de réponse WRE (Wnt response elements). Les gènes ciblés sont très variés et dépendent du contexte et du tissu qu'on étudie. Les gènes *c-Myc*, *Cdkn1A*, *Lgr5*, and *Ccnd1* en sont des exemples. Parmi les grandes fonctions modulées par la voie Wnt/ β -caténine on retrouve notamment la prolifération, le contrôle du destin cellulaire (détermination) et le contrôle de l'homéostasie tissulaire (MacDonald et al, 2009). Certains des gènes cibles font partie intégrante de cette même voie, ainsi la modulation de ces gènes permet de réguler l'amplitude et la durée de la réponse aux ligands Wnt. Par exemple, l'induction d'Axine2 et l'inhibition de Frizzled contribuent au rétrocontrôle négatif de la voie Wnt. *A contrario* l'induction de certains variants de la famille des Tcf/Lef, par exemple Lef1, contribue à l'intensification du signal véhiculé par cette voie (Arce et al, 2006; Clevers, 2006). C'est le cas en condition

physiologique mais aussi dans certains cancers comme les cancers colorectaux (CRCs) (Santiago et al, 2017).

La voie Wnt est primordiale dans l'EI puisqu'elle est nécessaire pour le maintien de l'identité « souche ». La présence de signaux Wnt est essentielle pour la pérennité de l'autorenouvellement épithélial puisque le blocage de la voie conduit inévitablement à l'arrêt de prolifération dans les cryptes intestinales et à l'endommagement du tissu. À l'inverse, l'activation aberrante de cette voie est fréquemment initiatrice de CRCs et favorise leur développement (Zhan et al, 2017). Dans un modèle dit « bottom-up », c'est l'apparition de mutations dans le compartiment souche qui initie et participe au développement d'un CRC. Par exemple, la perte d'*Apc* ou de la perte de son activité « suppresseur de tumeur » est cruciale pour initier la formation d'adénomes. L'addition d'évènements (mutations) conduisant à la progression tumorale est nécessaire pour la formation d'un CRC (ex : mutations dans les gènes *Kras* et *Tp53*). D'autres facteurs impliqués dans la régulation de cette voie peuvent être dérégulés indépendamment du dysfonctionnement d'*Apc* et amener au CRC, c'est le cas notamment de facteurs tels que les régulateurs négatifs *Axin1*, *Axin2* ou encore *Rnf43* et *Znrf3* (Hao et al, 2012; Li et al, 2012; Marvin et al, 2011).

b) La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch (**figure 9**) est une autre voie moléculaire importante, connue notamment pour son implication dans le développement et le maintien de l'homéostasie chez l'adulte (Radtke & Clevers, 2005). La voie Notch contrôle la manière dont les cellules répondent à des signaux intrinsèques ou extrinsèques nécessaires à l'initiation et au déploiement de programmes génétiques majeurs. En effet, l'activité de Notch influence le fonctionnement des programmes de différenciation, de prolifération et d'apoptose, un atout majeur pour influencer la formation d'organes et la morphogenèse (Artavanis-Tsakonas et al, 1999). L'activation de cette voie de signalisation est due à l'enclenchement de récepteurs transmembranaires Notch lors de contacts entre cellules voisines.

Le gène *Notch* a d'abord été caractérisé chez *Drosophila melanogaster* et code pour un récepteur à un domaine transmembranaire. Chez l'Homme et la souris, il existe

quatre types de récepteurs Notch paralogues (Notch1-4) (Radtke & Clevers, 2005; Steinbuck & Winandy, 2018). Certaines régions de ce récepteur sont organisées en séquences répétées en tandem, par exemple de type « EGF-like repeats » (Wharton et al, 1985), et interviennent dans l'interaction avec les ligands. Dans la voie canonique Notch, c'est la liaison à des ligands, eux aussi transmembranaires (Radtke & Clevers, 2005; Steinbuck & Winandy, 2018), présents sur les cellules avoisinantes qui permet d'initier le signal. Il s'en suit une cascade de clivages impliquant des protéases, la métalloprotéase Adam10 (Tsai et al, 2014) et le complexe γ -sécrétase (Olsauskas-Kuprys et al, 2013). Chez les mammifères, on dénombre pas moins de cinq ligands. Ils appartiennent à la famille des Delta/Serrate/Jagged (DSJ) ; il s'agit plus précisément de Delta-like 1, 3, 4 (Dll1, 3, 4) et Jagged1, 2 (Jag1, 2) (Demitrack & Samuelson, 2016; Kopan & Ilagan, 2009; Radtke & Clevers, 2005; Steinbuck & Winandy, 2018). Leur liaison et la série de clivages résultante favorisent la libération du domaine intracellulaire du récepteur Notch (NICD, Notch intracellular domain) et sa translocation dans le noyau (Radtke & Clevers, 2005; Steinbuck & Winandy, 2018). Une fois dans ce compartiment, NICD se lie à des complexes protéiques liant l'ADN de la famille des Rbp/ κ , qui agissent comme des facteurs de transcription, pour activer des gènes cibles (Kopan & Ilagan, 2009). Pour agir comme tels, ils s'associent à des co-activateurs tels que Mastermind (Kovall, 2007). Parmi les cibles de la voie retrouvées dans l'intestin, on trouve par exemple *Hes1*, *Hes5*, *Hes6* (Hairy and Enhancer of Split1-6) et *Olfm4* (Olfactomedin 4) dont *Hes1* et *Olfm4* sont des cibles directes (Fre et al, 2011; Ueo et al, 2012; VanDussen et al, 2012). Il existe différentes manières « naturelles » d'activer ce récepteur en dehors des ligands DSJ. En effet, certains groupes ont rapporté que le complexe de récepteurs de cellules T (T-cell) TCR/CD28 est capable d'enclencher le processus d'activation de cette voie en l'absence de ligands Notch (Steinbuck et al, 2018). De façon générale, en l'absence de ligands sur les cellules qui envoient le signal (« régulation TRANS »), ceux présents sur la cellule cible (où se situe également le récepteur, « régulation CIS ») participent à la l'inhibition du récepteur Notch (de Celis & Bray, 2000; Fre et al, 2011; Kopan & Ilagan, 2009; Kovall, 2007; Steinbuck et al, 2018; Ueo et al, 2012; VanDussen et al, 2012) en faisant intervenir une région composée de motifs répétés appelée NRR (Negative Regulatory Region).

À l'instar de la voie Wnt, plusieurs données montrent que la voie Notch est importante pour le maintien des cellules souches intestinales. En effet, l'inhibition de

Notch *via* l'inhibition du complexe γ -sécrétase est suffisante pour réduire la prolifération et le nombre des cellules souches Lgr5+ (Pellegrinet et al, 2011; van Es et al, 2005; VanDussen et al, 2012). De plus Pellegrinet *et al.* ont montré que la délétion de Jag1 et Dll4 ne perturbe pas la morphologie de l'EI, que l'ablation seule de Dll1 n'affecte pas la prolifération dans les cryptes mais que la double ablation de Dll1 et Dll4 est suffisante pour convertir complètement les précurseurs en cellules différenciées, plus précisément en cellules caliciformes (Pellegrinet et al, 2011). De la même manière, l'altération d'*Adam10* et du partenaire Csl/Rbp-J est suffisante pour réduire l'état de prolifération et la fonction « souche » des cellules des cryptes (Tsai et al, 2014; van Es et al, 2005). Enfin, concernant l'activation en amont de la voie Notch, il semblerait que le récepteur Notch1 soit l'acteur majeur impliqué dans la régulation des fonctions « souches ». En condition physiologique, la perte de Notch1 induit l'apparition de cellules sécrétoires surnuméraires dans le temps alors que la perte de Notch2 n'induit ni ce phénotype, ni n'affecte la population « souche ». En revanche, en condition de régénération post-blessure, la régénération de l'EI est altérée en l'absence de Notch1 et de Notch2 ce qui souligne leur importance dans cette condition (Carulli et al, 2015).

Si la voie Notch est impliquée dans le maintien de l'état souche et plus généralement dans le maintien du statut prolifératif des cellules des cryptes (Carulli et al, 2015; Montgomery et al, 2011; Riccio et al, 2008; Tran et al, 2013; Wu et al, 2010), elle est également un des éléments clefs, si ce n'est l'élément majeur, dans le mécanisme moléculaire qui régule l'orientation des cellules progénitrices vers les différents lignages (sécrétoire, absorbant). Au travers d'un phénomène d'inhibition latérale de contact que je décris plus loin dans le manuscrit, la voie Notch permet d'orienter un progéniteur vers un lignage ou vers un autre.

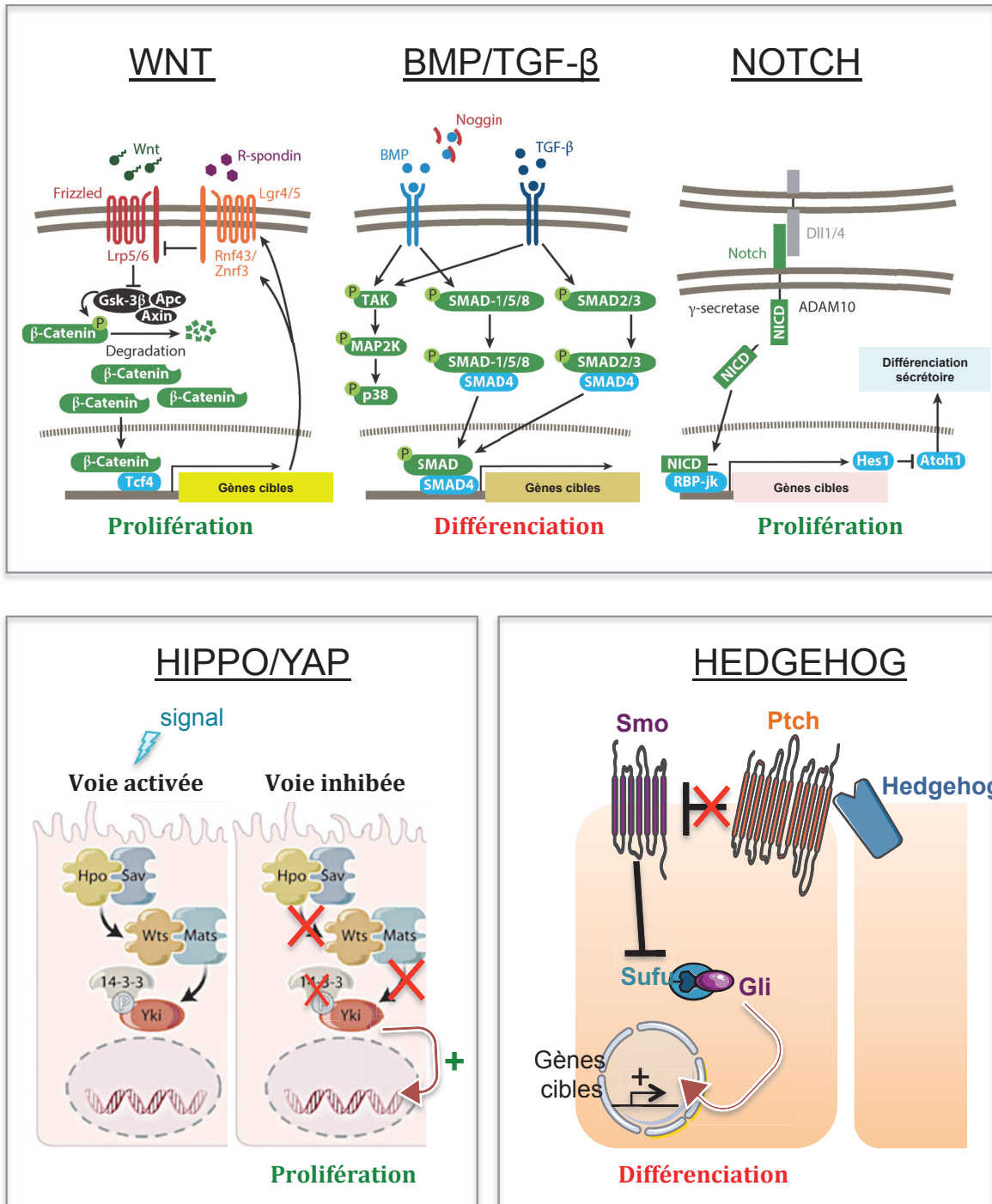


Figure 9 : Voies moléculaires majeures de l'épithélium intestinal. Les cellules souches sont dans une niche, un espace où l'activité des voies moléculaires Wnt et Notch est élevée. L'activation de ces voies permet le maintien de l'identité souche. À *contrario* l'activation des voies BMP/TGF-β, Hedgehog et Hippo/Yap promeut la différenciation cellulaire. Les ligands activent leur récepteur et permettent ou non la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire et la différenciation. L'activation du/des récepteur(s) conduit à des réactions d'activation et d'inhibition en cascade jusqu'à l'activation ou la répression de gène cibles. Cas du récepteur Notch ; son activation conduit au clivage de son domaine intracellulaire qui se transloque dans le noyau pour moduler des gènes cibles via l'intervention de protéines Rbpj. Images tirées et adaptées de (Date & Sato, 2015) et (Enderle & McNeill, 2013).

c) La voie de signalisation Shh

Les protéines de la famille hedgehog sont des morphogènes qui régulent la mise en place de programmes génétiques importants dans le développement embryonnaire et dans le maintien de l'homéostasie chez l'adulte. Chez les mammifères, il s'agit de trois gènes qu'on appelle *Sonic hedgehog* (*Shh*), *Indian hedgehog* (*Ihh*) et *Desert hedgehog* (*Dhh*) (Echelard et al, 1993; Marigo et al, 1995). Lorsqu'ils s'expriment ces gènes donnent naissance à des précurseurs d'environ 45kDa (Lee et al, 1994; Porter et al, 1996) qui doivent être modifiés post-traductionnellement pour devenir actifs. Premièrement, les précurseurs sont autoclivés en deux fragments protéiques : un fragment de 19kDa (fragment N-terminal) et un fragment de 26kDa (fragment C-terminal) contenant la partie enzymatique responsable du clivage qui vient d'être évoqué. Deuxièmement, le fragment N-terminal est « lipidé » et devient peu soluble (Briscoe & Therond, 2013; Porter et al, 1996). La présence de composants lipidiques (une molécule de palmitate et une de cholestérol) sur ce fragment lui permet d'intégrer la membrane plasmique de la cellule « hôte » pour se présenter au récepteur de la cellule « cible ».

Pour pouvoir fonctionner, cette voie implique deux récepteurs transmembranaires, l'un s'appelle Patched (*Ptc*, douze domaines transmembranaires). Il en existe deux sortes chez les vertébrés : Patched 1 (Goodrich et al, 1996) et Patched 2 (Motoyama et al, 1998), l'autre s'appelle Smoothened (*Smo*, sept domaines transmembranaires). Lorsque le morphogène Hh est présent, il agit en tant que ligand sur *Ptc* qui, dès lors, stoppe d'inhiber *Smo*. Lorsque *Smo* est inactif, le complexe de répression comprenant les *Sufu* et *PKA* permet d'induire la protéolyse partielle de protéines de la famille des *Glis* qui agiront dans le noyau comme des répresseurs transcriptionnels. À l'inverse, la présence de ligands Hh permet d'inhiber *Ptc* et de lever l'inhibition de *Smo*. Les protéines *Glis* peuvent alors entrer dans le noyau et activer des gènes cibles (Kong et al, 2019). *Gli2* et *Gli3* sont les effecteurs majeurs de cette voie (Krausova & Korinek, 2012).

De manière générale, la voie hedgehog (**figure 9**) participe à l'homéostasie de l'intestin. Elle y participe notamment en servant de relais de communication entre les différents tissus qui le composent. Par exemple, les ligands qui sont sécrétés par les

cellules progénitrices de l'EI interagissent avec des récepteurs situés sur les cellules du mésenchyme ce qui permet d'induire la production de ligands BMPs (Madison et al, 2005; Mao et al, 2010). L'activation constitutive de Shh *via* l'inhibition de Ptc1 conduit à l'arrêt de la prolifération des cellules progénitrices (van Dop et al, 2009). À l'inverse, cette voie qui s'exprime dans les cellules du compartiment engagé/différencié de l'EI permet de restreindre la zone d'activation de cibles de la voie Wnt. Par exemple, l'utilisation de cyclopamine, induisant la diminution de l'activité Hedgehog, induit l'augmentation de l'activité Wnt et un phénotype hyperplasique dans les cryptes intestinales (van den Brink et al, 2004).

d) La voie de signalisation TGF- β /BMP

Les cytokines de la superfamille du TGF- β (Transforming Growth Factor β) incluent plus de 30 ligands tels que TGF- β (1-3) et les BMPs, nodal, des activines (Mishra et al, 2005), des GDFs (Growth and Differentiation Factors) et autres. Tout comme les voies de signalisation Wnt et Notch, cette grande famille de cytokines joue un rôle majeur chez les vertébrés et les invertébrés. En effet, les membres de cette famille sont exprimés dans de nombreux tissus et interviennent dans des mécanismes essentiels tels que le développement embryonnaire, l'homéostasie tissulaire, la détermination du lignage cellulaire, les réponses au stress et la modulation du système immunitaire (Mishra et al, 2005). De fait, vu son large spectre d'actions, elle est également impliquée dans de nombreuses maladies humaines telles que des cancers (Guo & Wang, 2009; Massague, 2008).

Dans la voie canonique TGF- β /BMP (**figure 9**), les ligands doivent être activés et relargués dans l'espace extracellulaire pour se fixer à des complexes de récepteurs transmembranaires (type I et II). Les ligands qui sont traduits sont d'abord présents sous forme de précurseurs protéiques. Des protéases telles que des furines clivent ces précurseurs de manière à les libérer sous leur forme mature. Ainsi ils forment des dimères, principalement des homodimères, *via* la présence de ponts disulfures entre cystéines conservées (Morikawa et al, 2016). La liaison de ces ligands induit successivement la phosphorylation de certains résidus sérine/thréonine par le récepteur de type II sur le récepteur de type I. Il en résulte l'activation de facteurs de transcription régulateurs, appelés R-Smads (Smad1, 2, 3, 5, 8/9), se liant au co-facteur

de transcription Smad4, formant des complexes protéiques régulateurs qui s'accumulent dans le noyau pour réguler des gènes cibles (Massague, 2012). Des Smads inhibiteurs (I-Smads) qui agissent comme régulateurs négatifs de la voie peuvent « faire tampon » puisqu'ils sont capables de moduler l'amplitude d'activation de cette voie de signalisation par rétrocontrôle négatif. C'est le cas par exemple de Smad-6 et Smad-7 chez les vertébrés (Morikawa et al, 2016; Nakao et al, 1997). Bien que les Smads ciblent directement des séquences d'éléments régulateurs, l'activation ou la répression d'un gène dépend d'une coopération avec d'autres co-facteurs, eux-mêmes modulés par d'autres voies de signalisation (Morikawa et al, 2016). De plus, l'activation et l'activité des Smads sont régulées par l'état de phosphorylation ou d'ubiquitinylation de celles-ci. En d'autres termes, il existe une multitude de scénarii possibles suite à l'activation des récepteurs de la voie TGF- β /BMP du fait de la redondance entre voies moléculaires en aval de ces récepteurs (Miyazono et al, 2005; Morikawa et al, 2016).

Au niveau de l'EI, la voie de signalisation TGF- β /BMP joue un rôle important dans l'homéostasie du tissu puisqu'elle participe, en effet, au maintien de l'autorenouvellement à l'état d'équilibre (Qi et al, 2017). Les ligands agonistes de la voie (BMP2 et BMP4) sont sécrétés par les cellules mésenchymateuses situées dans le stroma intravillositaire et entre les cryptes (Bitgood & McMahon, 1995; Haramis et al, 2004) tandis que les antagonistes Noggin et Gremlin1 sont exprimés par les cellules stromales situées sous la crypte, organisées en syncytia. Il en résulte un gradient d'activité BMP le long de l'axe crypte-villosité (He et al, 2004b; Kosinski et al, 2007; Qi et al, 2017) dont l'intensité est plus importante au niveau des villosités qu'au niveau des cryptes. En 2017, il a été démontré *in vivo* que les BMPs (notamment BMP4) permettent de limiter l'autorenouvellement et l'hyperprolifération des cellules Lgr5+ en modulant négativement leur signature « souche » (Qi et al, 2017).

e) La voie de signalisation Hippo/YAP

Cette voie de signalisation (**figure 9**) a initialement été découverte chez la drosophile lors de criblages de gènes régulant négativement la croissance de tissus (Meng et al, 2016). Elle est très conservée chez les mammifères (Bossuyt et al, 2014). Son rôle est d'influencer la balance entre prolifération et différenciation. De manière générale, dans un organisme, elle agit de manière à restreindre la croissance de tissus

(Pan, 2007; Zhao et al, 2010). D'ailleurs, chez la drosophile et chez les mammifères, dans plusieurs organes, il existe de nombreux exemples où l'altération de cette voie est la cause de l'apparitions de tumeurs (Benhamouche et al, 2010; Cai et al, 2010; Dong et al, 2007). Plusieurs signaux en amont sont capables d'influencer l'activation de cette voie de signalisation, c'est le cas par exemple de la variation de la polarité cellulaire, de l'activation de mécano-senseurs ou de l'implication de récepteurs couplés aux protéines G (Yu & Guan, 2013). Même si des composants cœur de cette voie sont connus, les mécanismes qui les régulent le sont moins. Chez *Drosophila melanogaster* on compte à ce jour 5 protéines clés qui sont : la protéine kinase Hippo (Hpo) et son partenaire Sav, la kinase warts (Wts) et son partenaire Mats, le co-activateur transcriptionnel Yorkie (Yki) (Hong et al, 2016). Lorsque le complexe Hpo/Sav se forme, il en résulte la phosphorylation du complexe Wts/Mats (Pantalacci et al, 2003) dont le rôle est de séquestrer la protéine Yki. Dès lors, elle ne peut jouer son rôle de co-activateur car non liée aux facteurs de transcriptions tels que Scalloped (Scd) (Wu et al, 2008a). Chez les mammifères, il existe toute une série de gènes orthologues dont Mammalian Ste20-like Protein Kinase 1 et 2 (Mst1 et Mst2, homologues de Hpo), Salvador Homologue 1 (Sav1, homologue de sav), Large Tumor Suppressor 1 et 2 (Lats1 and Lats2, homologues de Wts), MOB kinase Activator 1A et 1B (MOB1A et MOB1B, homologues de Mats), Yes Associated Protein 1 (YAP1) et Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (Taz) tous deux homologues de Yorkie (Hong et al, 2016; Yu & Guan, 2013).

Dans l'intestin, le gène *Yap* s'exprime au fond des cryptes de Lieberkhün (Cai et al, 2010; Camargo et al, 2007; Steinhardt et al, 2008; Zhou et al, 2011), c'est une cible de la voie Wnt (Konsavage et al, 2012). De nombreuses études vont dans le sens du rôle pro-prolifératif de YAP. En effet, certains groupes ont par exemple montré que l'activation et la surexpression constitutive de YAP1 conduit, au niveau de l'EI, à l'expansion de la zone proliférative où se situent les cellules indifférenciées (Camargo et al, 2007; Zhou et al, 2011). De plus, dans le contexte d'un modèle de régénération tissulaire utilisant du Dextran sulfate sodium (DSS), des chercheurs ont montré que l'hyperactivation combinée de YAP est suffisante pour induire l'émergence de nombreux polypes intestinaux (Cai et al, 2010). À l'inverse, d'autres études ont montré que la déplétion de YAP1 et/ou de Taz n'induit pas de phénotype observable (ex : petites cryptes, perte de cellules indifférenciées) en condition homéostatique, suggérant que leur rôle est « dispensable » dans ces conditions (Barry et al, 2013; Cai et al, 2010;

Camargo et al, 2007). En revanche, la perte de Mst1/2 et de Sav (en amont de Yap/Taz) est importante en condition physiologique puisqu'elle conduit, respectivement, 1) à la désorganisation des villosités et à l'expansion du compartiment à cellules différenciées et 2) à la formation de cryptes aberrantes et de polypes. Contrairement à la protéine YAP, les composants Mst1/2 et Sav sont nécessaires en condition homéostatique (Cai et al, 2010; Zhou et al, 2011). Toutes ces données suggèrent que la voie Hippo/YAP est importante dans la régulation de l'homéostasie intestinale et qu'elle est constitutivement active en condition physiologique de manière à inhiber l'action pro-mitogénique des protéines co-activatrices YAP et Taz *via* l'engagement des Mst/Sav.

2. Un équilibre dynamique entre les lignages

Dans l'épithélium intestinal, les cellules souches ne donnent pas directement naissance à des cellules différenciées mais à ces cellules « intermédiaires », les progéniteurs (**figure 6**). Dans les précédents paragraphes, j'ai également nommé ces cellules « les cellules de la zone TA » pour « Transit amplifying cells » car ce sont des cellules transitoires qui se divisent très rapidement (cycle de 12-18h), avec quatre à six cycles de division avant de se différencier complètement (Carulli et al, 2014; Potten, 1998). C'est l'interaction entre les différentes voies moléculaires que j'ai décrites ci-dessus qui participe à un équilibre dynamique où les cellules progénitrices s'engagent dans un lignage ou dans un autre. Ainsi ces nouvelles cellules acquièrent rapidement un phénotype sécrétoire ou absorbant selon les combinaisons d'activation de ces voies. La voie Notch est l'une des principales composantes qui participent à cet équilibre.

Dans le paragraphe dédié à la voie Notch, j'ai évoqué un phénomène d'inhibition latérale de contact (**figure 10**). Ce phénomène implique deux catégories de cellules : des cellules émettrices de ligands Notch et les cellules réceptrices. De façon simplifiée, les cellules qui expriment les ligands Notch permettent d'activer cette voie en « TRANS » dans les cellules voisines. L'activation de Notch dans la cellule réceptrice bloque l'engagement de celle-ci dans le lignage sécrétoire et l'engage dans le lignage absorbant. De manière plus détaillée, la régulation du lignage sécrétoire fait intervenir deux acteurs moléculaires majeurs : 1) le facteur de transcription Hes1 et 2) le facteur de transcription Math1 (Atoh1 chez l'Homme) (Akazawa et al, 1995). *Math1* est un gène qui s'exprime dans les progéniteurs sécrétoires comme dans les cellules sécrétoires bien

différenciées. Plusieurs études d'activation ou d'inhibition de ce gène ont d'ailleurs montré que *Math1* est l'inducteur clef du programme de détermination dans le lignage sécrétoire permettant d'induire la différenciation des progéniteurs en cellules de Paneth, en cellules endocrines et en cellules caliciformes. En cas de perte de *Math1* les cellules ne s'engagent pas dans le lignage sécrétoire. C'est l'inverse dans le cas d'une surexpression de *Math1* (Shroyer et al, 2007; VanDussen & Samuelson, 2010; Yang et al, 2001). L'activation de la voie Notch permet de réguler ce processus de détermination. En effet, l'engagement dans les lignages sécrétoires est bloqué dans les souris qui surexpriment NICD au niveau de l'EI (Fre et al, 2005). De plus, nous savons que *Math1* est régulé par *Hes1* (Zheng et al, 2011). En présence de ligands tels que Dll1 et Dll4, les cellules qui expriment les récepteurs Notch et qui intègrent le signal expriment *Hes1*. Dès lors, *Math1* est réprimé, la détermination dans le lignage sécrétoire est bloquée et l'engagement de la cellule vers le lignage entérocytaire (absorbant) est lancé. La perte de *Math1* dans un fond génétique « voie Notch inhibée » permet de réduire l'induction de cellules sécrétoires et la baisse de la prolifération dans les cryptes ce qui confirme que le processus d'engagement dans le lignage sécrétoire est bien régulé par *Math1*, en aval de la voie Notch (Kazanjian et al, 2010; Kim & Shivdasani, 2011; van Es et al, 2010).

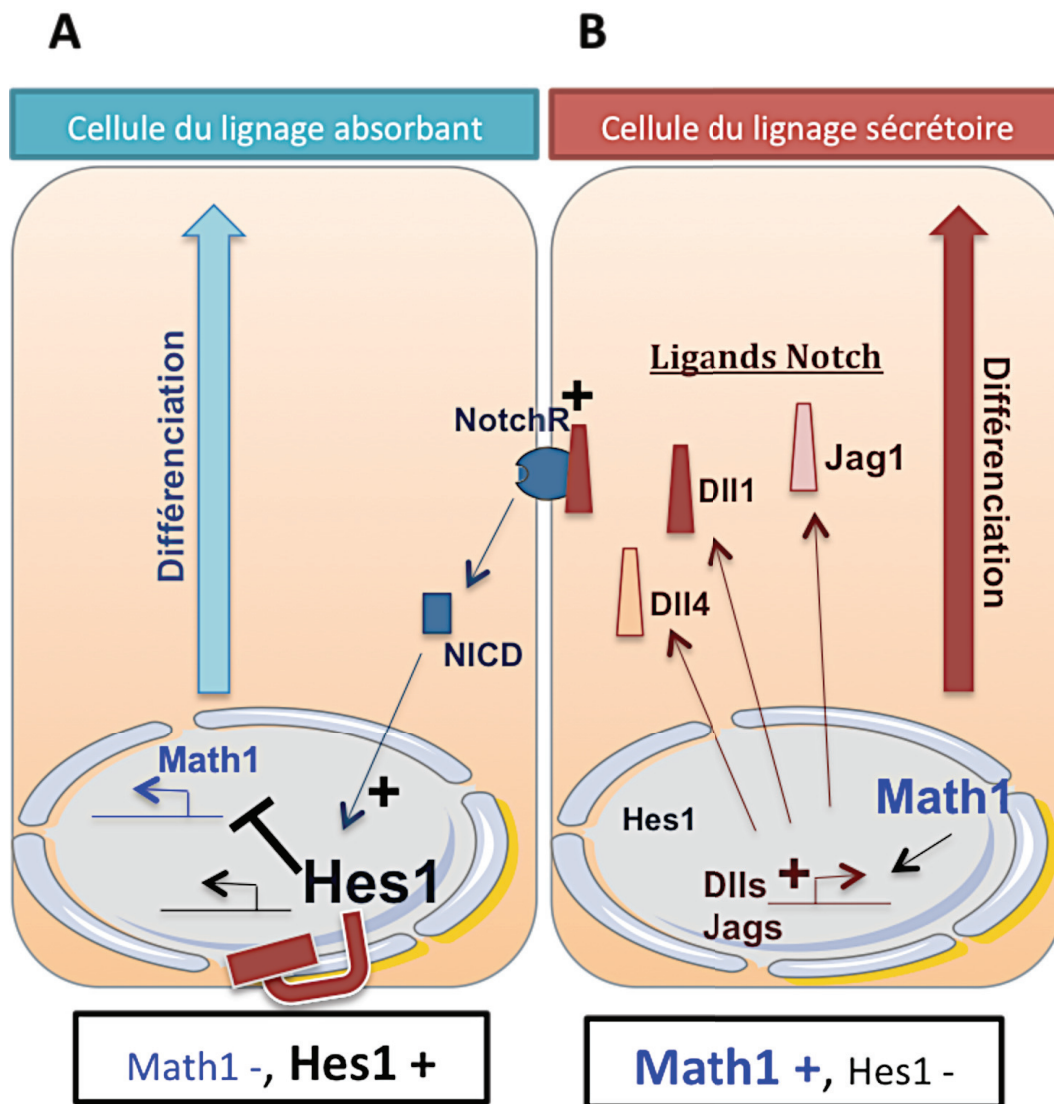


Figure 10 : Représentation schématique de l'inhibition latérale de contact lors de la génération des progéniteurs et de leur engagement dans les différents lignages. Sont représentées dans ce schéma deux cellules épithéliales (A et B) en bas des cryptes. A/ La cellule progénitrice A s'engage dans le lignage absorbant. L'activation de la voie Notch dans cette cellule permet de réprimer *Hes1* et d'affirmer son identité absorbante. B/ La cellule B s'engage dans le lignage sécrétoire. L'absence d'activité Notch et de ses composants en aval (ex : *Hes1*) ne permet pas l'inhibition de *Math1*. La cellule affirme son identité sécrétoire. Dans cette cellule, *Math1* participe à l'expression de ligands membranaires Notchs (DlIs, Jags) dont le rôle est de lier les récepteurs Notchs des cellules adjacentes. Le phénotype sécrétoire, *via* la présence de DlIs, contribue à l'autorégulation de ce lignage : la présence de cellules sécrétoires empêche l'engagement dans les cellules adjacentes dans ce même lignage. + : activation. -> : induction.

Il est intéressant de noter que les ligands Dll1 et Dll4 sont présents dans les cellules de Paneth et les cellules caliciformes (Akiyama et al, 2010; Kazanjian et al, 2010; Sato et al, 2011b; Shimizu et al, 2014) et que *Dll1* est également retrouvé exprimé dans les progéniteurs sécrétoires précoces (van Es et al, 2012). De plus les gènes *Dll1* et *Dll4* ont récemment été montrés comme directement régulés par le produit du gène *Math1* (Lo et al, 2017). Même si les profils d'expression des ligands Jag1 et Jag2 sont moins bien définis, on sait qu'ils peuvent être régulés par la voie Wnt/ β -caténine (Akiyama et al, 2010; Guilmeau et al, 2010; Rodilla et al, 2009; Sander & Powell, 2004; Schroder & Gossler, 2002). À noter que la voie Wnt/ β -caténine a également un rôle dans la stabilisation de l'activation de la voie Notch car la présence ou l'absence de la voie Wnt influence le caractère oscillatoire de l'activation de cette voie. En effet, en l'absence de signaux Wnt, NICD permet l'expression de *Hes1* qui s'autorégule négativement en fixant son propre promoteur (Hirata et al, 2002; Takebayashi et al, 1994). Cette boucle de rétrocontrôle négatif survient rapidement après l'activation de Notch ce qui confère un caractère oscillatoire à cette voie. En présence de Wnt, la β -caténine stabilisée (avec NICD) peut lier et activer de façon stable le promoteur de *Hes1*. En bas dans la crypte, à proximité des cellules de Paneth, l'activation de Notch est stable tandis que plus haut dans la crypte, là où l'activation de Wnt est plus faible, la voie Notch s'active de manière oscillatoire ce qui confère un caractère « stochastique » à la prise de décision des cellules qui s'engagent dans les différents lignages (Gehart & Clevers, 2019).

En résumé, les cellules progénitrices de la base des cryptes qui s'engagent dans le lignage sécrétoire, *via* l'activation du régulateur *Math1*, expriment des ligands de la voie Notch. Les cellules avoisinantes activent cette voie au travers de l'activation de leurs récepteurs. Dès lors, *Hes1* peut s'exprimer et réprimer *Math1*. L'induction du programme de différenciation sécrétoire est donc bloquée. Cela permet d'engager la cellule vers le lignage entérocytaire (**figure 10** et **figure 11**).

Plusieurs facteurs de transcription ayant un rôle dans l'engagement vers le lignage sécrétoire ont été identifiés comme agissant en aval de *Math1* (**figure 10** et **figure 11**). C'est le cas par exemple de *Gfi1* (famille de protéines à doigts de zinc) qui oriente la différenciation des progéniteurs précoces sécrétoires, où il s'exprime, en cellules de Paneth et en cellules caliciformes (Yang et al, 2001). Dans les souris *Gfi1*^{-/-}, l'EI est dépourvu de cellules de Paneth tandis que le nombre de cellules caliciformes est réduit.

Le compartiment entérocytaire, lui, n'est pas affecté (Shroyer et al, 2005). Dans les progéniteurs qui s'engagent vers les cellules de Paneth et les cellules caliciformes, *Gfi1* exerce le rôle de répression d'un autre facteur de différenciation de type bHLH : Neurogénine 3 (*Ngn3*). *Ngn3* est nécessaire pour orienter la différenciation des progéniteurs précoces en cellules sécrétoires entéroendocrines puisque l'altération de ce gène conduit à l'absence de ces cellules au niveau de l'EI (Bjerknes & Cheng, 2010). Ainsi, l'expression de *Gfi1* permet de stabiliser la cellule lors de son engagement vers le lignage sécrétoire Paneth/caliciforme versus le lignage entéroendocrine (Bjerknes & Cheng, 2010). Pour que les cellules progénitrices engagées se spécialisent en cellules caliciformes ou en cellules de Paneth, d'autres facteurs tels que *Klf4*, *Spedef* et *Sox9* situés en aval de *Math1* sont impliqués (Bastide et al, 2007; Mori-Akiyama et al, 2007; Noah et al, 2010; Zheng et al, 2009). En effet, au travers de la modulation de l'expression de ces gènes, les chercheurs ont révélé que leur présence influence la spécialisation des progéniteurs. L'absence de *Klf4* est par exemple associée à l'absence de cellules caliciformes alors que l'absence de *Sox9* induit la perte des cellules de Paneth. De manière plus complexe, l'absence de *Spedef* induit la perte des cellules de Paneth et des cellules caliciformes alors que sa surexpression est responsable de la réduction du nombre de cellules de Paneth. Concernant les cellules Tuft, le mécanisme de détermination de ce compartiment est encore mal caractérisé. Même si ces cellules sont aujourd'hui classées parmi les cellules sécrétoires de l'EI, des études remettent en cause l'origine de ces cellules puisque la modulation négative des gènes évoqués ci-dessus, étant impliqués dans l'engagement des lignages sécrétoires, ne semble pas perturber l'apparition de ces cellules. En revanche, certaines études ont démontré que le facteur *Pou2f3*, qui est retrouvé exprimé dans ces cellules tuft, est nécessaire pour générer ces cellules. En effet, la perte de *Pou2f3* induit la perte des cellules tuft au niveau de l'EI ce qui démontre le caractère nécessaire de ce gène dans le processus de différenciation (Gerbe et al, 2016). À noter que ce gène est le premier à avoir été démontré comme étant requis pour la présence de ces cellules au niveau de l'EI (Gerbe & Jay, 2016).

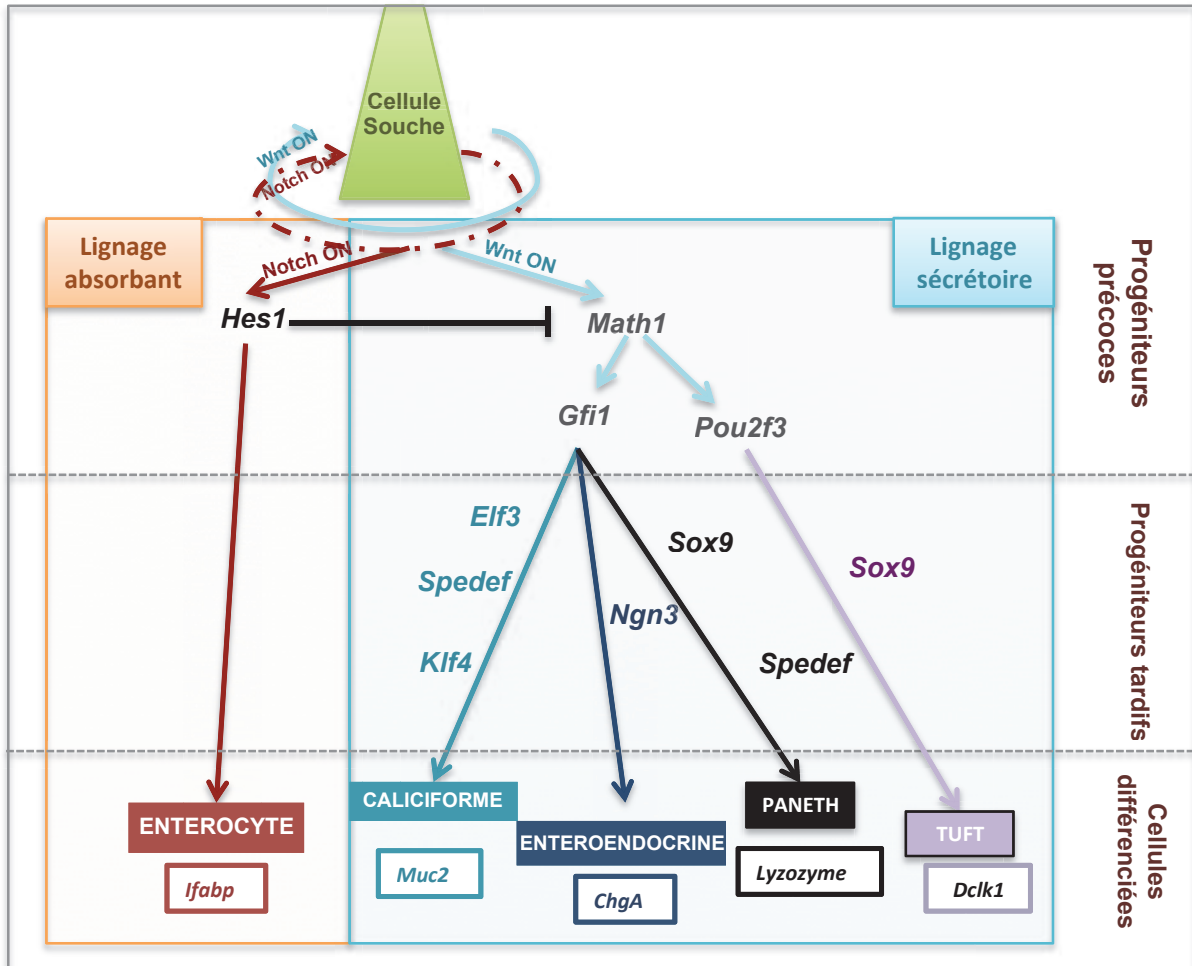


Figure 11 : Engagement et différenciation des cellules progénitrices nouvellement générées dans les lignages absorbants et sécrétoires. L'activation concomitante des voies Wnt et Notch contribue au maintien de l'identité et de l'autorenouvellement des cellules souches. Entre les cellules nouvellement générées (progéniteurs précoces), il y a inhibition latérale de contact. Ainsi la voie Notch réprime *Math1* et permet l'engagement dans le lignage absorbant. Lorsque la voie Notch est inactive, *Math1* peut s'exprimer et activer des gènes cibles impliqués dans le programme génétique inducteur du lignage sécrétoire. C'est la combinaison d'activation de gènes qui détermine dans quelle voie la cellule se spécialise (Ex : *Math1* active *Gfi1* qui active *Elf3* + *Spedef* + *Klf4* pour donner des cellules caliciformes).

IV. Un modèle : les organoïdes intestinaux

A. Premiers modèles de culture primaire d'EI

Avant de démarrer cette partie, je souhaite définir la culture cellulaire « primaire » d'organoïdes. En effet, vu le contexte actuel où le personnel de la communauté scientifique et de l'industrie confond fréquemment « culture de lignées de cellules sous forme de sphéroïdes » et « culture fraîche d'organoïdes », je souhaite apporter une précision sur ce point.

De manière générale, la culture cellulaire dite « primaire » se définit par la culture de cellules issues de biopsies fraîchement récupérées, récapitulant certains paramètres de l'organisme sacrifié ou du tissu prélevé. Souvent, on lui associe le terme latin *ex vivo* qui signifie « en dehors du vivant », « en dehors de l'organisme ». C'est le cas, par exemple, des organoïdes intestinaux cultivés à partir de fragments intestinaux d'animaux ou de biopsies intestinales de patients récapitulant en partie l'architecture « physiologique » du tissu intestinal. *A contrario*, la culture de sphéroïdes se fait à partir de lignées de cellules, c'est à dire des cellules issues d'un clone qui a initialement été dérivé et sélectionné par l'expérimentateur pour proliférer sur du long terme *in vitro*. Dans ce système de culture, on empêche ces cellules clonales d'adhérer au support, ainsi on les force à se joindre les unes aux autres pour former des sphères.

Les premiers modèles cellulaires de culture primaire, qui ont permis l'étude de l'EI *in vitro*, remontent à plusieurs années. Dans les années 1990, on étudiait par exemple l'épithélium adulte au travers de systèmes de culture en deux dimensions (2D) dans lesquels sont déposées des cellules épithéliales fraîches, primaires isolées par digestion enzymatique sur un tapis de collagène I. Dans ce système, le collagène sert de support physique pour que les cellules des cryptes qui prolifèrent puissent adhérer au substrat et se renouveler pendant environ deux semaines dans un milieu contenant du sérum de veau fœtal (SVF) (Evans et al, 1992). Pour pouvoir étudier des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'homéostasie intestinale, les chercheurs avaient besoin d'avoir recours à un modèle de culture à court terme dans lequel les cellules ne sont pas altérées génétiquement. En effet, à cette époque il existait déjà des modèles de lignées, d'adénocarcinomes par exemple (cellules Caco2, autres), cependant les clones

sélectionnés pour établir ces lignées sur des longues périodes n'étaient pas et ne sont toujours pas les modèles les plus représentatifs d'un EI sain. À partir d'intestin de rat, Evans *et al.* ont combiné l'action d'enzymes de digestion (collagénase/dispase, déjà utilisées par Gibson *et al.* en 1989) et de réactifs chimiques tels que l'EDTA pour isoler les cellules épithéliales du reste de l'intestin. À noter que dans ce système, la présence d'autres cellules telles que des fibroblastes est omniprésente, une contamination cellulaire qui limite le modèle d'étude en ce qui concerne les analyses en aval. En ce qui concerne les matrices extracellulaires utilisées, il était recommandé d'utiliser du collagène de type I car l'apparence des colonies cultivées, déjà décrites comme des « organoïdes », était plus organisée. L'utilisation de Matrigel et d'hydrogel n'était pas recommandée du fait de « l'insuffisance de stabilité du substrat » (Evans et al, 1992).

À ce jour, il existe une multitude de méthodes pour cultiver des cellules primaires et de lignées en deux dimensions (2D), voire en trois dimensions (3D) de manière à se rapprocher des conditions physiologiques d'un organisme (forme de l'organe, statut prolifératif, différenciation) (Bhatia & Ingber, 2014; Chen et al, 2015; Fukamachi, 1992; Graves et al, 2014; Kusek et al, 2014; Lozoya-Agullo et al, 2017; Perreault & Beaulieu, 1998; Whitehead et al, 1999). Ootani *et al.* ont par exemple mis en place en 2009 un système de culture primaire où des cellules épithéliales d'intestin de souris prolifèrent à l'interface entre l'air et le milieu liquide (méthode ALI : « Air-liquide interface »). Ce système d'interface a permis notamment de pouvoir mieux oxygéner les cellules et de les cultiver pendant plus d'un an en présence ou en absence de myofibroblastes, cellules qui participent à la constitution de niche des cellules souches (Ootani et al, 2009). La même année a été publiée une méthode dans laquelle les cellules souches intestinales sont cultivées en 3D, en l'absence de fibroblastes, formant des organoïdes aussi appelés de façon vulgarisée « mini-intestins ». C'est cette méthode de culture que j'ai décidé d'utiliser tout au long de ma thèse. Elle est décrite ci-après (Sato et al, 2009) (**figure 12**).

B. Le modèle « organoïde » par T. Sato

Alors qu'en 2007 le gène *Lgr5* vient d'être identifié comme marqueur de cellules souches à la base des cryptes (Barker et al, 2007), il permet la culture d'intestins miniatures sous forme d'organoïdes à long terme (Sato et al, 2009). En effet, les cellules

Lgr5⁺ ont été triées à partir d'intestin de souris *Lgr5-EGFP-IRES-CREERT2* et incorporées dans une matrice extracellulaire 3D (en forme de dôme) constituée de Matrigel (**figure 12**). Les facteurs ajoutés dans le milieu ont été choisis sur la base des facteurs de croissance connus pour être essentiels dans le maintien du caractère « souche » des cellules intestinales à la base des cryptes. Les composants cœurs de ce milieu, sans sérum, sont les ligands R-spondine1 (maintien de l'identité « souche »), EGF (prolifération) et Noggin (inhibition de BMPs, de la différenciation). Dès lors que les cellules souches s'auto-renouvellent dans ce milieu de culture (ENR, EGF/Noggin/R-spondine1), elles forment des structures ovoïdes qu'on appelle des cystes. Ce sont des structures « rondes » ayant une lumière en leur centre. En quelques jours (<7jours), ces cystes donnent naissance à de nombreux bourgeons qui se projettent dans la matrice formant des sortes d'appendices en « doigts de gants » ressemblant à des cryptes. D'ailleurs, à la pointe des bourgeons on observe la présence de cellules de Paneth et de cellules souches Lgr5⁺ intercalées. Plus haut dans les cryptes et dans la partie plus centrale de l'organoïde, on retrouve des cellules différenciées, majoritairement des cellules entérocytaires et les cellules du lignage sécrétoire incluant les cellules caliciformes et les cellules entéroendocrines. Dans ce système de culture, il est également possible de cultiver directement des cryptes entières. De cette manière, le rendement en organoïdes est meilleur puisque la niche physique n'est pas altérée. Dans mes mains, environ 70% des cryptes forment des organoïdes en milieu ENR classique. D'après Sato *et al.* seulement 6% des cellules souches Lgr5⁺ triées sur la base du rapporteur *Gfp* sont capables de croître en milieu ENR + Y27632 (inhibiteur d'apoptose, inhibe la kinase Rho) (Sato et al, 2011b; Sato et al, 2009). C'est pourquoi il est préférable de cultiver des cryptes entières lorsque le tri n'est pas nécessaire. Lorsque les organoïdes sont suffisamment gros (après 4 à 7jours), il est possible de casser mécaniquement ces structures avec le cône d'une pipette de manière à séparer/dissocier les bourgeons les uns des autres. De cette manière, lors de la remise en culture de ces structures en « doigts de gants » dans une nouvelle goutte de Matrigel, chaque bourgeon est capable de reformer un nouvel organoïde complet.

C. Organoïdes et conditions de culture

Même si Evans *et al.* n'avaient pas recommandé l'utilisation de Matrigel comme matrice extracellulaire pour la culture de cellules en 2D (Evans et al, 1992), c'est

aujourd'hui une des matrices utilisées en routine pour la génération d'organoïdes murins. J'ai moi-même utilisé cette matrice pour l'établissement de culture 3D d'organoïdes murins intestinaux tout au long de ma thèse. Le Matrigel sert de support physique sur lequel les cellules cultivées en 3D peuvent « s'appuyer » comme sur une lame basale. Principalement composé de laminines, d'entactines, de collagènes et de protéoglycanes, et étant un extrait de tumeur EHS (Engelbreth-Holm-Swarm), il peut également contenir des facteurs de croissances (FGF, autres), des hormones et autres molécules. L'utilisation de collagène I est une alternative à cette matrice extraite de tumeurs que je qualifie de « boîte noire » dont la composition interne est mal connue. Cependant, même si les organoïdes se développent sur du long terme dans du collagène I, la culture n'est pas équivalente car la taille, la forme et l'expression de marqueurs de cellules sont altérées par rapport aux structures cultivées en Matrigel (Jabaji et al, 2013). Même si des études suggèrent l'utilisation d'autres matrices tels que des laminines et des fibrines (Blondel & Lutolf, 2019; Broguiere et al, 2018; Capeling et al, 2019) la caractérisation et l'acceptation, par la communauté scientifique, de nouvelles matrices, reste un challenge d'actualité.

Dans les parties précédentes où j'ai décrit le fonctionnement de la niche des cellules indifférenciées de l'EI et le fonctionnement de voies moléculaires impliquées dans la dynamique d'autorenouvellement du tissu, j'ai évoqué le rôle majeur de certains composants moléculaires tels que les ligands Wnt, R-spondines, Noggin, EGF et les ligands de la voie Notch. Dans le procédé de culture cellulaire qui a été publié en 2009 par *Sato et al.*, il est décrit une composition chimique dans laquelle ces éléments sont combinés à différentes concentrations pour établir des organoïdes intestinaux murins.

Dans ces structures 3D, les cellules indifférenciées maintiennent leur identité « souche » *via* les ligands Wnt endogènes fournis par les cellules de Paneth et *via* l'action concomitante des R-spondines additives qui agissent en synergie avec la voie Wnt (Sato et al, 2011b). L'addition de ligands Wnt supplémentaires conduit en revanche à la formation de cystes (intestin grêle) sauf dans le cas d'organoïdes de colon (colonoïdes) qui ont besoin de ces ligands pour se développer *ex vivo* (Sato et al, 2011a). Lorsqu'on remplace les ligands Wnt/R-spondines par du CHIR99021 (inhibiteur du complexe GSK3- β) la culture d'organoïdes murins intestinaux est également possible (Yin et al, 2014). De même lors de l'activation constitutive de la β -caténine (Schwitalla et al, 2013).

L'addition de ligands Notch n'est pas nécessaire puisqu'ils sont fournis par les cellules de Paneth et autres cellules sécrétoires proches de la niche. Au contraire, l'utilisation de molécules décrites comme activatrices de la voie Notch (ex : VPA, acide valproïque) permet de supprimer l'induction de la différenciation dans le lignage sécrétoire et de favoriser l'enrichissement en cellules souches Lgr5+ dans les organoïdes intestinaux murins. De plus, l'activation de la voie Notch reste un challenge du fait de la faible disponibilité en ligands Notch utilisables pour la culture cellulaire et de la difficulté de leur utilisation pour induire l'effet escompté (D'Souza et al, 2008; Yin et al, 2014). Même si les cellules de Paneth sont fournisseuses d'EGF, l'addition d'EGF favorise la prolifération des cellules du compartiment à cellules souches ce qui permet aux organoïdes d'être cultivés sur de longues périodes (Date & Sato, 2015). L'addition du ligand Noggin est également primordiale pour la culture sur du long terme. En effet, lors d'une déplétion en Noggin, les organoïdes se différencient en quelques semaines même s'ils se développent en l'absence de mésenchyme, une source de BMPs. Cela suggère d'ailleurs que la part de BMPs exprimée par les cellules de l'EI a également un rôle dans la régulation de l'homéostasie des cellules souches intestinales.

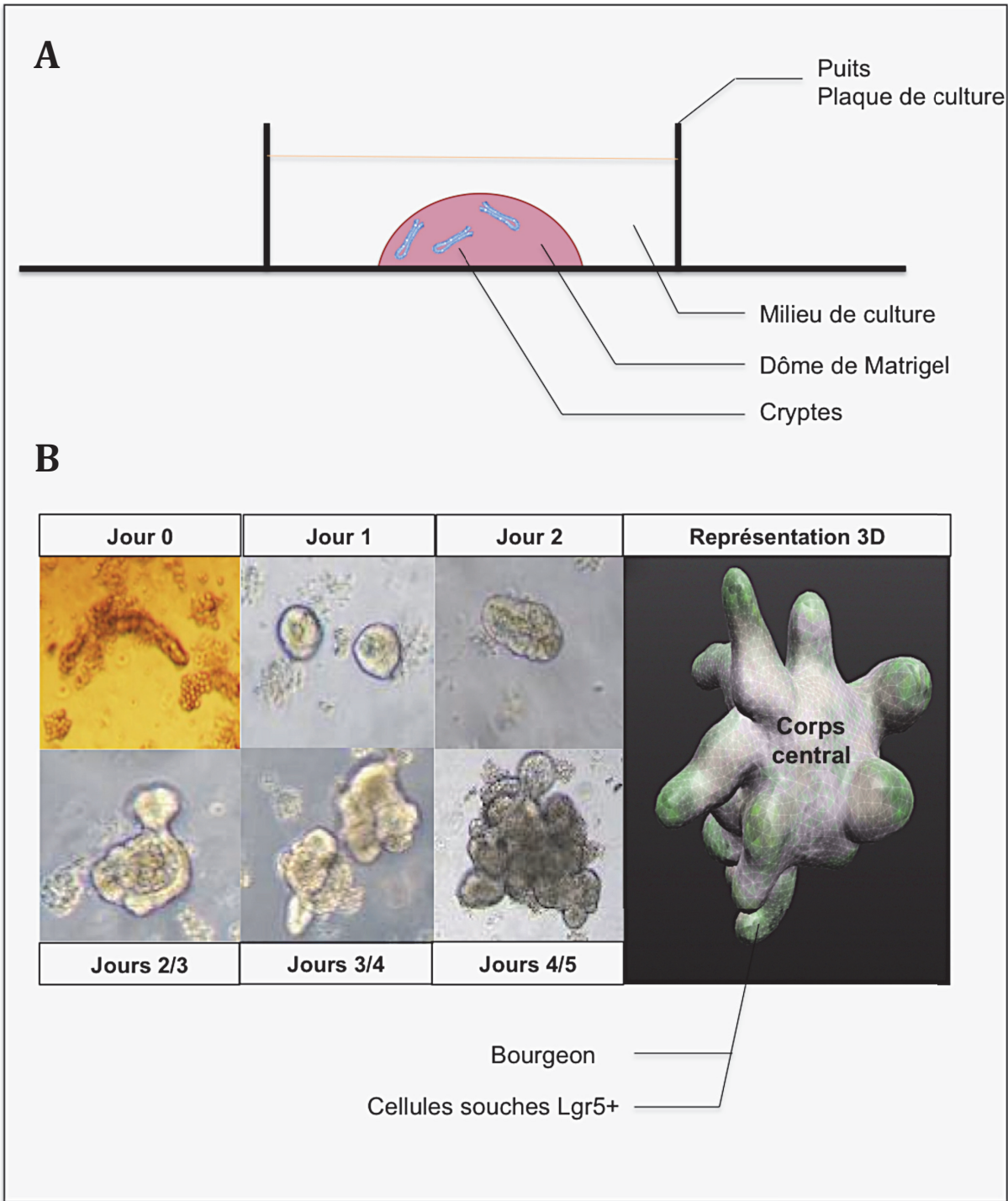


Figure 12 : Système de culture primaire d'organoïdes intestinaux. A/ Puits de plaque de culture contenant un dôme de Matrigel solide dans lequel ont été déposées des cryptes fraîches d'épithélium intestinal d'intestin grêle. Le dôme est recouvert d'un milieu permettant la croissance des organoïdes. Classiquement on l'appelle milieu ENR pour EGF, Noggin, R-spondine. B/ Développement de cryptes d'intestin grêle en milieu ENR. Les photos montrent le développement de ces cryptes en organoïdes pendant 5 jours (J). On trouve différents types d'évolutions : J0/cryptes, J1/petites sphères rondes, J2-3/organoïdes simples ovoïdes, J3-4/organoïdes avec 1 ou 3 bourgeons, J4-5/organoïdes complexes avec plus de 3 bourgeons. Chaque bourgeon représente une structure de type crypte. La représentation 3D schématise un organoïde complexe à J5. La partie grise montre la zone différenciée et la partie verte montre les cellules souches Lgr5+

DEUXIÈME PARTIE

Les hormones thyroïdiennes

I. Physiologie de la glande thyroïdienne

A. Structure et rôle de la glande thyroïdienne

Comme son nom l'indique la glande thyroïdienne est un organe producteur d'hormones, une glande ayant la forme grossière d'un « papillon » (**figure 13**). Chez l'Homme, cette glande est située dans la partie basse et antérieure du cou plus précisément dans la partie antérieure de la trachée, sous « la pomme d'Adam », au niveau des vertèbres C5 et T1. Cet organe est constitué de deux lobes reliés entre eux par un isthme conjonctif. Principalement composée de follicules thyroïdiens, la glande thyroïdienne a comme rôle de produire et de déverser dans la circulation sanguine deux types d'hormones : les hormones thyroïdiennes (HTs) et la calcitonine. La calcitonine permet de réguler, en combinaison avec l'hormone parathyroïdienne et la vitamine D, le taux de calcium dans le flux sanguin en l'abaissant. Les HTs, elles, influencent plus généralement le métabolisme de base de l'organisme par exemple en activant le métabolisme énergétique, des lipides et des protéines (augmentation de l'absorption de glucose, la glucogénolyse, la néoglucogénèse, la lipolyse et la synthèse et dégradation des protéines). Elles jouent également un rôle important à l'échelle tissulaire puisqu'elles participent à la croissance et à la maturation d'organes tels que l'os et l'intestin mais aussi dans la maturation du système nerveux central (SNC). D'ailleurs l'absence congénitale, chez l'Homme, de glande thyroïdienne chez le nouveau-né provoque des lésions neurologiques irréversibles amenant au crétinisme (Maenhaut et al, 2000; Mullur et al, 2014; Rastogi & LaFranchi, 2010; Salisbury, 2003).

B. Histologie de la glande thyroïdienne

La glande thyroïdienne est principalement constituée de follicules thyroïdiens ou vésicules thyroïdiennes (acini). Leur taille varie en fonction de l'activité de la glande. Ces follicules sont formés d'un épithélium monostratifié cubique qui borde une lumière centrale remplie d'une substance acidophile qui réagit en coloration PAS, le colloïde. Comme dans l'EI, les cellules qui le composent sont polarisées avec un pôle apical bordé de microvillosités qui pointe en direction de la lumière et un pôle basal qui pointe en direction d'une fine membrane basale : ce sont les thyrocytes (**figure 13**). Leur cytoplasme est caractéristique puisqu'il est rempli de granules et de vacuoles sécrétoires contenant la thyroglobuline (TG, complexe glycoprotéique précurseur des HTs), composant du colloïde. Dispersées parmi les thyrocytes on trouve également quelques cellules appelées cellules C (récurrence de 0,1%) qui sont responsables de la production de calcitonine, d'où leur nom (Benvenga et al, 2018; Nilsson & Fagman, 2017). À l'extérieur de la glande, une fine capsule fibreuse l'entoure et s'engage dans la glande en formant des septa (« intrusions » ou « avancées » de tissu fibreux entre les follicules) qui sont le support des nombreux vaisseaux sanguins qui irriguent la glande, des vaisseaux lymphatiques et des nerfs.

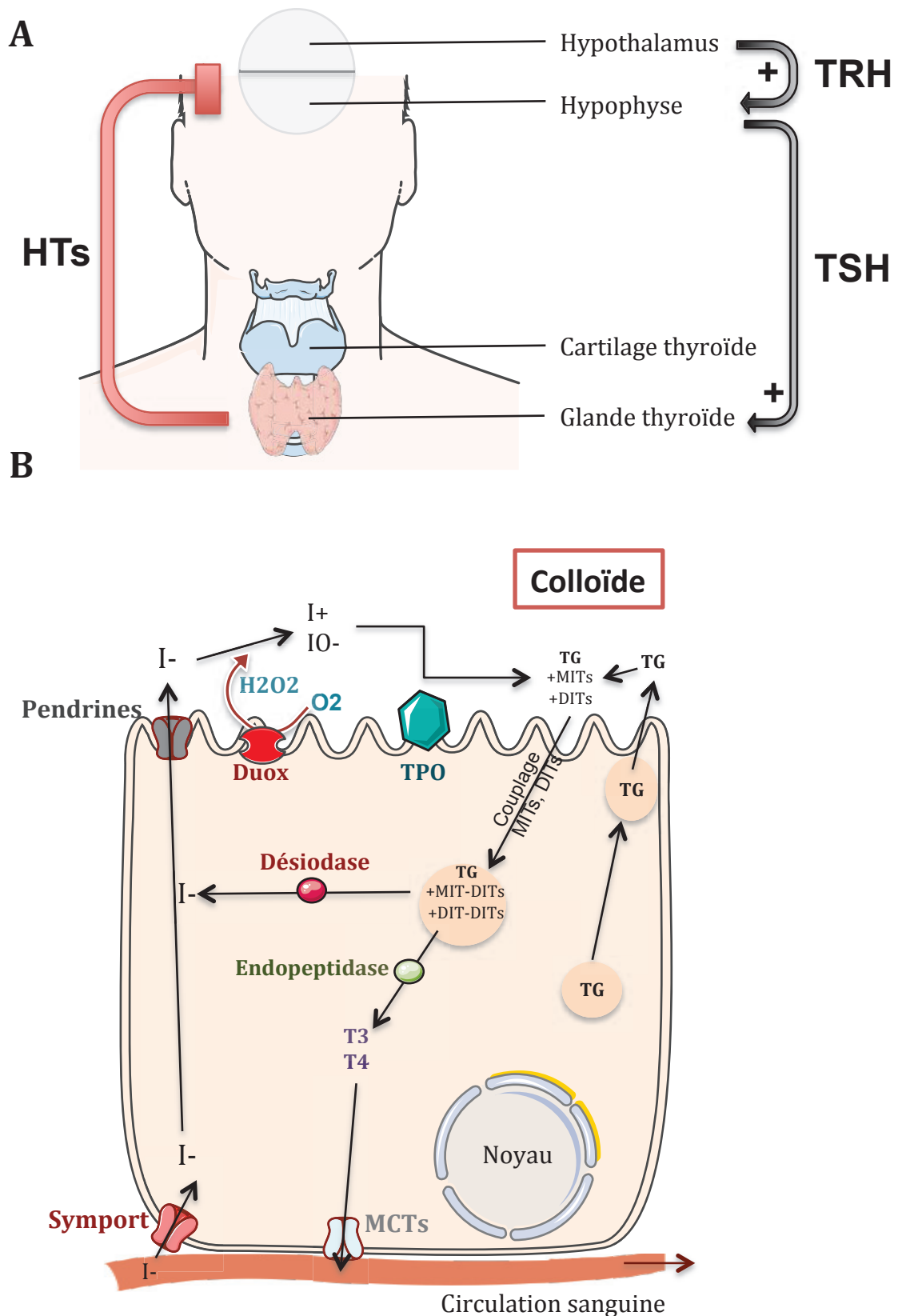


Figure 13 : La glande thyroïde. A/ Position de la glande chez l'humain et contrôle de la production d'Hormones Thyroïdiennes (HTs) par les hormones TRH et TSH. B/ Production des HTs par un thyrocyte. L'iode qui entre dans la cellule est intégrée aux thyroglobulines (TG) préalablement excrétées dans le colloïde. La TG iodinée (MITs, DITs) est clivée pour libérer la T₄ et la T₃ qui sont transportées dans le sang jusqu'aux organes cibles. Les flèches pleines indiquent le passage à l'étape suivante.

C. Biosynthèse des hormones thyroïdiennes

1. Présentation des hormones thyroïdiennes

Il existe deux types d'HTs (**figure 14**) : 1) la thyroxine (T4, 3,5,3',5'-tetraiodothyronine) qui est faiblement active et qui agit majoritairement comme pro-hormone (Schroeder et al, 2014), 2) la forme active des HTs appelée 3,5,3'-triiodothyronine (T3). Toutes deux sont issues de la TG (**figure 13**). C'est une glycoprotéine massive (>2700 acides aminés, ±660kDa) constituée d'un « corps central », un squelette de carbones formé de nombreux résidus tyrosine iodinés (liaisons à des molécules d'iode). La TG est constituée d'un enchaînement de résidus tyrosines dont le nombre d'ions iodure liés varie en fonction des réserves d'iode de la glande. Il en résulte un enchaînement de MITs (mono-iodo-tyrosines) et de DITs (di-iodo-tyrosines), dont le nombre varie selon le nombre d'ions iodure intégrés à la TG. Dans les thyrocytes, lorsque la TG est suffisamment iodinée, certaines enzymes endopeptidases comme les catépsines sont capables de cliver la TG pour former la T4 et la T3 (Dunn et al, 1991). Toutes deux, la T4 et la T3 sont formées de deux résidus tyrosines (= thyronine) dont chaque résidu est capable de lier deux ions iodure (= iodothyronine). La différence entre la T3 et la T4 réside dans le fait que la T4 possède quatre atomes d'iode en position 3, 5, 3' et 5' tandis que la T3 ne possède pas d'atome d'iode en 5' mais uniquement en position 3, 5 et 3', d'où son nom. Il existe d'autres formes inactives de thyronines iodinées (iodothyronines) : la reverse T3 (rT3) et la T2. Elles sont inactives du fait de la position des atomes d'iode (**figure 14**). Dans la molécule de TG, les sites majeurs de formation des HTs se situent côté N-terminal (N-term) et en C-terminal (C-term) (Di Jeso & Arvan, 2016). La molécule de TG est majoritairement constituée de DITs ce qui conduit à une production plus importante de T4 que de T3. À noter que seules trois ou quatre molécules d'HTs sont produites par molécule de TG et que la T3 produite de cette manière ne représente que 20% de la T3 circulante chez l'Homme (±50% chez le rat) (Chanoine et al, 1993; Di Jeso & Arvan, 2016; Dunn & Dunn, 2001; Larsen, 1975). En effet, les 80% de la T3 stockée proviennent de la déiodination de T4. Ces informations permettent d'expliquer pourquoi la majorité des HTs produites est constituée de T4 (Benvenga et al, 2018; Citterio et al, 2019).

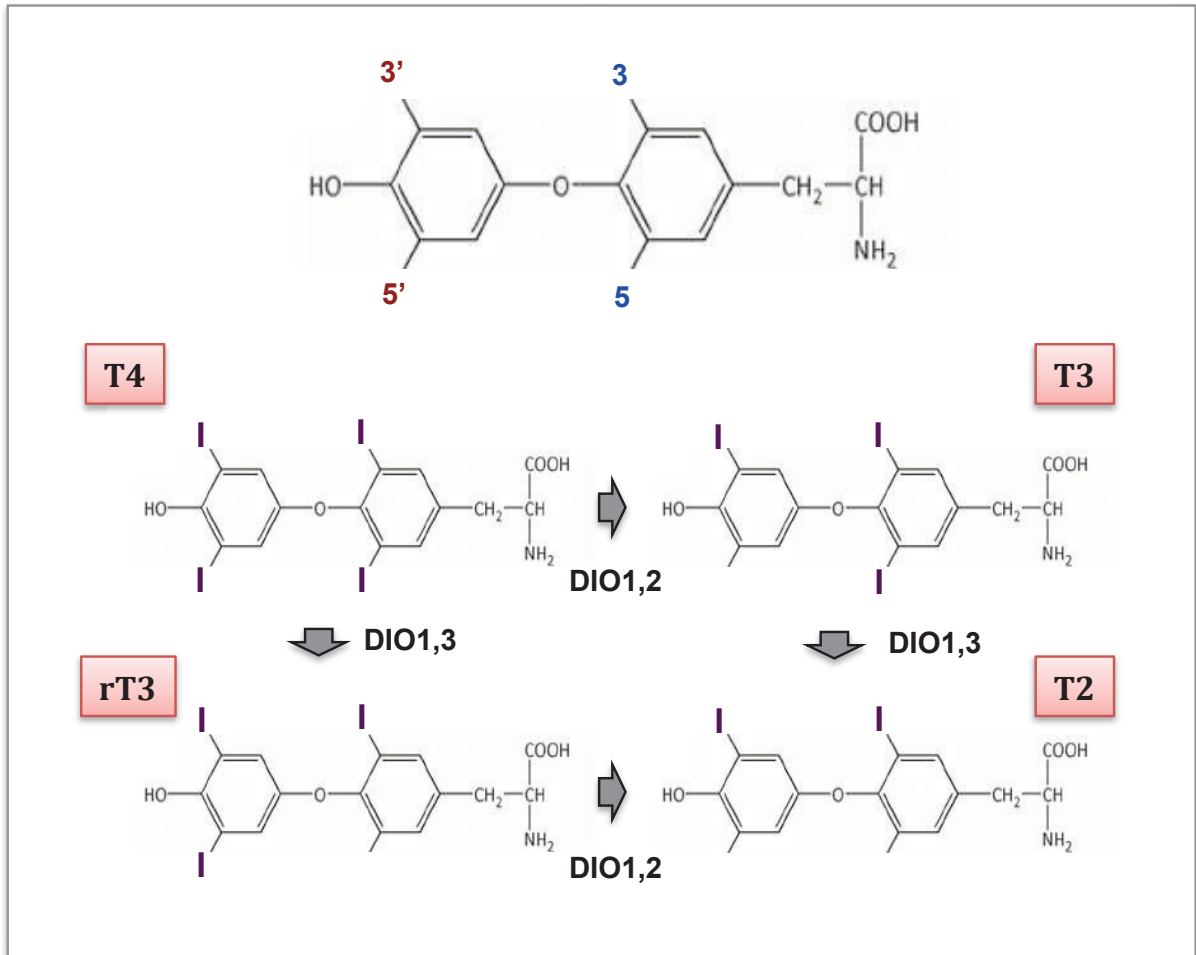


Figure 14 : Les hormones thyroïdiennes. Dans l'encart du haut est schématisé le squelette carboné des hormones thyroïdiennes. Le type d'hormones thyroïdiennes varie suivant la position des groupements d'iode sur ce squelette. Par exemple, la T4 est la résultante de l'iodination en position 3, 5 du cycle carboné interne et 3', 5' du cycle carboné externe. Les enzymes désiodases sont capables d'enlever des atomes d'iode sur chacune des hormones (T4, T3, T2, rT3). Dio2 permet d'activer la T4 en T3 et de passer de la rT3 en T2. Dio3 permet d'inactiver la T3 en rT3 et d'inactiver la T3 en T2. Dio1 peut intervenir dans toutes les réactions.

2. Production des hormones thyroïdiennes

La production des HTs s'effectue dans les thyrocytes en plusieurs étapes : 1) l'entrée iode dans la glande thyroïdienne, 2) l'intégration de molécules d'iode et 3) la sécrétion des HTs (**figure 13**).

Le cycle de production des HTs commence avec l'ingestion d'iode contenu dans les aliments ou dans des compléments alimentaires/médicaments enrichis en iode. On en trouve naturellement dans les « graines », la viande, le sel iodé et d'autres aliments. L'iode qui a été absorbé lors de la digestion circule dans le système sanguin est capté par les thyrocytes. Les vaisseaux sanguins qui perfusent la glande permettent de délivrer cet iode au plus près des thyrocytes. Les vaisseaux sanguins sont portés par le tissu conjonctif de la membrane basale. De ce fait, les thyrocytes absorbent l'iode (sous forme d'ions iodure I^-) au travers de pompes énergétiques situées du côté basolatéral. Ce sont des symports NIS (Sodium-Iodide Symporter) codés par exemple par le gène *SLC5A5* chez l'Homme (Matos et al, 2018). La concentration en iode dans la circulation sanguine étant 30 fois plus faible que dans la thyroïde (Eskandari et al, 1997; Portulano et al, 2014; Rhoden et al, 2008), l'utilisation d'une pompe énergétique utilisant du sodium est nécessaire pour aller « à contre-courant » et stocker l'iode dans la glande. Dès lors, l'iode cytoplasmique diffuse passivement dans le cytoplasme jusqu'au pôle apical puis passe dans le colloïde par des transporteurs tels que la protéine échangeuse d'ions pendrine (Benvenga & Guarneri, 2018), codée par le gène *SLC26A4* chez l'Homme. S'en suit l'étape d'intégration des molécules d'iode dans le colloïde, proche de la membrane apicale des thyrocytes. Des protéines transmembranaires de la famille des NADPH oxydases appelées Dual-function Oxydase 1 et 2 (Duox1-2) permettent de générer du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ce qui favorise l'oxydation des ions iodure (I^-) en I^+ ou OI^- par l'enzyme Thyroid Peroxydase (Tpo) (Belforte et al, 2015; Muzza & Fugazzola, 2017; Rousset et al, 2000). Ces derniers interagissent avec la TG qui est alors iodinée permettant la formation de DITs et de MITs dont on a parlé dans le paragraphe précédent. Par la suite, la TG iodinée est alors internalisée dans le cytoplasme des thyrocytes par endocytose (donc d'abord présente dans des vésicules) et est protéolysée par des endopeptidases/carbopeptidases libérant la T4 et la T3 (Marino & McCluskey, 2000). Les DITs et les MITs qui ne sont pas associés en « dimères » pour former la T4 et la T3 sont désiodées par des enzymes telles que la iodotyrosine dealogenase I (Iyd1,

aussi appelée désiodase), ce qui permet de réutiliser les ions iodures les renvoyant dans le colloïde pour qu'ils soient réoxydés et réintégrés à de nouvelles molécules de TG (Gnidehou et al, 2004). Des transporteurs tels que Mct8 (Monocarboxylate transporter 8) et/ou Mct10 (Monocarboxylate transporter 10) participent au relargage des HTs dans le sang et à l'entrée des hormones dans les cellules de tissus « cibles ». C'est également le cas des transporteurs Lat1 et Lat2 (L-type Amino Acid Transporters) (Dumitrescu et al, 2006; Friesema et al, 2003; Hinz et al, 2015; Krause & Hinz, 2017; Mayerl et al, 2018; Refetoff & Dumitrescu, 2007; Vickers et al, 2012). La disponibilité de ces récepteurs dépend du tissu et de l'espèce qu'on étudie.

3. Contrôle de la production des hormones thyroïdiennes

La glande thyroïdienne fabrique et stocke de grandes quantités d'hormones dans les vésicules qui la constituent. À partir de ces réserves, la glande déverse dans le sang certaines quantités d'HTs. Ces mécanismes sont sous le contrôle de plusieurs facteurs.

L'un des points de contrôle est le niveau de TSH (Thyroid Stimulating Hormone, ou thyroïdostimuline) circulante, une hormone sécrétée par l'antéhypophyse. L'hypophyse (ou glande pituitaire) se situe à la base du cerveau (Kang et al, 2017; Nagayama et al, 1989) (**figure 13**). Son rôle est de sécréter des hormones dont certains modulent l'activité sécrétoire de glandes endocrines. La sécrétion de ces hormones se fait en réponse à des stimuli envoyés par l'hypothalamus, lui-même sous l'influence de signaux envoyés par le système nerveux central (SNC). La glande hypophysaire est la clef de voûte qui permet d'intégrer les stimuli du SNC et d'y répondre *via* le système endocrinien (Hoermann et al, 2015). L'hypophyse est constituée de trois lobes, un lobe antérieur (antéhypophyse), un lobe intermédiaire fin et un lobe postérieur (neurohypophyse). Lors d'un stimulus hypothalamique *via* l'hormone TRH (TSH Releasing Hormone), transmis par le système porte hypophysaire (système sanguin de veines portes) jusqu'au lobe antérieur de l'hypophyse, les cellules thyrotropes localisées dans ce dernier sécrète la TSH qui stimule la production d'HTs, par exemple *via* la stimulation de l'entrée de TG dans les thyrocytes et son clivage par les peptidases (Brix et al, 1996; Hoermann et al, 2015). Un système de rétrocontrôle négatif permet de limiter l'excès de production d'HTs puisque les HTs sont capables de réguler à la fois la

production de TRH et de TSH. De plus, la TSH autorégule sa production au travers d'une boucle de rétrocontrôle négatif dans les cellules thyroïdiques (Prummel et al, 2004).

Le niveau d'iode circulant constitue lui-même un niveau de régulation pour la synthèse et la production des HTs (Song et al, 2010b). En insuffisance d'iode, les thyrocytes produisent plus d'HTs. En excès d'HTs, les thyrocytes réduisent leur production d' H_2O_2 et la iodination de la TG ce qui conduit à la baisse générale de la production d'HTs (Wolff & Chaikoff, 1948).

La modulation de l'activité de sélénoprotéines, les désiodases (Iodothyronine Deiodinases, DIOs), capables de soustraire des atomes d'iode, est elle-même un moyen de contrôle de la production des HTs (Bianco, 2013). Par exemple, l'augmentation du taux de TSH sanguin permet de favoriser l'augmentation de l'activité de conversion de T_4 en T_3 par certaines de ces enzymes. Il existe trois types de désiodases (DIOs) : Dio1, Dio2 et Dio3 (Bianco & Kim, 2006). Les désiodases 1 et 2 sont présentes dans la glande thyroïde et sont les enzymes stimulées par la TSH qui convertissent la T_4 en T_3 en catalysant la déiodination de la T_4 en $5'$ ($3-5-3'-T_3$). L'enzyme Dio1 est particulière car elle agit à la fois comme un pro-activateur d'hormone thyroïdienne ($T_4 \rightarrow T_3$) mais aussi comme inhibiteur pour générer, *in fine*, de la T_2 inactive ($T_4 \rightarrow rT_3$; $rT_3 \rightarrow T_2$; $T_3 \rightarrow T_2$). Quant à Dio3, elle convertit la T_3 en métabolites inactifs en catalysant la déiodination de la T_3 en $5'$ ($3-3'-T_2$ ou $3-3'-5'-rT_3$). Les DIOs sont des protéines membranaires (membrane plasmique et réticulum endoplasmique) dont le site catalytique pointe dans le cytoplasme (Bianco & Larsen, 2005; Larsen & Zavacki, 2012). Elles ne sont pas capables de déiodiner la TG qui leur est inaccessible puisqu'elle est située d'abord dans la lumière folliculaire puis dans les vésicules endocytées lors de son transfert dans le cytoplasme (Sellitti & Suzuki, 2014) (**figure 13** et **figure 14**).

4. Transport des hormones thyroïdiennes

Pour agir au niveau des organes, les HTs produites sont déversées dans le sang et transportées jusqu'aux organes en question. Dans le sang, les HTs ne sont pas libres puisqu'elles sont majoritairement liées à des protéines présentes dans le sérum. Parmi celles-ci, on retrouve notamment la protéine TBG (Thyroid Binding Protein), la transthyrétine et l'albumine (Bartalena & Robbins, 1993; Refetoff, 2000). Je rappelle

que, chez l'Homme, 80% de la T3 circulante sont produits en dehors de la glande thyroïdienne, au niveau des cellules de l'organe cible, par la conversion de T4 en T3 (Larsen, 1975). Chez le rat, la proportion de la production périphérique de T3 est d'environ 20% (Chanoine et al, 1993). En effet, les tissus périphériques comme le foie et le rein (ou autres) sont capables de générer de la T3 à partir de la T4 cytosolique grâce aux DIOs (Dio1 et/ou Dio2) présentes. De la même manière, ils sont également capables de générer des métabolites inactifs des HTs (T2, rT3) s'ils expriment Dio1 et/ou Dio3. Si ces sélénocoenzymes (DIOs) sont capables au niveau tissulaire de catalyser la conversion de T4 en T3, c'est parce que des transporteurs membranaires tels que Mct8 et Mct10 (et autres) permettent l'entrée de ces hormones à travers la membrane (Dumitrescu et al, 2006; Friesema et al, 2003; Hinz et al, 2015; Krause & Hinz, 2017; Mayerl et al, 2018; Refetoff & Dumitrescu, 2007; Vickers et al, 2012). Du fait des propriétés hydrophobes des HTs, il a longtemps été cru qu'elles pouvaient diffuser librement à travers la membrane lipidique. Or l'influx d'hormones dépend de la disponibilité en « carriers » c'est à dire en transporteurs dans chaque tissu. Si l'entrée des HTs est directement influencée par des facteurs tels que la disponibilité en Na⁺ (système de pompes à énergie), la sortie des HTs hors de la cellule, elle, s'effectue passivement (Hennemann et al, 2001).

II. Les récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes

A. La superfamille des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires d'hormones (RN) sont une grande famille de récepteurs protéiques ayant des rôles dans de multiples processus biologiques (Weikum et al, 2018). Ils modulent l'action de régulateurs cellulaires tels que les hormones stéroïdes, les rétinoïdes et les hormones thyroïdiennes. En présence d'hormone, ces récepteurs agissent en tant que facteurs de transcription en activant ou en réprimant des gènes cibles. Certains membres de cette famille sont des récepteurs orphelins c'est à dire dont on ne connaît pas les ligands (Kininis & Kraus, 2008). Les récepteurs des HTs font partie d'un sous-groupe (sous-famille) de RNs qui sont régulés par une variété de molécules de signalisation lipophiles incluant les HTs, les acides gras, les acides biliaires et les stérols (Kininis & Kraus, 2008).

B. La structure des récepteurs nucléaires

Malgré la grande diversité des membres de cette superfamille (sept sous-familles) (Germain et al, 2006; Owen & Zelent, 2000) l'arrivée de nouvelles technologies de séquençage, il y a quelques d'années, a permis de révéler certaines homologies entre récepteurs. Chaque récepteur intracellulaire de cette famille, à part quelques exceptions, contient cinq domaines : A, B, C, D et E (exemple **figure 15**).

Le domaine A/B : c'est un domaine modulateur situé en N-terminal dont la taille varie énormément selon les récepteurs/isoformes de récepteurs et permettant la liaison de co-facteurs protéiques. Il contient la région qu'on nomme AF-1 pour « activation fonction 1 ». C'est également une région cible de nombreuses modifications post-traductionnelles influençant l'activité transcriptionnelle des gènes cibles (Anbalagan et al, 2012; Kumar & Thompson, 2003).

Le domaine C : c'est un domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA binding domain), un domaine ayant un haut degré d'homologie avec les autres membres de la famille (Danielsen, 2001). Il contient deux motifs structuraux en « doigts de zinc », motifs

« boucle » dans lesquels un ou plusieurs ions de zinc sont piégés et participent à leur stabilisation.

Le domaine D : c'est une région charnière (ou « hinge region ») qui fait le lien entre les domaines C et E (Pawlak et al, 2012). Dans cette région, il est possible de trouver un signal de localisation nucléaire (NLS, Nuclear localization signal) (Haelens et al, 2007; Ni et al, 2013).

Le domaine E : c'est un domaine de liaison aux ligands et à des co-facteurs protéiques qui permettent de moduler la réponse transcriptionnelle en aval. On y trouve la région AF-2 pour « activation function 2 ». Structurellement, ce domaine est composé d'hélices α et de feuillets β formant une niche, une/des poche(s) pour le(s) ligand(s) capté(s) (Souza et al, 2014). C'est la variabilité de séquences de cette région qui permet aux NRs de reconnaître une multitude de ligands (Weikum et al, 2018; Wurtz et al, 1996). Il a été démontré que la fixation du ligand permet de stabiliser cette région, composée principalement de résidus hydrophobes (Wurtz et al, 1996) et de faciliter l'accès à des co-facteurs (Darimont et al, 1998).

C. Cas des récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes

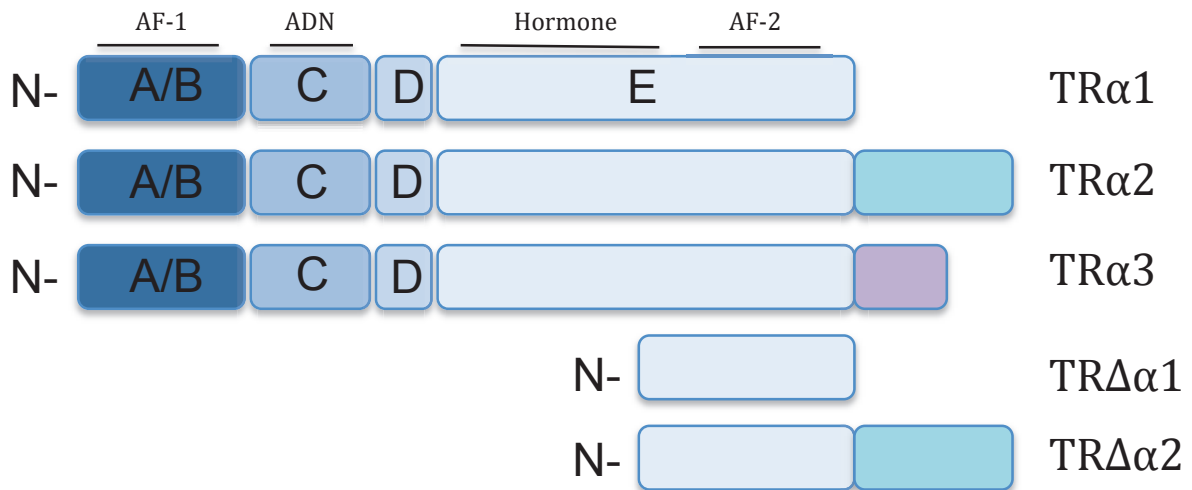
1. Généralités

Les récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes (TRs) (**figure 15**) sont présents dans de nombreux tissus parmi plusieurs espèces (souris, Homme, amphibiens, autres) (Pascual & Aranda, 2013). Dans les cellules, on dit généralement que les TRs impliqués dans la voie canonique des HTs sont situés, comme leur nom l'indique, dans le noyau. Dans ce contexte, les HTs lient directement leurs récepteurs dans le noyau pour qu'ils agissent comme des facteurs de transcription. Les TRs lient les HTs avec une très haute affinité ($K_d = 10^{-9}$ - 10^{-11} M). D'ailleurs, l'affinité des TRs pour la T3 est dix à quinze fois plus haute que pour la T4, c'est ce qui définit la T3 comme la forme active des HTs (Apriletti et al, 1981; Dhobale, 2017; Samuels et al, 1974).

Chez les rongeurs et chez l'Homme, deux gènes *THRA* et *THRB* codent pour TR α et TR β (**figure 15**). Le locus de *THRA* se situe sur le chromosome humain 17 et code pour les trois isoformes majeures TR α 1, TR α 2 et TR α 3 tandis que le locus de *THRB* se situe sur le chromosome 3 et code pour les trois isoformes majeures TR β 1, TR β 2 et TR β 3. Le rôle de TR α a une importance majeure dans certains organes tels que le cœur, le cerveau et l'intestin alors que TR β agit plutôt dans le foie, la rétine, l'oreille interne en développement et au niveau de l'axe hypothalamus-hypophyse (neurones à TRH, glande pituitaire) (Flamant & Samarut, 2003; Williams, 2000; Yen, 2001). Les différences de structure entre TR α 1 et TR α 2 ainsi qu'entre TR α 1 et TR α 3 se trouvent dans la région C-terminale de la protéine TR α (domaine de liaison au ligand) et ne permet ni à TR α 2, ni à TR α 3 de lier la T3 (Mitsushashi et al, 1988). Ces deux variants d'épissage agissent comme des dominants négatifs de TR α 1. Contrairement aux produits de *THRA*, TR β 1 et TR β 2 diffèrent structurellement en région N-terminale ; tous deux peuvent lier la T3. Il est important de préciser qu'il existe d'autres isoformes « super courtes » de TR α dont l'expression dépend du tissu étudié, ce sont les TR $\Delta\alpha$. Il existe deux isoformes courtes tronquées : TR $\Delta\alpha$ 1, TR $\Delta\alpha$ 2 (Plateroti et al, 2001). Alors que les isoformes TR $\Delta\alpha$ 1 et TR $\Delta\alpha$ 2 possèdent un domaine de liaison au ligand mais pas de domaine de liaison à l'ADN. La caractéristique commune de ces deux isoformes courtes c'est qu'elles ne possèdent pas de domaine de localisation nucléaire. Concernant TR β , il existe également une isoforme courte, TR $\Delta\beta$ 3, ne possédant ni de domaine de liaison à l'ADN, ni de domaine de liaison au ligand, ni de domaine de localisation nucléaire. C'est le système d'épissage alternatif de la cellule, l'utilisation de différents promoteurs et l'utilisation de divers sites d'initiation de la traduction qui permettent de produire les différentes isoformes codées par *THRA* et *THRB* (Cheng, 2000; Flamant & Samarut, 2003; Kress et al, 2009b; Sirakov et al, 2014; Yen et al, 2006). À noter que les isoformes TR β 3 et TR $\Delta\beta$ 3 ne sont retrouvées que chez le rat dans le foie, le rein, le poumon (TR β 3) et les muscles squelettiques, le cœur, la rate, le cerveau (TR $\Delta\beta$ 3) (Williams, 2000). Les isoformes TR $\Delta\alpha$ 1, TR $\Delta\alpha$ 2 sont par exemple transcrites à partir d'un promoteur interne situé dans l'intron 7 de *THRA*. De façon intéressante, les protéines TR Δ agissent comme des antagonistes de TR α 1 et TR β 1 puisqu'elles sont capables de lier la T3 alors que leur domaine de liaison à l'ADN est altéré. En effet, c'est l'utilisation comparée de souris transgéniques TR $\alpha^{-/-}$ (où les isoformes TR α 1 et TR α 2 sont absentes mais où TR $\Delta\alpha$ 1 et TR $\Delta\alpha$ 2 demeurent) (Fraichard et al, 1997) et de souris TR $\alpha^{0/0}$ (altération totale de *THRA*) (Gauthier et al, 2001) qui a permis de révéler l'importance de ces formes

tronquées de récepteurs. Les animaux $TR\alpha^{-/-}$ meurent quelques semaines après la naissance tandis que les $TR\alpha^{0/0}$ sont viables. À l'inverse, la seule suppression des isoformes $TR\Delta\alpha$ entraîne l'augmentation de la sensibilité aux variations d'HTs. Cependant, ce mécanisme d'action antagoniste des isoformes courtes reste mal connu (Chassande et al, 1997; Fraichard et al, 1997; Gauthier et al, 2001; Plateroti et al, 2001).

Isoformes de TR α



Isoformes de TR β

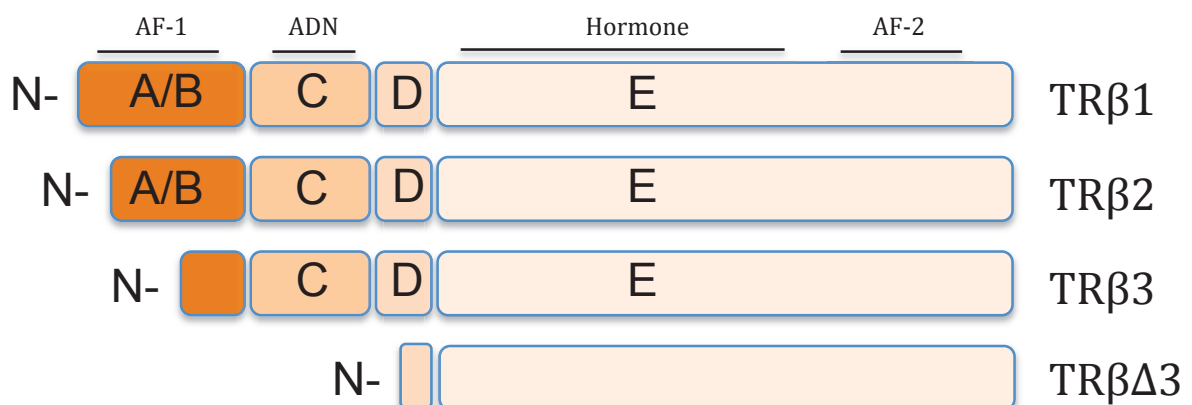


Figure 15 : Les récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes (TRs). Cette figure schématise la structure de toutes les isoformes des récepteurs nucléaires TRs retrouvés chez les mammifères. Sont représentés sur cette image les différents domaines et la spécificité de chacune des isoformes des TRs. AF = domaine d'activation et de fonction, Hormone = domaine de liaison à l'hormone, ADN = domaine de liaison à l'ADN, N- = N-terminal.

2. Modes d'action des TRs

a) Les séquences régulatrices

Lorsque le ligand fixe le TR, c'est pour agir au niveau de régions régulatrices de l'ADN qui permettent de moduler l'expression de gènes (**figure 16**). Dans ces régions régulatrices, on trouve des séquences spécifiques qui sont reconnues par les TRs qu'on appelle TH Response Elements (TRE) (Yen, 2001). Ces séquences reconnues par les TRs sont des séquences nucléotidiques hexamériques répétées (consensus A/G-GGT-C/G-A). Le consensus seul « A/G-GGT-C/G-A » forme ce qu'on appelle un demi-site et c'est l'assemblage de plusieurs demi-sites comme celui-ci qui formera un TRE. L'organisation de ces demi-sites est très variée puisqu'ils peuvent s'organiser en palindromes (= ordre des « lettres » identique lorsqu'on lit de gauche à droite ou de droite à gauche), en palindromes inversés et être plus ou moins espacés les uns des autres par d'autres nucléotides « N ». Dans le cas des TRs, les récepteurs reconnaissent de manière optimale des palindromes « parfaits » (Palindrome, P), des palindromes inversés espacés de six nucléotides (Inverted Palindrome 6, IP6) et des demi-sites répétés séparés de quatre nucléotides (Direct repeat 4, DR4). Parmi tous les motifs reconnus (DR5, DR6, IP, autres), ceux décrits comme les plus « communs » sont les DR4 (Chatonnet et al, 2013). C'est l'analyse génomique de l'occupation de la chromatine qui a permis de le confirmer notamment au travers de l'interaction prédominante TRs/RXR/DR4 (Chatonnet et al, 2012; Grontved et al, 2015; Ramadoss et al, 2014). Le caractère polaire 5'-3' des DRs (orientation dans la séquence nucléotidique) pourrait participer à l'orientation dans laquelle se fixent les récepteurs pour initier la transcription. De manière intéressante, il a été démontré que les TRs sont capables de réguler l'expression de gènes alors qu'ils sont liés à l'ADN dans des régions régulatrices situées à des dizaines de kilobases des gènes en question. La régulation de tels gènes implique l'interaction physique entre les facteurs protéiques à distance et la machinerie transcriptionnelle localisée au niveau du site de départ de la transcription *via* la formation de boucles d'ADN permettant le rapprochement de ces complexes protéiques (Fullwood et al, 2009; Grimaldi et al, 2013).

b) La dimérisation des récepteurs

Alors que les TRs possèdent leur propre domaine de liaison à l'ADN, ils agissent principalement en hétérodimères avec les récepteurs de l'acide rétinoïque (RXR, Retinoic acid x receptor) au niveau de l'ADN (Brent, 2012; Kurokawa et al, 1993; Lee & Privalsky, 2005; Naar et al, 1991; Yen, 2001; Yen et al, 1992). Il a également été démontré qu'ils sont capables d'hétérodimériser avec d'autres protéines tels que les LXRs (Liver X receptor) (Hashimoto et al, 2006) et PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors) (Liu et al, 2007). Ces protéines font également partie de la grande famille des récepteurs nucléaires d'hormones. Même si cette conformation de récepteur (TR-RXR) est une forme privilégiée, les TRs peuvent aussi agir en tant que monomères ou en tant qu'homodimères. L'hétérodimérisation est possible *via* la présence de sites spécifiques de dimérisation au-dessus et dans le premier doigt de zinc du DBD (domaine C) ainsi que dans une sous-région distale du deuxième doigt de zinc du même domaine (Yen, 2001). La région N-terminale des TRs a été montrée comme cruciale dans la formation de ces hétérodimères. En effet, des mutations induites dans cette région semblent conduire préférentiellement à la formation d'homodimères TR α 1-TR α 1 tandis que la région N-terminale endogène semble inhiber allostériquement la formation d'homodimères et permettre l'hétérodimérisation de TR α 1 avec RXR, en présence ou en absence de ligand (Hollenberg et al, 1995b). La formation de ces hétérodimères TR-RXR ne permet pas d'exclure la possibilité que ces complexes puissent répondre différemment en fonction des isoformes de récepteurs présentes dans le complexe mais également en fonction de la présence ou de l'absence de leur ligand (T3 et 9-cis-acide rétinoïque, respectivement) dans la cellule. Dans ce sens, il a par exemple été montré que la présence de ces ligands affecte la stabilité de liaison des hétérodimères sur les TRE. Cela affecte également le recrutement de facteurs protéiques co-activateurs ou co-répresseurs qui permettent de favoriser ou de bloquer la transcription de gènes cibles (Lee & Privalsky, 2005; Yen et al, 1992) (**figure 16**).

c) Liaisons à des co-facteurs

De manière générale, sans ligand les complexes de récepteurs TRs sont fixés aux TRE situés dans le promoteur de gènes. La situation la plus décrite est la suivante : des co-répresseurs protéiques interagissent avec les TRs de manière à inhiber la

transcription de ces gènes « normalement » positivement régulés (Vella & Hollenberg, 2017; Zhang et al, 1991) (**figure 16**). Néanmoins, il existe des situations où les TRs sont capables de réguler négativement des gènes en présence de T3, alors que le frein est levé en l'absence de ligand (Flamant et al, 2017). C'est par exemple le cas des gènes qui codent pour la TSH et la TRH, régulés par TR β 1 et TR β 2 (Abel et al, 2001; Burnside et al, 1989; Darling et al, 1989; Dupre et al, 2004; Hollenberg et al, 1995a; Wondisford et al, 1989). Prenons le cas de la TRH, en cas d'excès d'hormone thyroïdienne dans le sang, les cellules neuronales de l'hypothalamus sont capables de réguler négativement la transcription du gène de la TRH ce qui permet de limiter la stimulation de TSH et en conséquence la production d'HTs par la glande thyroïde. Parmi les co-effecteurs liant les récepteurs nucléaires, les plus caractérisés sont les protéines co-inhibitrices NCoR (Astapova et al, 2011; Chen & Evans, 1995), SMRT (Berghagen et al, 2002; Lee et al, 1995; Sande & Privalsky, 1996) et les protéines co-activatrices SCRs (Onate et al, 1995). Plus de trois cent co-effecteurs de ce type ont été décrits jusqu'à aujourd'hui (Astapova, 2016). Ces protéines, vue leur fonction, possèdent des domaines d'interaction protéique et des domaines dits de répression mais ne possèdent pas de domaine de liaison directe à l'ADN. Elles lient donc l'ADN *via* les interactions qu'elles établissent avec les récepteurs nucléaires. La région charnière des TRs (domaine D) a été montrée comme déterminante dans l'interaction avec ces co-facteurs (Hu & Lazar, 1999; Safer et al, 1998). Dans le cas d'un gène réprimé par les TRs, en situation basale (sans T3), les co-répresseurs sont recrutés au niveau des TRs et permettent l'interaction avec des enzymes qui participent au verrouillage de la chromatine telles que les HDACs (Histones déacétylases) (Astapova, 2016; Oberoi et al, 2011; Vella & Hollenberg, 2017). La présence du ligand à son récepteur permet un changement de conformation menant à l'éjection des co-répresseurs et le recrutement de co-activateurs. Ainsi, de manière opposée, le complexe ainsi formé permet le recrutement d'enzymes qui participent à l'ouverture de la chromatine et donc à l'initiation de la transcription du gène ciblé. Les HATs (histones acétylases) sont un exemple d'enzymes impliquées dans ce phénomène (Glass & Rosenfeld, 2000; Struhl, 1998).

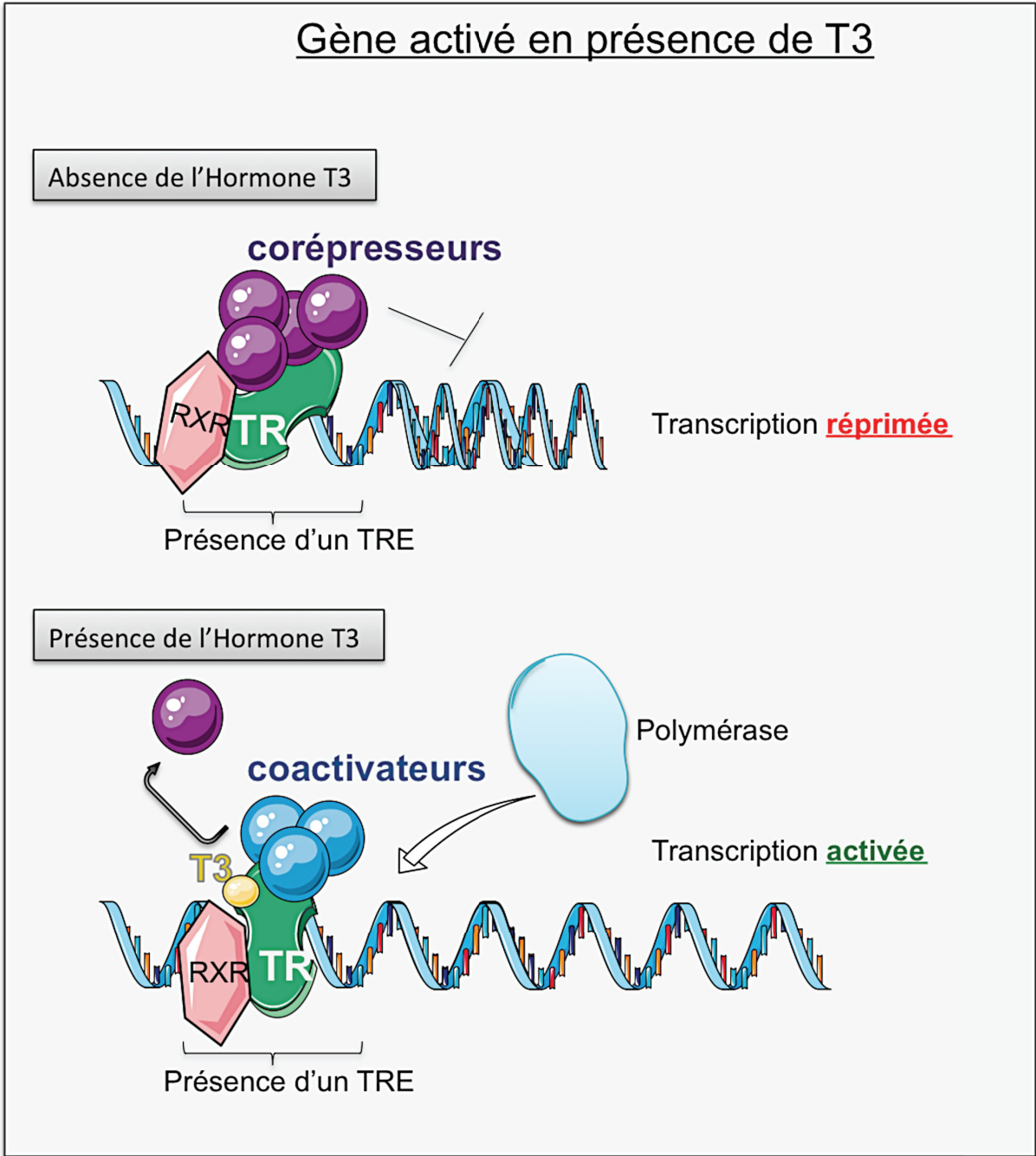


Figure 16 : Mode d'action des récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes (TRs). Cette figure schématise comment les TRs interagissent avec l'ADN et les protéines pour activer ou réprimer des gènes cibles. Ici est représenté un gène activé en présence d'HTs. À savoir que l'inverse existe : des gènes activement réprimés en présence d'HTs. En l'absence de ligand T3, les dimères TR/RXR lient les TRE disponibles, recrutent des co-répresseurs protéiques qui contribuent à réprimer la transcription des gènes cibles. En présence de T3 lié au TR, le TR change de conformation et le complexe TR/RXR libère les co-répresseurs et recrute des co-activateurs qui contribuent à l'activation de la transcription des gènes cibles.

III. Intestin et hormones thyroïdiennes

Dans ce qui va suivre, j'ai décidé de me focaliser sur l'impact des HTs sur le développement et le maintien de l'homéostasie tissulaire chez les vertébrés en prenant l'exemple des amphibiens, des rongeurs et de l'Homme. Le but de ce chapitre est d'arriver progressivement à comprendre l'intérêt de l'étude de ces hormones dans l'épithélium intestinal murin.

A. Intervention des hormones thyroïdiennes lors de la métamorphose chez *Xenopus laevis*

1. Induction de la métamorphose

À l'instar de l'ecdysone lors de la métamorphose chez les insectes et donc lors la transition de la forme larvaire à la forme adulte (ex : drosophile) (Yamanaka et al, 2013), l'hormone thyroïdienne est l'hormone la plus importante chez la grenouille (Sachs & Buchholz, 2019). En effet, la métamorphose chez les amphibiens est un phénomène majeur qui conduit à des changements drastiques physiologiques et morphologiques. C'est une étape développementale de transition faisant intervenir des processus de remaniements tissulaires majeurs (apoptose, différenciation, autres) qui ne peut survenir en l'absence des hormones inductrices de la métamorphose telles que sont les HTs (Furrow & Neff, 2006; Sachs & Buchholz, 2019) (**figure 17**). En revanche, les HTs ne sont pas les seules hormones à intervenir dans la métamorphose chez les amphibiens car d'autres hormones telles que les glucocorticoïdes ou la prolactine (et autres) influencent ce phénomène biologique (Fowden & Forhead, 2013). Par conséquent l'utilisation des HTs est un des moyens utilisés pour induire la métamorphose, notamment chez *Xenopus Laevis*. Le protocole expérimental d'induction de la métamorphose chez cet amphibien est aussi fascinant qu'intrigant. En effet, l'addition seule de T3, dans le milieu aqueux où nage le têtard, est suffisante pour enclencher tout le processus de transformation larvaire (Shi & Ishizuya-Oka, 1996). Dès cet instant les HTs permettent la mise en place de programmes génétiques qui vont varier suivant les organes ciblés (Shi, 1994). C'est ainsi qu'ils conduisent à la réduction et la perte de la queue, l'apparition des membres antérieurs et postérieurs et au remodelage de l'intestin

(Tata, 1993). L'addition d'HTs dans le milieu aqueux permet de mimer un pic d'HTs naturel qui survient chez le juvénile pour déclencher la métamorphose.

2. L'avantage du modèle amphibien par rapport aux mammifères

L'amphibien est un vertébré qui s'élève en animalerie de manière relativement « simple » et dont la croissance s'effectue *ex utero*, depuis l'œuf jusqu'à la forme adulte. Du fait de sa « maniabilité » et de sa relative proximité (développementale) avec les autres vertébrés, il constitue un modèle de choix pour les études sur le développement de l'embryon et des organes chez le juvénile lors de la métamorphose. De plus, contrairement aux rongeurs et à l'Homme, le cas particulier de l'amphibien est très avantageux pour l'étude de l'impact de la voie des HTs sur l'organisme. En effet, cet organisme dépend des HTs pour se développer. Mais, alors que les embryons murins et humains sont relativement influencés par le niveau d'hormones thyroïdiennes maternelles circulantes (Abe et al, 2003), le têtard, lui, n'est sous l'influence des HTs qu'à partir de la période de « feeding ». En conséquence, l'étude des TRs, en présence ou en absence de leurs ligands (naturels ou artificiels), est plus aisée car elle ne comporte ni de biais liés aux hormones apportées au fœtus *via* le placenta, ni aux changements physiologiques survenus chez la mère lors d'altérations de la voie des HTs (ex : souris transgéniques présentant une déficience congénitale chez la mère et le fœtus) (Sachs & Buchholz, 2017).

3. Récepteurs des hormones thyroïdiennes et métamorphose

La métamorphose induite par les HTs chez les amphibiens est initiée et contrôlée par les TRs (Buchholz et al, 2006; Wang et al, 2008). Chez ces vertébrés les TRs sont ubiquitaires. À la manière de ce que j'ai décrit en amont chez les rongeurs et chez les humains, les TRs sont représentés par deux isoformes majeures : TR α et TR β (Yaoita et al, 1990). Il est important de préciser que, chez ces vertébrés, contrairement aux rongeurs et aux humains, il existe des mécanismes de transrégulation des TRs. En effet TR α régule négativement TR β en l'absence d'HTs. À l'inverse, il permet l'expression

séquentielle de TR β lors d'une augmentation du taux d'HTs. TR β , lui, s'autorégule positivement en présence d'HTs (Machuca et al, 1995). Alors que le têtard se développe, TR α s'exprime très précocement. En effet, TR α est présent dans l'organisme avant même que le têtard puisse se nourrir de manière autonome (« feeding », stade 45 du développement) (Schreiber, 2017; Wang et al, 2008) et donc avant l'initiation de la production d'HTs. Dans ce contexte, TR α exerce tout de même son rôle de facteur de transcription en occupant les TRE (de gènes induits par les HTs) en l'absence de ligand (Wen & Shi, 2015). Les premières HTs détectées dans la circulation surviennent trois semaines « post-feeding » (stades 54-58 du développement). Au stade de pré-métamorphose, TR β est pratiquement indétectable chez le têtard (Yaoita & Brown, 1990). Dans les différents tissus, le niveau d'expression de TR α et de TR β est directement corrélé au niveau d'HTs *in vivo* et *in vitro* (Eliceiri & Brown, 1994; Kanamori & Brown, 1992; Yaoita & Brown, 1990). D'ailleurs, alors qu'un pic d'HTs survient au stade dit de « pro-métamorphose » (stades 54-58 du développement) le niveau d'expression de TR α et de TR β augmente. L'augmentation de l'expression de TR β est dix fois plus conséquente que celle de TR α au même stade (Yaoita & Brown, 1990), dû au fait que TR β est autorégulé par les TRs (Machuca et al, 1995). L'induction de l'expression des TRs est nécessaire au bon développement de l'organisme. Alors que TR α influence fortement le développement des membres, le développement de l'intestin est médié à la fois par TR α et TR β (Cai & Brown, 2004; Fairclough & Tata, 1997; Wang et al, 2008). L'utilisation d'animaux transgéniques tels que les têtards TR α -KO a permis de montrer que la perte de TR α impacte le développement de ces organes. En effet, l'absence de TR α dans les membres est suffisante pour lever un mécanisme de répression permettant aux membres de se développer plus rapidement que chez des têtards sauvages et ce, même en l'absence d'HTs. À l'inverse, dans l'intestin, en l'absence de TR α , le développement de l'organe est retardé en condition normale et complètement stoppé en l'absence contrôlée d'HTs (Buchholz & Shi, 2018).

Le niveau d'expression des TRs dépend du tissu et du stade de développement qu'on étudie. Il est crucial puisqu'il influence directement le déroulement de la métamorphose à la fois au niveau moléculaire et tissulaire (Choi et al, 2017; Choi et al, 2015).

4. Remodelage de l'intestin et cellules souches

Le remodelage de l'intestin est très important lors du passage à la forme adulte car il permet de s'adapter aux changements nutritionnels, et de manière générale aux changements environnementaux de l'organisme (**figure 17**). À cette étape de la vie post-embryonnaire, l'amphibien change de nourriture et de milieu. En effet, le têtard est un herbivore aquatique alors que la grenouille, elle, est terrestre et se nourrit de proies vivantes (Ishizuya-Oka & Shi, 2005). Successivement à la survenue du pic d'HTs, que j'ai décrit dans le paragraphe précédent, la majorité des cellules « intestino-épithéliales » de la larve, formant un mono-feuillet cellulaire sans replis, meurent par apoptose tandis que les cellules du typhlosole (tissu intestinal post-embryonnaire) au contact du mésenchyme se dédifférencient en cellules épithéliales adultes (stades 58-62 du développement) (Ishizuya-Oka & Ueda, 1996; Shi & Ishizuya-Oka, 2001). En effet, alors que l'intestin du juvénile se raccourci brusquement, au moment de l'augmentation du taux d'HT plasmatique (Schreiber et al, 2005), les cellules survivantes qui se dédifférencient progressivement acquièrent des caractéristiques de cellules souches et expriment certains marqueurs qu'on retrouve également exprimés dans les cellules souches et progéniteurs intestinaux adultes des mammifères (*Lgr5*, *Msi1*, autres) (Ishizuya-Oka et al, 2003; Sun et al, 2010). C'est l'utilisation de systèmes rapporteurs exprimés de façon ubiquitaire dans des têtards transgéniques (GFP) qui a permis d'identifier l'origine exacte des cellules dédifférenciées en cellules souches adultes (Ishizuya-Oka et al, 2009) (**figure 17**). Pour ce faire, les chercheurs ont utilisé une approche « combinatoire » *ex vivo*, en présence d'HTs. L'épithélium intestinal de têtards [GFP+] et de têtards [GFP-] a d'abord été dissocié de son mésenchyme respectif (exprimant ou non la GFP). Puis, les chercheurs ont remis en culture ces épithélia (GFP+ ou GFP-) en présence des cellules mésenchymateuses [GFP+] ou [GFP-] (= culture cellulaire croisée). Le résultat a été le suivant : les cellules épithéliales adultes générées sont [GFP+] dès lors que l'épithélium provient d'animaux transgéniques [GFP+]. Elles sont [GFP-] lorsque l'épithélium utilisé provient d'animaux [GFP-], et ce, en présence de tissus environnants [GFP+] ou [GFP-]. À l'origine, les cellules souches épithéliales adultes proviennent donc des cellules épithéliales du typhlosole et non du stroma. On dit que ces cellules du typhlosole se dédifférencient car, au départ, ces cellules sont partiellement différenciées et n'expriment encore aucun des marqueurs souches cités précédemment (Ishizuya-Oka et al, 2009).

De la même manière que chez les mammifères, le maintien de l'homéostasie intestinale semble être le résultat d'interactions complexes entre les différents tissus qui composent l'intestin. En effet, le tissu mésenchymateux est un acteur majeur dans la régulation de la biologie intestinale des amphibiens (Ishizuya-Oka et al, 2006; Ishizuya-Oka & Shimozawa, 1992). Des chercheurs ont montré que, même si les cellules souches sont originaires de l'EI du typhlosole, les cellules du mésenchyme sont essentielles pour la dédifférenciation complète des cellules épithéliales juvéniles en cellules souches adultes. En présence d'HTs, de nombreux changements morphologiques prennent place dans le mésenchyme, des changements qui influencent le développement de l'EI adulte chez les amphibiens. Sans mésenchyme, la culture de l'épithélium intestinal juvénile en présence d'HTs ne permet pas l'apparition de cellules souches adultes exprimant les marqueurs cités précédemment. De plus, au travers de l'implication de grandes voies moléculaires, la communication entre mésenchyme et épithélium nous rappelle ce que j'ai décrit dans la première partie de cette thèse. En effet, elle fait intervenir des facteurs participant à la constitution de la niche des cellules souches de mammifères, notamment des ligands Shh et BMPs (Ishizuya-Oka, 2017; Ishizuya-Oka et al, 2006). En réponse aux HTs, l'épithélium initie sa maturation et les cellules souches/progénitrices nouvellement générées expriment Shh, gène positivement régulé par les HTs (Stolow & Shi, 1995). En réponse à ce signal paracrine (Shh), le tissu mésenchymateux environnant prolifère et exprime BMP4 (Ingham, 1998; Ishizuya-Oka et al, 2006; Perrimon, 1995). Dès lors, en réponse à BMP4, le mésenchyme stoppe sa prolifération et permet la différenciation des cellules épithéliales adultes sans inhiber la prolifération des cellules souches.

L'autorenouvellement des cellules souches générées permet la reconstitution d'un système biologique homéostatique similaire à celui observé chez les mammifères (Cheng & Bjerknes, 1985). C'est cette proximité avec les mammifères qui fait de ce modèle un atout pour l'étude des mécanismes de régulation de la biologie des cellules souches intestinales.

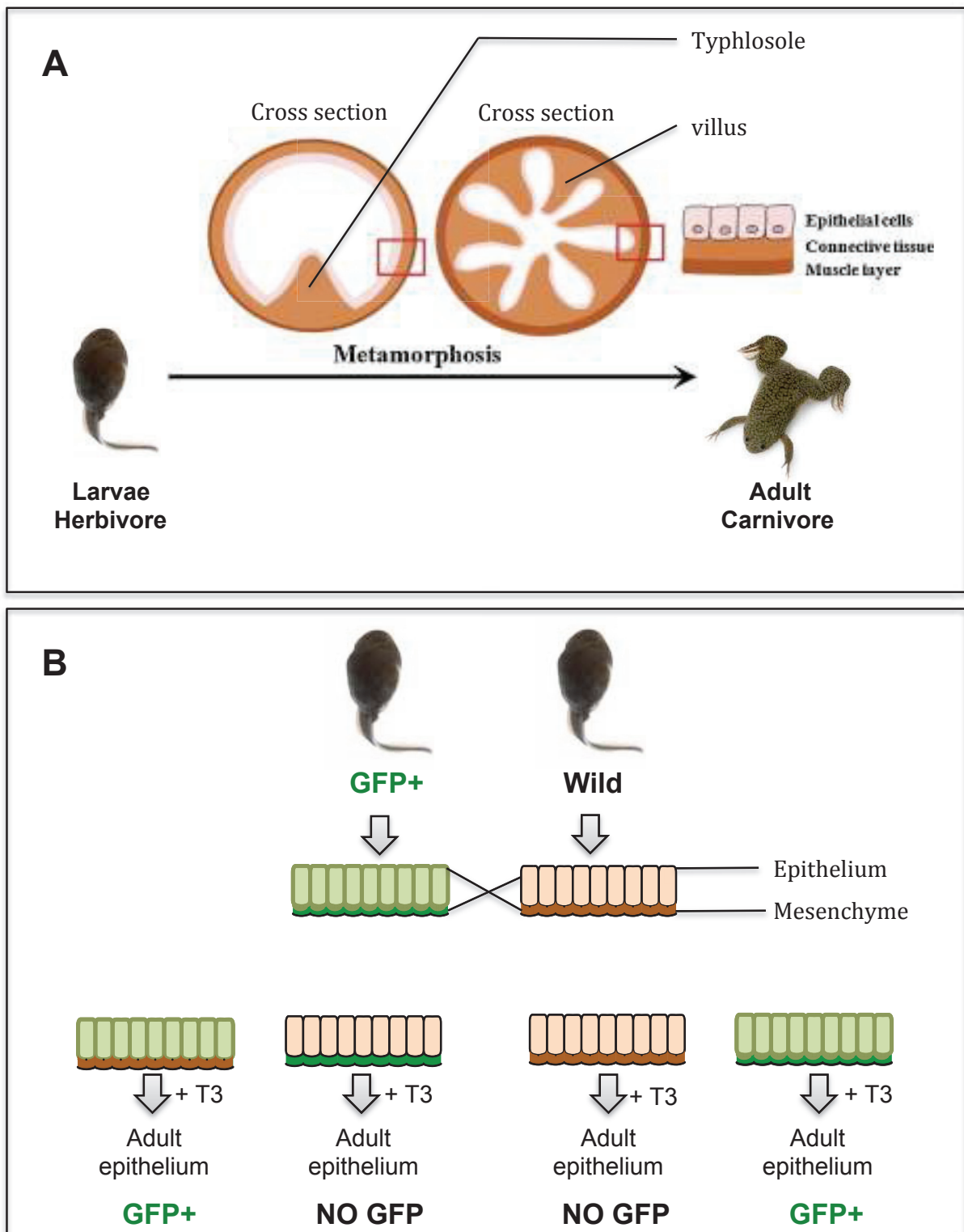


Figure 17 : Métamorphose chez les amphibiens et remodelage de l'intestin. A/ Cette figure schématise le remodelage de l'intestin lors d'un pic naturel d'HTs chez le têtard. La métamorphose induite par ce bouleversement hormonal implique l'apoptose massive des cellules épithéliales larvaires et l'apparition des villosités pourvues de cellules adultes. B/ Cas de l'expérience de co-culture artificielle d'épithélium et de tissus environnants de têtards [GFP+] et [GFP-]. Après avoir mélangé les tissus de manière combinatoire, des HTs sont ajoutées dans le milieu de culture pour induire la métamorphose. La présence de GFP dans l'EI adulte est ensuite recherchée. La GFP n'apparaît qu'en cas de culture d'épithélium larvaire [GFP+]. En conclusion, les cellules souches sont originaires de l'épithélium larvaire uniquement et non des tissus environnants. Image du haut, tirée et adaptée de la littérature (Kress et al, 2009b).

B. Les hormones thyroïdiennes chez les mammifères

1. Hormones thyroïdiennes et développement

Les embryons de souris et d'humains sont sous l'influence des HTs maternelles. Si les hormones de la mère sont importantes, c'est parce qu'elles interviennent, par exemple, dans le développement et la maturation du cerveau (Moog et al, 2017). Alors que la fonction thyroïde du fœtus débute après seize à vingt semaines de gestation chez l'humain (de Escobar et al, 2004; Forhead & Fowden, 2014; Obregon et al, 2007; Williams, 2008), on détecte déjà des niveaux d'HTs élevés ainsi que la présence de TRs dans le cerveau (Chan et al, 2002; Kester et al, 2004). Ceci est directement lié au transport actif des HTs maternelles à travers le placenta (Chan et al, 2006; Loubiere et al, 2012). Si une déficience en HTs survient pendant le développement du fœtus, elle peut entraver certains phénomènes cellulaires ayant un impact majeur (neurogénèse : différenciation, prolifération et migration) (Stenzel & Huttner, 2013) sur la mise en place du système nerveux, tant au niveau morphologique que fonctionnel (Moog et al, 2017). En conséquence, une déficience profonde en HTs pendant le développement fœtal entraîne des dommages irréversibles chez le nouveau-né : retard de croissance, défauts visuels, défauts de motricité, crétinisme (autres) (de Escobar et al, 2004; Gilbert et al, 2012). Si la déficience intervient après la naissance les dommages sont moins sévères puisque le nouveau-né présente principalement des troubles du langage et de la mémoire (Zoeller & Rovet, 2004). À noter que le cerveau humain est plus sensible aux variations d'HTs que le cerveau de rongeurs. En effet, alors que les patients atteints de mutations dans le gène qui code pour le transporteur *Mct8* souffrent d'un retard psychomoteur sévère similaire à celui des patients hypothyroïdiens, les rongeurs *Mct8* déficients ne présentent pas des symptômes neurologiques aussi sévères (Grijota-Martinez et al, 2011; Horn & Heuer, 2010).

Lors d'une déficience en HTs qui provient d'un défaut congénital (qui ne survient que chez le fœtus) les défauts sur la croissance intra-utérine sont moins prononcés que quand l'hypothyroïdisme chez le fœtus est combiné à l'hypothyroïdisme maternel. Dans ces conditions, l'impact sur le développement est très sévère. Ceci suggère que les HTs maternelles compensent la déficience fœtale et démontre que le cerveau peut être protégé en l'absence de production d'HTs fœtales (de Zegher et al, 1995; Stenzel &

Huttner, 2013; Yasuda et al, 1999). D'ailleurs, l'hypothyroïdisme congénital n'entraîne pas de sévère défaut de développement s'il est détecté à temps et traité à la thyroxine dès la naissance. Ainsi, le nouveau-né se développe normalement en termes de condition physique et de développement intellectuel (Ares et al, 2005; Berbel et al, 2009; Moleti et al, 2008; Moleti et al, 2009).

De la même manière que pour le cerveau, les HTs interviennent dans le développement d'autres tissus chez le fœtus et le nouveau-né. Dans le cas des troubles moteurs liés aux altérations de niveau d'HTs, une partie des symptômes est due à l'altération des muscles (Lee et al, 2014; Salvatore et al, 2014). Les progéniteurs cellulaires à l'initiation de la formation des cellules musculaires matures ont besoin de signaux pour se différencier. On les appelle facteurs de différenciation myogénique (FDMs). Les HTs stimulent l'expression de FDMs tels que MyoD1 (Downes et al, 1993; Muscat et al, 1995; Muscat et al, 1994) et permettent aux fibres musculaires d'augmenter leur taille et leur diamètre (Sugie & Verity, 1985). De ce fait, une déficience de la voie des HTs (TRs et/ou HTs) altère le bon développement des fibres musculaires. De plus, au niveau moléculaire, les HTs interviennent dans la maturation des isoformes de la myosine, passant de leur forme néonatale à leur forme adulte. Un déficit d'HTs induit la persistance de leur forme embryonnaire chez le rat (Butler-Browne et al, 1984) tandis qu'un excès d'HTs conduit précocement à leur maturation dans les muscles squelettiques chez l'Homme (Butler-Browne et al, 1990).

Même si j'ai évoqué le rôle des HTs chez le fœtus durant la grossesse, leur rôle s'étend bien au-delà de cette période. En effet, les HTs interviennent tout au long de la vie d'un individu. Chez l'adolescent, par exemple, l'hypothyroïdie est responsable d'un « ralentissement général » et de l'apparition d'une fatigue exacerbée. Les symptômes peuvent varier en fonction de l'âge et du sexe des individus. De manière générale, elle est responsable de retards de croissance des os et des dents, de troubles de l'attention, du retard de la puberté, de la prise de poids et de la perte de cheveux et autres symptômes tels que la constipation, l'apparition de crampes musculaires, troubles de la mémoire (Chaker et al, 2017).

À l'inverse du faible taux d'HTs durant le développement, l'hyperthyroïdie néonatale est un phénomène rare et grave, souvent décrit dans le contexte d'une

maladie de Basedow maternelle (maladie auto-immune de la thyroïde) qui touche environ 0,05% à 0,2% des femmes enceintes (Nguyen et al, 2018). Seulement 1% des nouveaux nés issus de ces grossesses à problèmes sont hyperthyroïdiens. L'avortement spontané, la mort du fœtus, une restriction de croissance sont observés chez les fœtus dont les mères ne sont pas traitées dans la seconde moitié de leur grossesse (Kurtoglu & Ozdemir, 2017). Les problèmes chez ces fœtus incluent la tachycardie, l'arrêt cardiaque, l'accélération de l'âge des os, la craniosynostose (déformation crânienne) et les microencéphalies (Segni et al, 1999). Il est possible de bloquer ces symptômes en utilisant des molécules (PTU pour propylthiouracile et méthimazole) qui vont contribuer à la diminution de la synthèse des HTs en inhibant l'utilisation d'iode dans la glande thyroïdienne et la production d'anticorps immunosuppresseurs reconnaissant le récepteur de la TSH (TSHR).

2. Hormones thyroïdiennes et développement de l'intestin

La maturation des organes se fait souvent en deux étapes chez les vertébrés. D'abord, il y a formation d'un organe fonctionnel mais immature issu de l'embryogénèse puis formation d'un organe mature durant le développement post-embryonnaire.

Chez l'Homme et les rongeurs, ce changement prend place autour de la naissance alors que le taux d'HTs plasmatiques est élevé (Tata, 1993). D'ailleurs, chez l'homme, à la fois chez les garçons et les filles, le taux d'hormones thyroïdiennes (T4, T3) est élevé à la naissance mais décroît proportionnellement avec l'âge (Lem et al, 2012). À la naissance, les nourrissons présentent un épithélium formé de petites cryptes et de villosités (Walker-Smith, 1969). Pendant la première année, la croissance de l'EI se fait par fission de cryptes, c'est à dire un phénomène de duplication de cryptes où une crypte mère donne naissance à deux cryptes filles (Cummins et al, 2008). À noter que, le taux de cellules en mitose dans les cryptes est 31% plus élevé chez les nouveaux nés que chez les adultes (Cummins & Thompson, 2002).

Chez les rongeurs, vingt et un jours après la naissance, les souriceaux entrent en période de sevrage. À cette période de la vie, le taux d'HTs circulantes augmente rapidement (Hadj-Sahraoui et al, 2000). Ainsi l'intestin se remodèle et permet aux

nouveaux nés de stopper l'allaitement maternel et d'opter pour de la nourriture solide (Henning, 1994). Comme pour les amphibiens, ceci est permis puisque l'intestin s'adapte pour permettre cette transition alimentaire (absorption des nutriments, digestion ; activités sucrase et lactase augmentées et diminuées respectivement) (Henning, 1979). Dans l'EI intestinal de souris, les villosités sont formées durant les trois premières semaines de la vie et le processus s'arrête après quatre semaines. De plus, la taille moyenne des villosités atteint un plateau après quatre semaines tandis que leur largeur continue de croître avec l'âge. Au départ les villosités sont donc fines et petites puis finissent par être plus hautes et plus larges. Concernant les cryptes de Lieberkhün, de la même manière que chez les humains, la fission de cryptes (décrite comme « branching crypts » par Cheng & Bjerknes) est un phénomène qui intervient également dans les premières semaines de vie du souriceau. De ce fait, à cette période, le nombre de cryptes intestinales augmente (Cheng & Bjerknes, 1985). Concernant la mise en place des cellules souches, les cellules Lgr5+ sont générées pendant l'embryogénèse à partir de E18.5 jusqu'à D7 (sept jours post naissance) pendant la mise en place des cryptes intestinales (Barker, 2014). Les mécanismes de génération de ces cellules restent à éclaircir.

3. Voie des TRs et intestin

L'utilisation d'animaux génétiquement modifiés a permis de mettre en lumière, dans l'intestin, certains mécanismes dans lesquels la voie des HTs/TRs intervient. Dans le paragraphe qui suit, je cite seulement quelques exemples de ces modèles murins mais la liste n'est pas exhaustive. Pour plus de détails, certains autres de ces modèles sont illustrés dans la revue jointe à ce manuscrit.

Pour leurs études, les chercheurs se sont basés sur les troubles causés par les désordres liés aux HTs chez les patients et les ont transposés chez la souris. Comme on a pu le voir, l'impact des HTs varie selon certains paramètres tels que : 1) l'impact de l'axe hypothalamus-hypophyse sur la production des HTs, 2) la production d'HTs par la glande thyroïdienne, 3) le transport des HTs et 4) le mécanisme d'action des HTs au niveau des tissus cibles. Ainsi, les spécialistes ont vu apparaître certains modèles transgéniques dont le but est d'altérer une ou plusieurs de ces étapes clés. Dans le modèle *Pax8*^{-/-} (Mansouri et al, 1998), les souris présentent un phénotype de

désorganisation sévère des follicules thyroïdiens conduisant à l'altération de la production d'HTs par la glande thyroïdienne. L'impact est tel qu'elles meurent dès les premières semaines après la naissance si on ne leur injecte pas d'HTs (T4/T3) quotidiennement (Flamant et al, 2002). En effet, de manière générale les souris présentent de nombreux défauts (ossification, minéralisation, hypotrophie de la rate, atrophie de la glande thyroïde) parmi lesquels l'EI est sévèrement impacté. Ce dernier devient vacuolaire et la fraction de cellules prolifératives ne représente en moyenne qu'environ 30% de ce qu'on retrouve chez les souris sauvages. En revanche, une injection journalière de T4+T3 est suffisante pour restaurer en partie une muqueuse fonctionnelle après seulement deux jours. Dans ce contexte, la fraction proliférative représente environ 70% de ce qu'on observe chez des souris sauvages (Flamant et al, 2002). Il est important de noter que ces souris ne présentent aucun défaut de muqueuse intestinale à la naissance probablement du fait des échanges d'HTs de la mère vers les foetus pendant la période intra-utérine, processus qu'on a évoqué dans le paragraphe Partie2.III.B.2. L'altération de la muqueuse intestinale survient deux semaines après la naissance ce qui souligne le rôle important des HTs dans la vie post natale chez les vertébrés (Flamant et al, 2002).

En terme de TRs, en faisant un parallèle avec ce qui se passe chez les amphibiens, d'un côté le transcrite TR β est induit par l'augmentation du taux d'HTs et induit l'activation de programmes génétiques initiateurs de la métamorphose (têtard), de l'autre côté (souriceau) TR β est bien présent dans la muqueuse à J12 après la naissance mais aucun changement morphologique ou moléculaire n'est observé (Plateroti et al, 1999). Cela montre, à ce stade, que TR β n'est pas un inducteur majeur du remodelage intestinal chez la souris et que le mécanisme de régulation de la physiologie intestinale à ce stade est différent entre les deux modèles. De plus, les souris adultes TR $\beta^{-/-}$ sont viables et ne présentent aucun phénotype observable dans la muqueuse intestinale. Enfin, TR β s'exprime dans le compartiment différencié des souris adultes (Sirakov et al, 2014) et, d'après les données issues de signatures transcriptomiques du groupe de Hans Clevers, les transcrits TR β ne sont présents ni dans les cellules souches, ni dans les cellules progénitrices, ni dans les cellules de Paneth des cryptes intestinales adultes (voir article) (**figure 18**). Alors que TR β ne semble pas être impliqué dans la régulation de l'homéostasie intestinale au stade post-natal et chez l'adulte, son homologue TR α 1 l'est. De nombreuses études l'ont suggéré puis démontré.

Tout d'abord, avant d'entrer dans les détails, il est important de préciser que TR α 1 est exprimé en gradient dans les cryptes intestinales. Son expression est plus forte en bas des cryptes plutôt qu'en haut (Sirakov et al, 2014) (**figure 18**). Les mêmes analyses transcriptomiques du laboratoire de Hans Clevers que je viens d'évoquer nous indiquent également que *Thra* s'exprime à la fois dans les cellules souches, les progéniteurs et les cellules de Paneth avec une prévalence pour les cellules souches (voir article).

De manière intéressante, les isoformes courtes de *Thra* (TR $\Delta\alpha$ 1 et TR $\Delta\alpha$ 2) sont exprimées dans l'EI et, en l'absence de TR α 1, ont des effets délétères. En effet, dans les souris TR $\alpha^{-/-}$ (absence de TR α 1 et TR α 2 uniquement), ces isoformes sont exprimées et les souris meurent 20 à 30 jours après la naissance (Fraichard et al, 1997), contrairement aux souris TR $\alpha^{0/0}$ où toutes les isoformes de *Thra* sont absentes. Les marquages histologiques effectués en ciblant le groupement C-terminal des TR α ont révélé que les TR $\Delta\alpha$, notamment TR $\Delta\alpha$ 1, sont présents dans le compartiment différencié (villosités). En l'absence de TR α 1 dans les souris TR $\alpha^{-/-}$, la protéine TR $\Delta\alpha$ 1 est retrouvée à la fois dans le compartiment différencié et dans le compartiment indifférencié. Ceci a été expliqué par le fait que TR α 1 (présent dans les cryptes) favorise la dégradation des TR $\Delta\alpha$ dans les cryptes par la voie du protéasome. En l'absence de TR α 1, les TR $\Delta\alpha$ sont présents dans le compartiment prolifératif. Dans les souris Tr $\alpha^{0/0}$ (KO total) les isoformes courtes ne sont pas exprimées et les souris sont viables ce qui suggère que, chez les souris sauvages, les produits de *Thra* modulent l'activité des TR $\Delta\alpha$. Même s'il a été proposé que les TR $\Delta\alpha$ puissent agir indépendamment des TRs, notamment en interagissant avec les récepteurs de l'acide rétinoïque (Chassande et al, 1997), il demeure que les effets délétères liés à ces isoformes ne sont toujours pas clairs.

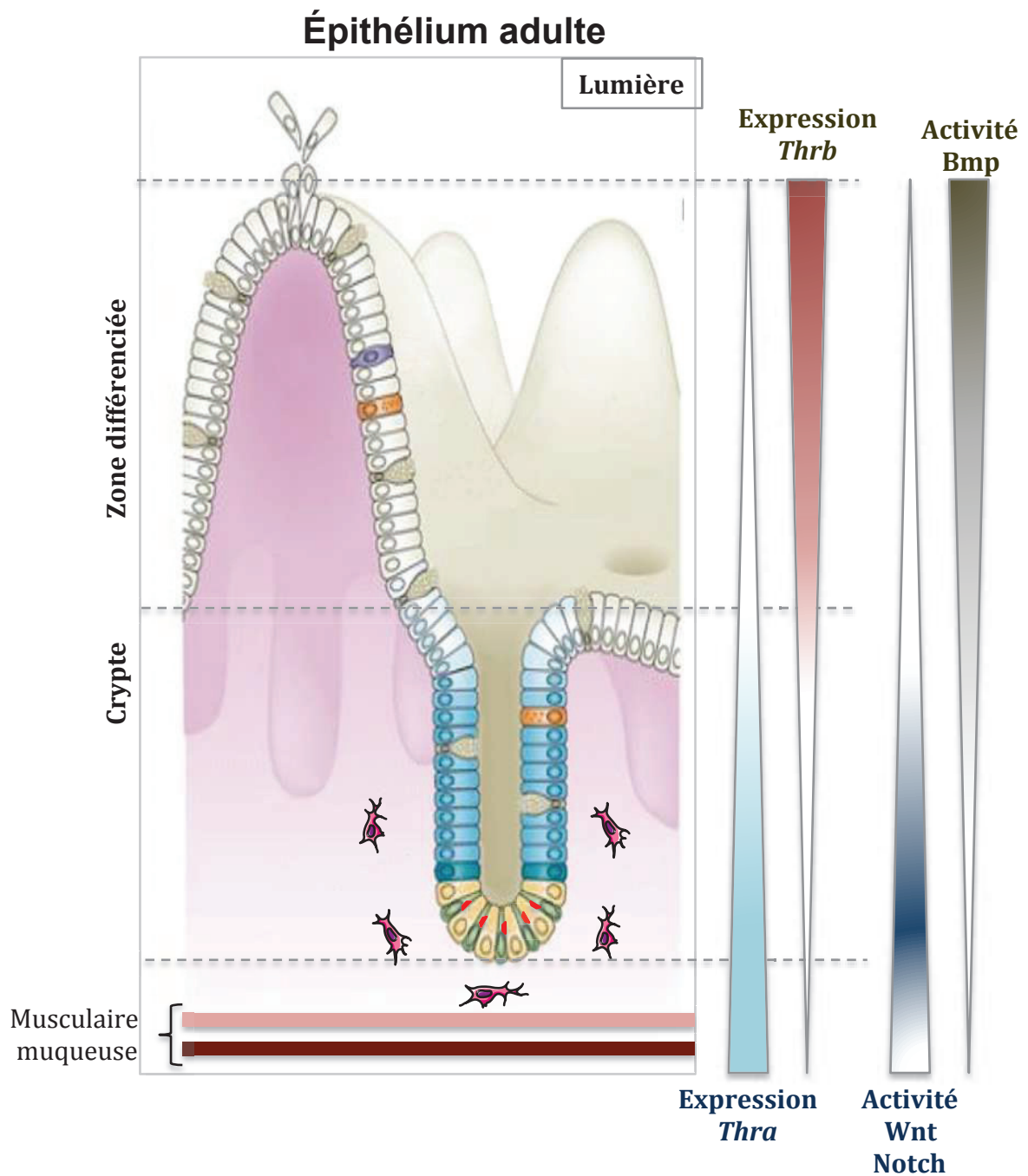


Figure 18 : Récepteurs nucléaires aux HTs et épithélium intestinal (EI). Cette figure représente les profils d'activité des gènes *Thra* et *Thrb* au niveau de l'EI chez la souris. TR α s'exprime dans les cryptes dans une zone similaire de celle des voies Wnt et Notch. Les ARNm de TR α sont retrouvés dans les cryptes à la fois dans les cellules souches, les cellules de Paneth, les cellules progénitrices avec un enrichissement dans les cellules souches. TR α s'exprime également dans les muscles lisses sous l'épithélium. TR β s'exprime dans le compartiment différencié. Fond d'image tiré et adapté de la littérature (Barker, 2014).

Les différents modèles murins Knock Out (KO) ciblant les TRs qui ont été générés présentent des défauts de maturation intestinale. Prenons l'exemple des souris $Tr\alpha^{0/0}$ que j'ai brièvement évoqué dans le paragraphe précédent (Plateroti et al, 2001). Ces dernières ne possèdent aucune des quatre isoformes normalement exprimées dans l'EI murin ($TR\alpha1$, $TR\alpha2$, $TR\Delta\alpha1$, $TR\Delta\alpha2$). Avec l'ablation totale de *Thra*, ces souris présentent un défaut de prolifération exacerbé après la naissance et chez l'adulte. En effet, le taux de prolifération diminue de 25% à 50% pendant les premiers jours/semaines après la naissance (Plateroti et al, 2006). Malgré l'altération de la prolifération, ces souris présentent des cryptes fonctionnelles mais les villosités sont raccourcies. De plus, les souris adultes présentent un taux de cellules sécrétoires plus élevé que la normale dans l'intestin grêle comparé à des souris sauvages (Sirakov et al, 2015). Ceci indique que la modulation de $TR\alpha$ conduit à un déséquilibre entre prolifération et différenciation dans le compartiment prolifératif. Il est important de préciser que le phénotype de ces souris ne change pas qu'on se place en condition d'hypothyroïdie ou d'hyperthyroïdie expérimentale. Ceci s'explique par le fait que $TR\alpha1$ est la seule « vraie » isoforme à pouvoir lier à la fois la T3 et l'ADN et donc à pouvoir répondre à ce signal hormonal comme un véritable facteur de transcription (Plateroti et al, 2001). De plus, d'autres données publiées par l'équipe ont clairement montré que $TR\alpha1$ agit comme un pro-oncogène. Je fais notamment référence aux animaux transgéniques qui ont été générés dans le but de forcer l'expression de $TR\alpha1$ dans tout l'épithélium intestinal en utilisant le promoteur du gène *Vil1*. Chez les souris *vil-TR\alpha1* adultes, on observe clairement un phénomène de renouvellement cellulaire accéléré où les cryptes sont plus nombreuses, les villosités plus grandes, où le nombre de cellules prolifératives augmente et où on observe la formation d'adénomes dans l'intestin grêle et le colon (Kress et al, 2010). De plus, ces données ont été renforcées par l'utilisation combinée de cette construction dans un contexte pathologique tumoral. En effet, la surexpression de $TR\alpha1$ dans le modèle *vil-TR\alpha1/Apc^{1638N}* accélère le processus de tumorigénèse intestinale. Déjà à six mois, les souris *vil-TR\alpha1/Apc^{1638N}* développent des adénocarcinomes et présentent des micro-métastases au niveau du foie tandis que les souris *Apc^{1638N}* développent principalement des polypes (N<10) et quelques rares adénocarcinomes hautement différenciés. L'ablation de $TR\alpha1$ dans ce même contexte, freine le développement tumoral (Uchuya-Castillo et al, 2018). Finalement, les dernières études menées avec pour support deux cohortes indépendantes de patients atteints de cancer colorectaux ont permis de montrer que le messager $TR\alpha1$ est retrouvé augmenté

parmi certaines de ces tumeurs. Ceci a également été observé au niveau de la protéine par immunohistochimie. L'analyse de bases de données disponibles sur le site TCGA (The Cancer Genome Atlas) a permis de valider les résultats issus des cohortes.

Pour terminer, de nombreux indices suggèrent l'implication de TR α 1 dans ces cellules souches intestinales. Premièrement, d'un point de vue moléculaire, TR α 1 est directement lié aux voies Wnt et Notch (**figure 19**), voies que j'ai décrites dans la première partie de cette thèse comme étant primordiales pour la régulation de l'autorenouvellement de ces cellules. Les précédentes études ont par exemple montré que TR α 1 est capable d'une part d'activer directement la transcription de la β -caténine et d'autre part de favoriser la stabilisation de celle-ci. En effet, TR α 1 est également capable d'activer directement la transcription de *Sfrp2* qui, au travers de l'activation de la voie Wnt, participe à la stabilisation de la β -caténine qui active en aval des gènes cibles tels que *c-Myc* ou *Ccnd1* ayant un rôle dans la prolifération cellulaire (Kress et al, 2009a; Plateroti et al, 2006). L'interaction de TR α 1 est même plus intime que ce que je viens de décrire puisque TR α 1 est également capable d'interagir physiquement et fonctionnellement avec le complexe β -caténine/Tcf4, raison pour laquelle il est recruté au niveau de régions cibles de la voie Wnt (Sirakov et al, 2012). Deuxièmement, il a déjà été montré par notre équipe que les HTs sont capables de réguler positivement des cibles de la voie Notch (Kress et al, 2009a), voie moléculaire également impliquée dans le maintien de l'homéostasie intestinal et dans certains cancers (Horvay & Abud, 2013; Peignon et al, 2011). À noter que l'activation constitutive de cette voie dans l'EI participe à l'élargissement de la zone proliférative et à l'inhibition de l'engagement des cellules dans le lignage sécrétoire (Pellegrinet et al, 2011; Riccio et al, 2008; van Es et al, 2005). De notre côté, il a été montré *in vivo* et dans des cultures épithéliales primaires en 2D que les HTs sont capables de réguler positivement *Dll1*, *Dll4*, *Jag1* et dans certaines situations *Notch1*. L'activation des Dlls est indirecte mais l'activation de *Jag1*, elle, se fait directement *via* l'interaction de TR α 1 sur un élément de réponse dans le promoteur du gène.

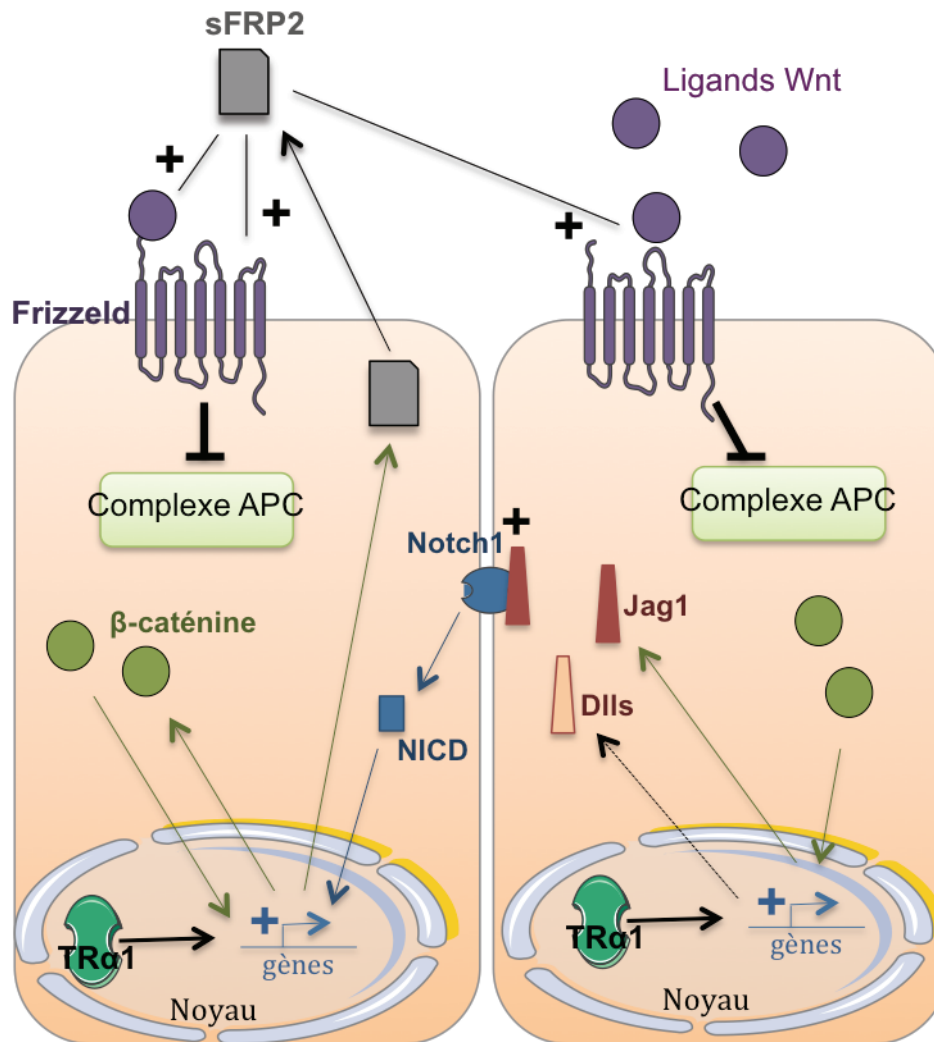


Figure 18 : Coopération des TRs avec les voies Wnt et Notch. Deux cellules épithéliales où TR α 1 s'exprime sont schématisées. Pour information, TR α 1 cible directement un TRE dans le promoteur des gènes *Ctnnb1*, *sFRP2* et *Jag1*. Lorsque TR α 1 s'exprime, il permet l'expression de la β -caténine et sa stabilisation via l'activation de la voie Wnt par sFRP2. sFRP2 interagit avec Frizzled et/ou les ligands Wnt pour activer la voie Wnt. TR α 1 est également capable de coopérer étroitement avec la voie Notch notamment en permettant l'expression de ligands Notch tels que Jag1 (cible directe) et Dlls (cibles indirectes). À noter que TR α 1 peut interagir physiquement avec la β -caténine et de ce fait peut être recruté au niveau de régions régulatrices WRE (Wnt response elements). Les flèches pleines indiquent une activation directe. Les flèches pointillées indiquent une activation indirecte.

L'intervention des HTs à la fois chez les amphibiens, les rongeurs et chez l'Homme n'est plus à démontrer. En effet, comme je l'ai expliqué durant cette introduction de thèse, les HTs ont un rôle crucial pour le développement des organes mais également durant après la naissance. Même si de nombreux indices suggèrent le rôle de TR α 1 dans le compartiment prolifératif chez la souris, aucune étude ne décrit précisément les mécanismes de l'impact de la régulation de la voie HTs/TRs dans les cellules souches et progéniteurs de l'EI. Dans le but de répondre à cette question et de décortiquer les mécanismes moléculaires qui répondent aux HTs dans ces cellules, j'ai décidé de baser mes études sur l'exploitation d'organoïdes intestinaux murins me permettant de suivre les cellules souches (modèle *Lgr5*-EGFP) et de les traiter avec des hormones thyroïdiennes à plus ou moins long terme. Dans mon l'article scientifique que vous trouverez dans la partie « résultats », vous verrez que j'ai utilisé différentes approches me permettant d'analyser à la fois la signature des cellules souches, leur autorenouvellement et d'étudier le caractère prolifératif et différencié des cellules intestinales cultivées en 3D. Du fait de la complexité de l'action des HTs, j'ai également produit des organoïdes issus d'autres modèles murins d'inactivation de gènes de la voie des TRs. Je fais notamment référence aux modèles murins TR α ^{0/0}, TR β ^{-/-} constitutifs et au modèle TRami inducible (TR α 1L400R) (Quignodon et al, 2007) qui m'ont permis de tester l'absence ubiquitaire de *Thra* et *Thrb* ainsi la perte d'activité spécifique de TR α 1 dans les cellules souches *Lgr5*⁺ respectivement. Vous verrez que les résultats de ma thèse mettent en lumière l'activité pro-proliférative de TR α 1 et renforcent de manière générale l'implication des HTs/TRs dans l'homéostasie de l'EI. En revanche vous verrez également qu'il subsiste quelques zones d'ombre concernant l'impact des HTs/TRs dans le contexte particulier d'un modèle cellulaire 3D épithélial-autonome, c'est à dire dans les organoïdes.

RÉSULTATS

Contexte. Les hormones thyroïdiennes (HTs) contrôlent plusieurs aspects du développement et de l'homéostasie intestinale. Elles agissent *via* des récepteurs nucléaires (TRs), facteurs de transcription modulés par la T3. Le paradigme est la métamorphose des amphibiens où elles sont responsables du remodelage du tube digestif et de l'émergence des cellules souches (Ishizuya-Oka et al, 2009). Des études précédentes ont montré que les HTs jouent un rôle fondamental en régulant la balance entre prolifération et différenciation des précurseurs épithéliaux murins. Du point de vue moléculaire, le récepteur nucléaire TR α 1 contrôle plusieurs gènes du cycle cellulaire/prolifération ainsi que les voies de signalisation Wnt et Notch (Sirakov et al, 2014 ; Skah et al, 2017). En accord avec ces fonctions, l'expression ciblée de TR α 1 dans l'épithélium intestinal (souris *vil-TR α 1*) est suffisante pour induire des cryptes aberrantes, hyper-prolifératives et confère une sensibilité accrue au programme de tumorigénèse intestinale dépendant de la mutation dans le gène *Apc* (*vil-TR α 1/Apc^{+ /1638N}* mice) (Kress et al, 2010).

Le but de mon travail a été d'étudier le contrôle des cellules souches intestinales, dépendant des HTs/TRs. En effet, j'ai utilisé des souris *Lgr5-EGFP-CreERT2* permettant de traquer, trier et cibler les cellules souches (Barker et al, 2007) que j'ai croisées avec le modèle murin inductible au tamoxifène TR α 1-LOF (Loss-of-function) (Quignodon et al, 2007). J'ai étudié les effets de l'altération de la voie HTs/TR α 1 *in vivo* et dans des organoïdes *ex vivo*.

Résultats. L'induction de TR α 1-LOF altère l'activité des cellules souches et leur capacité à développer des organoïdes *ex vivo*. De plus, TR α 1-LOF diminue l'activité des voies Wnt et Notch ainsi que l'expression de marqueurs souches et de prolifération. Les traitements d'organoïdes à la T3 induisent une réponse rapide et complexe. En fait, le traitement T3 à court-terme a un effet positif sur l'activité des cellules souches. Cependant, en raison d'un « turn-over » accéléré, le traitement prolongé sur plusieurs jours avec la T3 induit la perte des cellules souches et une différenciation massive dans les lignages sécrétoires. L'étude comparative des profils moléculaires d'organoïdes traités *versus* non traités à la T3, exécutée avant la mise en place du phénotype de perte des cellules souches, indique un enrichissement en différentes signatures : progéniteurs épithéliaux, réponse métabolique, réponse au stress. Puisque le phénotype T3 est complètement aboli dans le modèle TR α 1-LOF, nous concluons que l'action de la T3

dans les cellules souches intestinales dépend principalement du récepteur nucléaire TR α 1.

En conclusion, nos résultats indiquent que les traitements à la T3 et la modulation de l'expression ou de l'activité de TR α 1 affectent rapidement et fortement les cellules souches intestinales. De plus, ce travail ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude des signaux dépendants des HTs/ TR α 1 dans la physiopathologie des cellules souches intestinales.

**Paradoxical influence of the thyroid hormone-dependent pathway on intestinal
epithelium stem cells through a bimodal mechanism of action**

Matthias Godart¹, Carla Frau¹, Catherine Jamard¹, Maria Virginia Giolito¹, Clementine Le Nevé¹, Luiz O Penalva² and Michelina Plateroti^{1*}

1: Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Université de Lyon, Université Lyon 1, Centre Léon Bérard, Département de la recherche, 69000 Lyon, France. 2: Children's Cancer Research Institute, University of Texas Health Science Center at San Antonio, TX, 78229, USA.

***: Corresponding author**

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

Tel: 33 4 69166617

Fax: 33 4 78782720

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

Keywords: Intestinal stem cells; Organoids; Thyroid Hormone; Thyroid Hormone Nuclear Receptor

Abstract

Background. Thyroid hormones (THs) control several aspects of gut development and homeostasis. They act through the thyroid hormone nuclear receptors TRs, that are T3-modulated transcription factors. The paradigm is the amphibian metamorphosis, where they are responsible for gut remodeling and emergence of the stem cells. In previous studies we showed that THs play a fundamental role in regulating the balance between cell proliferation and cell differentiation of the murine intestinal epithelial precursors. From a molecular point of view the nuclear receptor TR α 1 controls several proliferation/cell-cycle genes as well as the Wnt and Notch pathways. In accordance with these functions, targeted expression of TR α 1 in the intestinal epithelium (*vil-TR α 1* mice) is sufficient to induce aberrant and hyper-proliferative crypts and confers increased susceptibility to *Apc*-mutation dependent intestinal tumorigenic program (*vil-TR α 1/Apc^{+1638N}* mice).

The aim of this work was to study TH- and TR α 1-dependent control of intestinal stem cells. Indeed, we used the *Lgr5*-EGFP-CreERT2 mice enable tracking, sorting and targeting the stem cells crossed with tamoxifen inducible TR α 1 loss-of-function mouse model (TR α 1-LOF). I studied the effect of TH/TR α 1 alteration *in vivo* and in organoids *ex vivo*.

Results. Induction of TR α 1-LOF altered stem cell activity, lowering *ex vivo* organoids development. In addition, TR α 1-LOF decreased Wnt and Notch pathways as well as stem cell and proliferation markers expression. Treatment of WT organoids with the hormone T3 induced a rapid and complex response. In fact, short-term T3 treatment had a positive action on stem cell activity. However, due to the accelerated turnover, several days of continuous T3 treatment provoked stem cell exhaustion and massive differentiation toward secretory cell lineages. A comparative molecular profiling of T3-treated *versus* untreated organoids, performed before the onset of the stem cell exhaustion phenotype, indicated an enrichment in progenitor as well as stress response and metabolic gene signatures. As the T3 phenotype is completely abolished in the TR α 1-LOF model, we conclude that the action of T3 in the intestinal stem and progenitor cells is mainly dependent upon the TR α 1 nuclear receptor.

In conclusion, our results indicate that T3 treatment or modulating TR α 1 expression or activity has a rapid and strong effect on the intestinal stem cells. Therefore, this work opens a new perspective in the study of TH/TR α 1-dependent signal on the physiopathology of the intestinal stem cells.

Introduction

The intestinal epithelium is structurally and functionally organized in a monostratified cell layer that along a vertical axis defines the crypts of Lieberkhün and the *villi* (van der Flier & Clevers, 2009). At the bottom of the crypts are located self-renewing multipotent stem cells (SCs) and their rapidly amplifying daughter cells (Barker, 2014; Umar, 2010). The progenitors differentiate during their migration to the apex of *villi* and acquire their complete differentiation program toward secretory and absorptive cells (Noah et al, 2011). This regulation is tightly controlled given that the entire intestinal epithelium renewal takes up to 4-5 days in mammals (van der Flier & Clevers, 2009). The balance between SC self-renewal, progenitor proliferation and differentiation commitment in the crypts depend on the cross-regulation among several signaling pathways including Wnt, Hedgehog, Notch, BMP, and thyroid hormones (THs) (Frau et al, 2017; Spit et al, 2018). In particular, Wnt and Notch activities are necessary for the maintenance of stem identity while their unbalance is a key determinant of cell differentiation engagement (Tian et al, 2015; van Es et al, 2005). In fact, progenitors displaying an activated Wnt are committed toward secretory lineages while Notch activation is specific for absorptive commitment (Sancho et al, 2015; VanDussen et al, 2012; Yang et al, 2001).

Interestingly, our previous work demonstrated a key involvement of the signal dependent upon the thyroid hormones (T3 and T4) and of their nuclear receptor TR α 1 in intestinal development and homeostasis, through the control of the Wnt and Notch activities (Kress et al, 2009; Kress et al, 2010; Sirakov et al, 2015). TR α 1 is encoded by the *Thra* gene and it is the only *bona fide* T3 receptor transcribed by this gene, as it is able to bind both T3 and DNA (Brent, 2012). From a molecular point of view, TRs modulate the expression of target genes by binding to thyroid hormone response elements (TRE) present in regulatory regions of direct target genes. Upon T3 binding, TRs undergo to a conformational change enabling the

activation or the repression of the transcriptional machinery (Brent, 2012). TR α 1 is specifically expressed in the intestinal crypt cells (Kress et al, 2009; Kress et al, 2010) where it acts as direct activator of Wnt (Kress et al, 2009; Plateroti et al, 2006) and Notch pathways (Sirakov et al, 2015) as well as of cell proliferation (Kress et al, 2009; Kress et al, 2010; Uchuya-Castillo et al, 2018), in agreement with the phenotype described in TR α -knockout animals or in TR α 1-overexpressing mice (Kress et al, 2009; Kress et al, 2010; Plateroti et al, 2001; Plateroti et al, 2006). The TR β 1 receptor, encoded by the *Thrb* gene, presents an expression profile restricted to the differentiated epithelial cells of the *villi* (Sirakov et al, 2014) and no overt function for this protein has been described in the intestine (Plateroti et al, 1999).

Even if a large literature described the major involvement of THs on intestinal postnatal development during amphibian metamorphosis and in stem cell emergence (Frau et al, 2017; Ishizuya-Oka et al, 2009; Shi et al, 2011), no specific studies have been performed in mammals. In our study, we took advantage of the *Lgr5*-EGFP-IRES-CreERT2 mouse model (Barker et al, 2007) to specifically study the SC compartment and its response to T3-dependent signalling in *ex vivo* 3D organoids and in animals *in vivo*. Treatment of WT organoids with T3 induced a precocious and very complex response. In fact, short-term T3 treatment had a positive effect on stem cell activity. However, due to the highly accelerated turnover, several days of continuous T3 treatment provoked stem cell exhaustion and massive differentiation toward secretory cell lineages. A comparative molecular profiling of T3-treated *versus* untreated organoids, performed before the onset of the stem cell exhaustion phenotype, indicated an enrichment in secretory progenitors as well as stress response and metabolic gene signatures. Finally, tamoxifen-induced TR α 1 loss-of-function (TR α 1-LOF) (Quignodon et al, 2007) in SCs showed an altered SC activity, lowering *ex vivo* organoids development. Indeed, TR α 1-LOF decreased Wnt and Notch pathways as well as stem cell and

proliferation marker expression. As the T3 phenotype is abolished in the TR α 1-LOF model, we conclude that the principal action of T3 in the intestinal epithelium stem and progenitor cells is mainly dependent upon the TR α 1 nuclear receptor.

Materials and Methods

Animal and sample collection

We used adult (2-4 month-old) *Lgr5*-EGFP-IRES-CreERT2 (from here *Lgr5*-EGFP) (Barker et al, 2007), TR α ^{0/0} (Gauthier et al, 2001), TR β ^{-/-} (Gauthier et al, 1999) and TR α 1^{L400R} mice (from here TR α 1 corresponding to a model of TR α 1 loss-of-function -TR α 1-LOF-) (Quignodon et al, 2007). Animals were maintained in a C57BL6/J genetic background. TR α 1 mice were crossed with *Lgr5*-EGFP and *Rosa26/CAG*-floxed-STOP-tdTomato (from here *Rosa*-Tomato) mice (Madisen et al, 2010) to generate tamoxifen-inducible triple transgenic mice. Animals were housed in the same animal facility and received standard mouse chow and water *ad libitum*. All experiments were performed in compliance with the French and European guidelines for experimental animal studies and approved by the local committees "Comités d'Éthique en Experimentation Animale de l'Université de Lyon" (C2EA15; registration number DR2013-55)", the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Direction Générale pour la Recherche et l'Innovation, Secrétariat "Autorisation de projet" (agreement 02847.01).

For T3 injections, a dose of 20 μ g for 20g body weight in 100 μ l saline solution was used; mice were injected once a day during two days, controls received 100 μ l of saline solution. They were sacrificed and intestinal samples were collected in 4% paraformaldehyde (PFA) or liquid nitrogen for paraffin embedding or molecular studies respectively.

For tamoxifen injections, mice received 100 μ l of a 10mg/ml solution in sunflower oil once a day for 5 days; controls received 100 μ l of oil injections. After sacrifice, the intestine was removed for crypt preparation and organoids cultures or collected in 4% PFA or liquid nitrogen for paraffin embedding or molecular studies respectively.

Isolation of small intestinal crypts and organoid cultures

Small intestine was harvested, washed with cold PBS1X, opened longitudinally to remove luminal content and finally cut in small pieces of 1 to 2mm. Pieces of tissue were dynamically washed in cold PBS at 4°C during 20min. PBS was removed and fragments were incubated in a 2mM EDTA/PBS solution during 30min at 4°C. When time was up, fragments were gently mixed with the pipet and EDTA solution was removed. Intestinal fragments were dynamically washed in PBS and then fragments were shaken to dissociate crypts from mesenchyme. Supernatant was recovered giving rise to a crypt-enriched suspension. This suspension was centrifuged at 200 RCF 3min at 4°C and supernatant was removed. Crypt-enriched suspension was filtered through a 70µm strainer and crypts were slowly centrifuged. Supernatant was removed and organoid culture medium was gently added to the crypt pellet. Finally, Matrigel matrix (Corning) was added to the crypt-medium solution with a 1:1 ratio and then drops of 50µl were plated in 12 well plates. Finally, 900µl of organoid culture medium were added in each well. Organoids were cultured at 37°C, 5% CO₂ in IntestiCult Organoid Growth Medium (Stem Cell Technologies). Medium was changed every 4 days and organoids replicated approximately every 4/5 days. For replication, Matrigel-embedded organoids were grossly dissociated with a micropipet and fragments recovered. Equivalent of 4 dissociated culture-drops were collected in tubes and the volume was adjusted to 5ml with DMEM. Finally organoids were mixed, centrifuged and pellet resuspended in Intesticult/Matrigel mix (1:1 volume) and plated in 50µl drops, covered by 900µl of culture medium in 12 well plates.

Organoids development studies over several days in culture were performed on freshly isolated crypt cultures. Counting of the different structures was done under a Zeiss AxioVert inverted microscope. For treatment experiments, both fresh and replicated organoids were used. T3, T4, T2, Tetraiodothyroacetic acid (Tetrac), CHIR99021 (Merck-Sigma), Valproic

acid (VPA) (Merck-Sigma), Wnt3a (R&D systems), Noggin (Peprotech), Y27632 (Merck-Sigma) were used at the indicated concentrations.

To induce recombination and expression of TRami allele in TRami/*Lgr5*-EGFP organoids 0.2mg/ml of 4-hydroxy tamoxifen (4-OH-Tamoxifen) was added to the culture medium and organoids harvested at different time points from the beginning of treatment (3, 4, 5, and 6 days).

For organoid colony assay experiments, organoids were recovered, incubated in Matrisperse (Corning) to eliminate the Matrigel, then incubated in TripLE express solution (Gibco) at 37°C for 10 minutes and finally mechanically dissociated with 1ml pipet. Dissociation efficiency was directly monitored under the microscope. Cell suspension was recovered in PBS, washed and filtered in a 40µm strainer and 5000 single cells per 50µl of Matrigel drop were plated into 12 well plates.

For flow cytometry analysis, single cells recovered from dissociated organoids with TripLE were analyzed with FACS Calibur apparatus (BD Biosciences). The percentage of GFP+ cells within the viable total cell population was determined in each condition.

RNA extraction and RTqPCR

Total RNA was extracted using the Nucleospin RNA Kit (Macherey-Nagel). To avoid the presence of contaminating genomic DNA (gDNA), DNase digestion was performed on all preparations. Reverse transcription (RT) was performed with the iScript reverse transcriptase (Bio-Rad) on total RNA according to the manufacturer's instructions. To further exclude gDNA contamination after RT we conducted a PCR in all preparations to amplify a housekeeping gene (*Hprt*) for which the primers are located on different exons of the corresponding gene. For qPCR approaches the SYBR qPCR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara) was used in a CFX connect apparatus (Bio-Rad). In each sample specific

mRNA expression was quantified by using the ΔC_t method and values normalized against *Ppib* (mouse) levels. Primers are listed in Table S1.

Protein extraction and Western-Blotting

Protein samples from organoids (50 μ g per lane) were prepared with RIPA (Uchuya et al, 2018), separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes 0.2 μ m (Biorad). Membranes were blocked with TBS-Tween (Euromedex) supplemented with 5% non-fat milk before incubation with primary antibodies. This step was followed by incubation with HRP-conjugated secondary antibodies (Promega). The signal was analyzed using an enzymatic Clarity substrate detection kit (Biorad) and image detection was performed using a Chemidoc XRS+ imaging system (BioRad), according to manufacturer's protocol. All images were processed using the Image lab software (Biorad). Antibodies are listed in Table S2.

RNA-seq analysis

Sample preparation for sequencing. Triplicates of organoids maintained in control conditions or treated with 10^{-7} M T3 were prepared and shipped to Active Motif RNA-seq service (www.activemotif.com). Steps included: a) Isolation of total RNA, b) Assessment of RNA quality/integrity using an Agilent Bioanalyzer, c) Directional library generation and QC of NGS library, d) Next-generation sequencing using the Illumina platform.

Sequencing and Analyses

1. Read Mapping: Standard RNA-sequencing generates 42-nt sequence reads using Illumina NextSeq 500. The reads are mapped to the genome using the STAR algorithm with default settings (Dobin et al, 2013). Alignment information for each read is stored in the BAM format.

2. **Fragment Assignment:** This process step is to count the number of reads (for single-end library) or fragments (for paired-end library) overlapping predefined genomic features of interest (e.g. genes). Only read pairs that have both ends aligned were counted. Read pairs that have their two ends mapping to different chromosomes or mapping to same chromosome but on different strands were discarded. We also require that at least 25 bp overlapping bases in a fragment for read assignment. The gene annotations we used were obtained from Subread package (Liao et al, 2014). These annotations were originally from NCBI RefSeq database and then adapted by merging overlapping exons from the same gene to form a set of disjoint exons for each gene. Genes with the same Entrez gene identifiers were also merged into one gene (Liao et al, 2014).

3. **Differential Analysis:** After obtaining the gene table containing the fragment (or read) counts of genes, differential analysis was performed to identify statistically significant differential genes using DESeq2 (Love et al, 2014). The following lists the pre-processing steps before differential calling.

a. **Data Normalization:** DESeq2 expects un-normalized count matrix of sequencing reads (for single-end RNA-seq) or fragments (for paired-end RNA-seq) for DESeq2's statistical model to hold. The DESeq2 model internally corrects for library size using their median-of-ratios method (ref). The gene table obtained from Analysis Step 2) was used as input to perform the DESeq2's differential test.

b. **Filtering before multiple testing adjustment:** After a differential test has been applied to each gene except the ones with zero counts, the p-value of each gene was calculated and needed to be further adjusted to control the number of false positives among all discoveries at a proper level. This procedure is known as multiple testing adjustment. During this process, DESeq2 by default filters out statistical tests (i.e. genes) that have low counts by a statistical technique called independent filtering. It uses the average counts of each gene (i.e.

baseMean), across all samples, as its filter criterion, and it omits all genes with average normalized counts below a filtering threshold from multiple testing adjustment. This filtering threshold was automatically determined to maximize detection power (i.e. maximize the number of differential genes detected) at a specified FDR.

4: Filtering criteria. DE genes were filters for shrunkenLog2FC >0.5 and adjusted p-value 0.05. The adjusted p-value was generated by Benjamini and Hochberg's FDR (False Discovery Rate) procedure and it is commonly used to evaluate statistical significance after multiple testing adjustment.

Gene ontology (GO) and pathway enrichment analysis

To classify the functions of DE genes, GO enrichment, and Reactome pathway (Fabregat et al, 2016) analysis was performed using Panther (Mi et al, 2005). For both analyses we considered terms to be significant if the FDR adjusted p-values were <0.05 and fold enrichment is >2.0. Further, we used REViGO (Supek et al, 2011) to reduce redundancy of the enriched GO terms and visualize the semantic clustering of the identified top scoring terms. Geneset enrichment analysis were performed with Enricher (Kuleshov et al, 2016).

Gene interaction network analysis

In order to determine the association between genes in a given dataset, protein-protein interaction network was constructed using STRING database (v10) (Szklarczyk et al, 2015). The interactions are based on experimental evidence, co-occurrence and text-mining.

Immunofluorescence, immunohistochemistry and microscopy

For *in vivo* experiments, Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) sections (5µm thickness) were used for indirect immunostaining. Briefly, the sections were processed to eliminate the

paraffin and then incubated with primary antibodies overnight at 4°C followed by incubation with fluorescent secondary antibodies (Alexa Fluor, Molecular Probes, 1:1000). All nuclei were counterstained with Hoechst (33342 Molecular Probes).

For *ex vivo* experiments, organoids were recovered and fixed in PFA 3% during 15min at Room Temperature (RT). They were then incubated in PBS/Triton 0.5% 30min, PBS/Triton 0.2%/BSA1% 30min at RT. Then, the solution was discarded and primary antibodies were added at 4°C ON. Organoids were rinsed in PBS and secondary antibodies added for 4 hours at RT. All nuclei were counterstained with Hoechst (33342 Molecular Probes) 20min. Finally organoids were rinsed and mounted on glass slide. To label mucus-producing goblet cells, the paraffin sections were subjected to periodic acid-Schiff (PAS) staining as previously reported (Plateroti et al, 1999). Mucin-filled cells were stained in bright fuchsia.

For live imaging, observations were performed on an AxioVert inverted microscope and pictures were taken with X4 and X10 objectives. For conventional fluorescence microscopy we used a Right Zeiss AxioImager 2; for confocal microscopy, we used the LSM780 Zeiss microscope with 40X and X60 objectives. All the pictures were modified equally by ImageJ software (brightness/contrasts) and Z projects were performed for image stacking.

Statistical analysis

Results illustrated as histograms represent the mean \pm standard deviation (SD). Comparisons between groups were performed using Student's t-test; p-values <0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Continuous T3 treatment affects intestinal organoids development in an *ex vivo* system

We started our analysis by preparing fresh crypts from wild type animals and followed the kinetics of 3D organoids' development and structuration over 7 days in culture. Organoids were cultured in control or in 10^{-7} M T3-containing medium, that appeared to be the appropriated concentration for our studies (Figure S1A). As expected from reported studies (Sato et al, 2009), in control condition we observed an increase of organoids displaying the presence of several buddings over the time in culture and a parallel decrease of simple structured organoids (Figure 1A,B; S1B). Interestingly, T3 induced a change of morphology with organoids displaying a larger central body and decreased buddings in number and length (Figure 1A,B; S1B). These changes resulted in a loss of complex structuration, clearly visible from D3 onward with decreased complex organoid formation (more than 2 buddings) followed by an almost stable percentage of less-complex organoids (1-2 buddings) (Figure 1A,B; S1B).

In parallel, we analyzed markers of cell proliferation and of lineage committed progenitors or differentiated cell types at two time points: D2 when the morphological phenotype is not yet established and D4 when it is fully evident (Figure 1A,B Figure S1C). The proliferative capacity upon T3 treatment was analyzed by immunolabelling approach and we observed a different patterning of KI67-positive cells at D2 compared with control organoids. In particular, while in controls the proliferating cells are spread all over the organoids (central and peripheral parts) in T3-treated condition the organoids were clearly more polarized with KI67 positive cells located within the already emerging buddings (Figure 1C). At D4 the control organoids showed KI67-positive cells within the crypt-like structures and this zone appears reduced in T3-treated condition (Figure 1C), according with the morphological

changes. We checked by WB the protein levels of phospho-Histone H3, indicator of actively cycling cells (Kim et al, 2017; Nielsen et al, 2013). The level of phospho-Histone H3 was unchanged at D2 but was downregulated at D4 (Figure 1D). In parallel, we observed that in T3 condition compared with untreated organoids, apoptosis was increased at both time points as visualized by cleaved-CASPASE3-positive cells or levels respectively by IF (Figure 1C) and WB (Figure 1D).

To complete the analysis of the phenotype induced by continuous T3 treatment on organoids development we used a RTqPCR approach to monitor lineage committed progenitors and their differentiation capacities. In particular we checked markers characterizing early progenitors (*Math1* and *Hes1*), late progenitors (*Elf3*, *Klf4*, *Ngn3* and *Sox9*) and terminal differentiated epithelial cell types (*Fabp2*, *Muc2*, *Lyz* and *Gcg*). The intestinal epithelium cell lineages commitment depend on the combination of several signaling pathways among which Wnt and Notch (Gehart & Clevers, 2019; Spit et al, 2018; Yin et al, 2014). Regarding markers of early progenitors, at D2 we observed only a marginal effect on *Hes1* (absorptive lineage) or no effect on *Math1* (secretory lineages) mRNA expression. However, at D4 T3 treatment induced respectively an increase in *Math1* and a decrease in *Hes1* expression, indicating an induction of the differentiation program toward secretory lineages. In particular, we observed an increase in *Math1*, *Elf3* and *Klf4* in T3-treated condition that defines the differentiation program of mucus-producing goblet cells (Figure 2A). The increase of differentiated goblet cells by T3 treatment was confirmed by PAS histological staining and by MUC2 immunolabeling on sections (Figure 2B). *Sox9* mRNA expression, indicating differentiation potential toward Paneth cells, was not changed at D2 or D4 and in consequence Lysozyme (LYZ)-expressing Paneth cell's number was not affected by T3 treatment (Figure S2A). However, at mRNA level at D2 *Lyz* levels were unchanged but resulted up-regulated by T3 treatment at D4 (Figure 2A). *Ngn3* is expressed by enteroendocrine progenitor cells and

specify enteroendocrine differentiation program (Jenny et al, 2002). Its expression was decreased by T3 treatment at both D2 and D4 but this decrease didn't result in an overt decrease in chromograninA (CHGA)-expressing enteroendocrine cell number (Figure S2A). Finally, decreased *Hes1* mRNA expression at D4 was parallel to decreased *Fabp2* mRNA level, indicating an impairment of absorptive lineage differentiation (Figure 2A). However, aminopeptidase N (ANPEP) protein immunolabeling or WB didn't show any major decrease in enterocyte differentiated cells (Figure S2A,B).

Taken together the data show a precocious structuration and polarization of organoids upon T3 treatment during development *ex vivo*, indicating an accelerated turnover. In addition, considering that *Dll1* and *Dll4* mRNA expression as well as DLL1- and DLL4-expressing cells were increased in T3 compared with control organoids (not shown), the data point to an increase in secretory progenitors in particular of the goblet lineage.

Analysis of stem cell compartment upon continuous T3 treatment *ex vivo*

One possible explanation for the observed phenotype is that T3 strongly influences stem cell (SC) biology. To specifically analyze the SC compartment we took advantage of the *Lgr5*-EGFP mice, which express the fluorescent GFP protein under the control of the *Lgr5* promoter (Barker et al, 2007). We followed GFP presence and expression in organoid cultures in control or T3 condition. Intriguingly, starting from D3 onward a weaker GFP signal could be observed by live microscopy (Figure 3A, S3A), that was confirmed by WB at both D2 and D4 (Figure 3D) in the T3 treated cultures compared to the respective control conditions. Furthermore, we observed by IF a reduced size of the CD44-positive crypt-like zone in T3 compared with the control organoids (not shown). We also used an approach of cytometry on single-cell dissociated organoids at D2 and D4 and observed a decreased percentage of GFP-positive cells in T3-treated compared with untreated organoids (Figure 3B). Finally, we

analyzed the mRNA expression of SC markers and observed a generalized decrease of all the markers in T3-treated organoids at both D2 and D4 (Figure 3C).

To link the T3-induced phenotype on SC markers with the stemness we used an approach of colony-forming efficiency, that is a direct measure at single cell level of the ability to self-renew and generate organoids (Sato et al, 2009; Yin et al, 2014). For this aim, prior to the colony assay, we cultured the organoids during two days in control or T3 conditions and then dissociated and recovered the single cells from each condition. 5000 cells per well have been seeded (Figure S3B) and organoids cultured during seven days in presence or absence of T3. At D7 we counted the number of colony formed and the number of buddings per organoid (Figure 3E,F). When starting from previously untreated organoids, T3 treatment (Control_T3) induced a decrease in colony formation and a small decrease in the number of buddings per organoid compared with the untreated organoids (Control_Control). Paradoxically, previous T3 treatment influenced the successive behavior of the single cells. In fact, T3-treated cultures maintained in untreated condition (T3_Control) resulted in reduced number of organoids, reflecting a reduced SC number, but they were larger in size and with an increased number of buddings per organoid (Figure 3E,F).

Overall, the data indicate that continuous T3 treatment in organoids induces a successive loss of SCs leading to SC exhaustion. However, they also unveil a paradoxical result of a T3-dependent priming or reprogramming of the SCs in a way their further culture increases stem capacity.

Signaling pathways involved in T3-dependent organoid's phenotype

The intestinal stem cell exhaustion described in the previous paragraph, can be due to alterations in signaling pathways required for SC biology. Then, we performed experiments by co-treating the organoids with T3 and growth factors or small molecules (Date & Sato,

2015) which activate the Wnt pathway (CHIR, Wnt3a) (Huang et al, 2017; Willert et al, 2003; Yin et al, 2014), inhibits the BMP pathway (Noggin) (Haramis et al, 2004; Qi et al, 2017), having an effect on lineage allocation through Notch and Wnt signaling or the HDACs (valproic acid, VPA) (Yin et al, 2014) or by inhibiting apoptosis (Y27632) (Han et al, 2017; Zhang et al, 2011). Interestingly, the T3 phenotype could partially be rescued by VPA (Figure 4A,B) that acts at multiple levels of signaling and suppresses secretory cell lineage differentiation (Yin et al, 2014). Indeed, we noticed a clear increase in GFP in organoids that were cultured in presence of T3 + VPA compared to T3 only (Figure 4A, upper panel) at D4. Almost 100% organoids were well structured compared to T3-treated organoids (Figure 4A, lower panel) but they remained morphologically different from the control condition (Figure 4A, upper panel). In fact, the number of buddings per organoid was decreased in T3+VPA organoids compared to control but similar to VPA condition alone (not shown). In addition and contrariwise to what was expected, VPA alone did not clearly induce *Lgr5*, *Olfm4*, *Ascl2* and *mTert* SC markers mRNA levels at D4 by RTqPCR analysis (Figure 4B) and did not inhibit the secretory signature (Figure 4B). We observed, however, that VPA interfered with the T3-induced *Math1*, *Elf3*, *Kl4* and *Muc2* mRNA expression in T3+VPA condition compared with T3-only condition, while it was not sufficient to recover SC signature at the level of the control condition (Figure 4B). We also wanted to see whether the phenotype could be rescued when the VPA was added in the medium after 2 days of T3 treatment. However, the delayed addition of VPA was inefficient in improving the T3-dependent effect on organoids (not shown). Finally, the activation of Wnt or the inhibition of BMP pathways resulted in a small recovery of the organoids morphology (Figure S4A,B), while the inhibition of apoptosis was not efficient at all in rescuing the T3 phenotype, indicating that cell death is not the primary cause of SC exhaustion (Figure S4A).

Taken together, our data point to a complex process leading to SC exhaustion driven by continuous T3 treatment of organoids, responsible for unbalanced progenitors differentiation. In fact only the VPA that acts on multiple molecular processes is able to partially abolish the T3 phenotype. However, the fact that delayed VPA treatment is not able to affect T3 action indicates that T3 precociously induces an irreversible program.

TH-TR in organoids

An important step in characterizing the action of the continuous T3 treatment on organoid development and structuration was the analysis of the thyroid hormones metabolizing enzymes, transporters and TRs by RTqPCR. *Dio1* was expressed in both untreated and treated organoids and its expression was strongly increased at both D2 and D4 upon T3 treatment, in line with its expression being directly controlled by T3 (Grontved et al, 2015) (Figure 5A). *Dio2* was not expressed at any time point or condition and *Dio3* was almost undetectable (not shown). Among TH transporters *Mct8* was undetectable at D2 but strongly induced by T3 at D4, while *Mct10* was present and its expression up-regulated by T3 treatment at both time points (Figure 5A). Regarding the TRs (TR α 1 and TR α 2 that are encoded through the same promoter (Brent, 2012) and TR β 1), their mRNA levels were unchanged by T3 treatment (Figure 5A). We also analyzed TR α 1 expression by immunolabeling and observed that at both D2 and D4 it is expressed essentially within the same cells that proliferate (PCNA-positive cells) (Figure 5B). However, when we performed WB analysis, TR α 1 expression was strongly reduced (Figure 5D), while TR β 1 protein expression resulted unchanged (Figure S5). To confirm that the T3 phenotype specifically depends on T3 and not from other metabolites or through the integrins (Davis et al, 2011; Hammes & Davis, 2015; Kalyanaraman et al, 2014) we also performed experiments by treating the organoids with T4, T2 and Tetrac. However,

only T4 could recapitulate the T3 phenotype (Figure S6A,B), as expected by the presence and expression pattern of the *Dio1* in the organoids and its action in metabolizing T4 to T3.

The results on the modulation of TR α 1 by T3 compelled us to perform experiments using TR $\alpha^{0/0}$ and TR $\beta^{-/-}$ mice, representing constitutive models of *Thra* and *Thrb* knockout animals (Gauthier et al, 1999; Gauthier et al, 2001). In addition, given that *Thra* but not *Thrb* mRNA expression is enriched in SCs (Table S3), we also used a model of inducible TR α 1-dominant negative expression (TRami) (Quignodon et al, 2007) crossed with the *Lgr5*-EGFP animals, to induce the loss of TR α 1 activity specifically in the SCs.

First of all we analyzed the developmental characteristics of organoids from TR $\alpha^{0/0}$ and TR $\beta^{-/-}$ crypt cultures over time. While TR $\beta^{-/-}$ crypts behaved in similar manner than the WT crypts in terms of growth and buddings formation, TR $\alpha^{0/0}$ crypts had delayed development and growth profile with simple structures remaining for longer time and complex organoids forming more slowly (Figure 6A,B). However at D7 all genotypes had complex organoids but when we counted the number of buddings per organoid we observed that TR $\alpha^{0/0}$ had decreased number compared with WT or TR $\beta^{-/-}$ organoids at D2 and D4 (Figure 6C). We also analyzed the extent of the phenotypic changes induced by continuous T3 treatment in organoids of different genotype. Surprisingly, compared with WT organoids both TR α and TR β knockout organoids displayed a reduced response to T3 and the percentage of complex organoids was higher in both genotypes than in T3-treated WT organoids (Figure 6B, S7). The number of buddings per organoid resulted strongly and significantly reduced in WT organoids but this reduction was less important in both TR $\alpha^{0/0}$ and TR $\beta^{-/-}$ organoids and only in TR $\beta^{-/-}$ the difference was statistically significant (Figure 6C). When we analyzed the expression of stem and progenitors markers, with the exception of *Olfm4*, we could observe that the response to T3 in TR $\alpha^{0/0}$ organoids was impaired or absent at both D2 and D4 (Figure S8), clearly indicating a major implication of this receptor in the observed T3-dependent phenotype.

To more precisely link TR α 1 expression and activity to T3-dependent phenotype we induced the expression of the TRami allele in the SCs by using the TRami/*Lgr5*-EGFP/*Rosa*-Tomato triple transgenic animals. The efficiency of the induction of the TRami allele by tamoxifen was validated by PCR on genomic DNA and by live microscopy by the analysis of the presence of Tomato/GFP positive cells (Figure 7A, S9A,B). We also confirmed the effect of TRami expression on mRNA levels of direct TR α 1 target gene *Cttnb1* (β -catenin), on Wnt and Notch targets *Ccnd1* (Cyclin D1) and *Hes1* respectively. As expected, the expression of all these genes were decreased at the different time points upon 4-OH tamoxifen treatment compared to control untreated organoids. In parallel, we also observed a progressive decrease of several SC markers such as *Lgr5*, *Ascl2*, *Olfm4* and *mTert* mRNA levels (Figure S9C). We also used an approach of TRami induction in animals *in vivo* previous to organoids cultures. For this aim tamoxifen was injected to TRami/*Lgr5*-EGFP/*Rosa*-Tomato triple transgenic animals and the intestine recovered to perform crypt cultures over time and analyze the response to T3 *ex vivo*. Compared with oil-injected control animals, TRami cultures showed a strong delay in organoid formation and on complex structures development (Figure 7A,B, S10A,B). In addition, T3 treatment in tamoxifen-induced TRami compared with oil-injected animals was poorly efficient in inducing the T3 phenotype *ex vivo* (Figure 7B, S10A,B), strongly indicating that the loss of TR α 1 activity results in the overall loss of T3 action in organoids.

Altogether the data indicate that T3 treatment in organoids induces a "thyroid shock" recapitulated by the induction of T3-metabolizing enzymes and T3 transporters together with a reduction in the level of TR α 1. The lowered levels or activity of TR α 1 lead to decreased stemness and pushes SCs into the differentiation program.

Molecular mechanisms linked to the observed T3 phenotype *ex vivo*

The previous results indicated that early events occur on T3-treated organoids that are responsible for the overall late phenotype. To specifically define the short-term effects of T3 treatment we analysed at mRNA level the expression of TH signaling, cell proliferation and stem cell markers (Figure 8A-C). We observed that the most early response was in *Dio1* and *Mct10* expression, that were both upregulated in T3-treated organoids starting from 3h after treatment onwards (Figure 8B). CyclinD1 (*Ccnd1*) was upregulated after a few hours of T3-treatment and remained up-regulated at longer time points (Figure 8C) and SC markers started to decrease from 10 hours after treatment being more clearly affected 24 hours after treatment (Figure 8B). We decided to use an approach of RNA-seq on organoids maintained in control condition or treated with T3 for 17 hours, when the molecular features linked to SCs start to appear but the phenotype is not yet established.

We used statistical approaches to identify significant differentially expressed (DE) genes and retained only the genes presenting a Log_2 fold change >0.5 and a p-value <0.05 (Table S4). The hierarchical clustering clearly grouped the genes depending on the culture conditions (not shown), while the gene ontology (GO) analysis identified biological functions that were significantly associated with the dataset, which included among others stress response and metabolism (Figure S11A,B; Table S4). Molecular pathways that were significantly represented within the DE genes included retinoic acid signaling and xenobiotics (down-regulated) as well as Toll-like receptor cascade and various transporter-types (up-regulated) (Table S4). Finally, bioinformatics analysis revealed a network of functionally linked downregulated genes encoding SC markers and/or linked to SC biology (Figure 8H). We also performed gene set enrichment analysis (GSEA) to compare our DE genes with genes preferentially expressed in SCs or in progenitor cells (Figure 8D). In accordance with our results on the phenotype of the organoids, the DE-upregulated genes of our analysis

significantly associated with a progenitor-type molecular signature (Figure 8E), while the DE-downregulated genes significantly associated with SC molecular signature (Figure 8F).

These analyses indicate that 17 hours of T3 treatment induces the "thyroid shock" through a complex response that includes a stress response and a metabolic challenge responsible for the late observed phenotype.

Relevance of the observations in animals *in vivo*

In order to analyze the impact of T3 treatment on SCs and progenitors in animals *in vivo*, we treated the *Lgr5*-EGFP animals and recovered the intestine two days after treatment. We analyzed the proliferative and differentiation properties of the intestine by IF on sections. As expected from our previous studies (Kress et al, 2009; Plateroti et al, 2006), T3 treatment induced an increased percentage of PCNA-positive proliferating crypt cells (Figure 9A). Contrariwise to what observed in organoids, T3 injections had not a negative impact on SC number as analyzed by cytometry (not shown) or immunolabeling (Figure 9B). Finally, the analysis of differentiation markers indicated that T3 injection didn't result in an overt difference between T3-treated and untreated animals (Figure 9C).

The observations in animals *in vivo* point to an epithelial-cell autonomous and non-autonomous function of T3 on progenitors and on SCs. Protective mechanisms *in vivo* may account for the lack of SC exhaustion observed *ex vivo* in organoids.

Discussion

Despite the increasing data on the effect of altered TH levels or TR α 1 expression in intestinal development and homeostasis in mammals, specific analysis of their function in SCs had not been performed. On the contrary, we had a thorough analysis of their function in inducing adult intestinal structuration and SC appearance in amphibians during metamorphosis (Frau et al, 2017; Ishizuya-Oka et al, 2009; Shi et al, 2011). These data strongly compelled us to study the effect of T3 treatment in intestinal organoids, that represent a classical approach for study SC self-renewal and multipotency properties (Sato et al, 2009), and followed the impact of a continuous T3 treatment in the structuration and growth over time in culture. We also benefited to the use of the *Lgr5*-EGFP mice that enable to specifically tracking and targeting the SCs (Barker et al, 2007). Surprisingly, we observed a complex response to T3 depending on the time in culture. During the first 2 days, the proliferation and cell death were accelerated, indicating an increased turnover as previously described (Kress et al, 2009; Plateroti et al, 2006). However, the organoid model, that is a simplified mini-gut composed of the epithelium alone (Date & Sato, 2015), is probably not efficient in overcome this acceleration and/or the lack of important signals from the niche as it has been shown for *Math1*-deficient animals (Durand et al, 2012) and we observed a progressive stem cell exhaustion and precocious organoids death compared with the untreated counterpart. This result is different from the one obtained by treating animals *in vivo*, even if we only analyzed one time point and didn't perform long-time treatment. However, 2 days of T3 treatment didn't result in any overt SC alteration (number or decrease of markers) but we observed a similar increase in cell proliferation, probably reflecting an increase in the transit amplifying (TA) cells (Barker, 2014; Gehart & Clevers, 2019; van der Flier & Clevers, 2009). These similarities *in vivo* and in *ex vivo* underline that T3 acts in a epithelial-cell autonomous manner in inducing an increase in cell proliferation resulting in an amplification of the

progenitor pool in both cases. A clear-cut and somehow paradoxical effect of T3 on SC activity came from colony efficiency experiments, in which T3 is able to prime/reprogram cells to increase their stemness. This is the first example of such an action of T3 on mammalian intestinal SCs. A more detailed analysis is necessary, however, to unveil the mechanisms by which this hormone acts on SCs and/or early progenitors and eventually define if T3 has a similar role in dedifferentiation as it has been described for amphibians (Ishizuya-Oka et al, 2009).

The actions of T3 in the intestinal epithelial crypt cells depends mainly on TR α 1, which is expressed by all the cells present within this compartment, specifically enriched in SC and progenitors (Table S3). Surprisingly, we also observed that TR β receptor-type might participate to the T3-dependent organoids phenotype, given that the altered morphology and the progressive loss of SCs is less important in TR β ^{-/-} compared to WT organoids cultures. Considering that TR α 1 is enriched in precursors cells while TR β is enriched in differentiated cells (Sirakov et al, 2014), we can hypothesize that the activity of both receptor-type in the presence of T3, may contribute to the phenotype. It is also worth noting that a functional redundancy has been described for the two T3 receptor subtypes in the intestine of TR α ^{-/-} animals, displaying a peculiar and very strong phenotype (Plateroti et al, 1999). Redundancy has also been shown in the case of gene expression in liver of TR β ^{-/-} animals in regard to *Dio1* expression (Gullberg et al, 2002) or in epidermal cell proliferation (Contreras-Jurado et al, 2011; Contreras-Jurado et al, 2014). In addition, constitutive KO animals very often present an adaptive response to gene loss that can involve new acquired functions of homologous genes as it has been described for the genes encoding for retinoic acid nuclear receptors RAR (Benbrook et al, 2014) or for the Notch genes (Riccio et al, 2008). Nevertheless, the self-renewal capacity in organoids, measured by the number of buddings per organoid at different

time point, unveil that $TR\alpha^{0/0}$ organoids have a lower stem capacity at almost every time analyzed, while the $TR\beta^{-/-}$ behaves as the WT. In addition, while T3 has a strong and significant impact on this same parameter in both WT and $TR\beta^{-/-}$ organoids over the time of treatment, $TR\alpha^{0/0}$ organoids showed a similar but not significant trend. Finally, the induction of a $TR\alpha$ -dominant negative protein within the SCs definitively confirmed the importance of this nuclear receptor in intestinal SC biology, also reinforced by the fact that they almost completely lose the ability to respond to T3 and do not display the typical T3 phenotype.

The comparative transcription profile analysis we performed helped to understand the T3 phenotype in organoids. We decided to analyze short-term effects of T3 before the onset of the overt phenotype. First of all, we confirmed by a molecular point of view that at this early time, when the morphology is intact, there is an enrichment in markers of progenitors and an impoverishment in SC markers, in agreement with the late phenotype. Looking in more detail, among the functions highly represented within the differentially regulated genes (up and down) we could find stress regulators, transporters and metabolism. For the metabolism, in particular, it was evident that enzymes involved in energy metabolism, including glycolysis and lipid metabolism, were strongly represented. This high metabolic response is in line with the function of T3 as metabolic hormone (Cicatiello et al, 2018; Mullur et al, 2014) and with the observed phenotype at early time point of T3 treatment with the accelerated cell turnover. The stress response could be linked, on the other hands, to SC progressive exhaustion. It is worth noting, however, that pathways such as Wnt or Notch that have already been described as targets of TH/ $TR\alpha$ 1 (Frau et al, 2017; Kress et al, 2009; Kress et al, 2010; Plateroti et al, 2006; Sirakov et al, 2015) do not appear as the most significantly affected at this time point. Nevertheless, in the analysis of disease perturbations correlated with our list of DE genes,

Wnt/ β -catenin-linked pathologies (essentially colorectal cancer) are present and are in agreement with our previous studies (Kress et al, 2010; Uchuya-Castillo et al, 2018).

In conclusion our data on T3 and TR α 1 on intestinal crypt SCs point to complex and epithelial cell-autonomous as well as non-autonomous effects. From the one hand, TR α 1 has a primary and direct effect on stem and progenitor cells and it is important for SC maintenance and biology. In the other hand, we also unveiled a novel function of TR β acting probably through differentiated cells to participate to the homeostasis of SCs. Next steps will include isolation and study the various functions of T3 in specific cell populations in order to better define specific actions on specific cell types. Given that SCs have been clearly identified as the cells of origin of cancers in the intestine (Barker et al, 2009), new advances will help developing new tools in the field of precision medicine to target specific cell types where the T3 has a pro-tumoral impact while preserving the other intestinal epithelial cell types.

Acknowledgements

We are grateful to Manon Prativiel for her assistance with animal handling and care within the animal facilities AniCan (CRCL). We also acknowledge the imaging, cytometry and small animal histology platforms (CRCL, CLB).

The work was supported by Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (grant No PGA1201402000834), by the Département du Rhône de la Ligue contre le cancer (grant No 172190) and by the FRM (Equipes FRM 2018, DEQ20181039598). MG and MVG received support by the FRM; CF received support from the Centre Leon Berard.

Conflict of interest

The authors have no competing interests.

References

- Barker N (2014) Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature reviews Molecular cell biology* **15**: 19-33
- Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ, Clevers H (2009) Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* **457**: 608-611
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**: 1003-1007
- Benbrook DM, Chambon P, Rochette-Egly C, Asson-Batres MA (2014) History of retinoic acid receptors. *Sub-cellular biochemistry* **70**: 1-20
- Brent GA (2012) Mechanisms of thyroid hormone action. *The Journal of clinical investigation* **122**: 3035-3043
- Cicatiello AG, Di Girolamo D, Dentice M (2018) Metabolic Effects of the Intracellular Regulation of Thyroid Hormone: Old Players, New Concepts. *Frontiers in endocrinology* **9**: 474
- Contreras-Jurado C, Garcia-Serrano L, Gomez-Ferreria M, Costa C, Paramio JM, Aranda A (2011) The thyroid hormone receptors as modulators of skin proliferation and inflammation. *The Journal of biological chemistry* **286**: 24079-24088
- Contreras-Jurado C, Garcia-Serrano L, Martinez-Fernandez M, Ruiz-Llorente L, Paramio JM, Aranda A (2014) Impaired hair growth and wound healing in mice lacking thyroid hormone receptors. *PloS one* **9**: e108137
- Date S, Sato T (2015) Mini-gut organoids: reconstitution of the stem cell niche. *Annual review of cell and developmental biology* **31**: 269-289
- Davis PJ, Davis FB, Mousa SA, Luidens MK, Lin HY (2011) Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annual review of pharmacology and toxicology* **51**: 99-115
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**: 15-21
- Durand A, Donahue B, Peignon G, Letourneur F, Cagnard N, Slomianny C, Perret C, Shroyer NF, Romagnolo B (2012) Functional intestinal stem cells after Paneth cell ablation induced by the loss of transcription factor Math1 (Atoh1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 8965-8970
- Fabregat A, Sidiropoulos K, Garapati P, Gillespie M, Hausmann K, Haw R, Jassal B, Jupe S, Korninger F, McKay S, Matthews L, May B, Milacic M, Rothfels K, Shamovsky V, Webber M, Weiser J, Williams M, Wu G, Stein L, Hermjakob H, D'Eustachio P (2016) The Reactome pathway Knowledgebase. *Nucleic acids research* **44**: D481-487

Frau C, Godart M, Plateroti M (2017) Thyroid hormone regulation of intestinal epithelial stem cell biology. *Molecular and cellular endocrinology* **459**: 90-97

Gauthier K, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Legrand C, Pain B, Rousset B, Weiss R, Trouillas J, Samarut J (1999) Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *The EMBO journal* **18**: 623-631

Gauthier K, Plateroti M, Harvey CB, Williams GR, Weiss RE, Refetoff S, Willott JF, Sundin V, Roux JP, Malaval L, Hara M, Samarut J, Chassande O (2001) Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus. *Molecular and cellular biology* **21**: 4748-4760

Gehart H, Clevers H (2019) Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* **16**: 19-34

Grontved L, Waterfall JJ, Kim DW, Baek S, Sung MH, Zhao L, Park JW, Nielsen R, Walker RL, Zhu YJ, Meltzer PS, Hager GL, Cheng SY (2015) Transcriptional activation by the thyroid hormone receptor through ligand-dependent receptor recruitment and chromatin remodelling. *Nature communications* **6**: 7048

Gullberg H, Rudling M, Salto C, Forrest D, Angelin B, Vennstrom B (2002) Requirement for thyroid hormone receptor beta in T3 regulation of cholesterol metabolism in mice. *Molecular endocrinology* **16**: 1767-1777

Hammes SR, Davis PJ (2015) Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* **29**: 581-593

Han SH, Shim S, Kim MJ, Shin HY, Jang WS, Lee SJ, Jin YW, Lee SS, Lee SB, Park S (2017) Long-term culture-induced phenotypic difference and efficient cryopreservation of small intestinal organoids by treatment timing of Rho kinase inhibitor. *World journal of gastroenterology* **23**: 964-975

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

Huang J, Guo X, Li W, Zhang H (2017) Activation of Wnt/beta-catenin signalling via GSK3 inhibitors direct differentiation of human adipose stem cells into functional hepatocytes. *Scientific reports* **7**: 40716

Ishizuya-Oka A, Hasebe T, Buchholz DR, Kajita M, Fu L, Shi YB (2009) Origin of the adult intestinal stem cells induced by thyroid hormone in *Xenopus laevis*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**: 2568-2575

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

- Kalyanaraman H, Schwappacher R, Joshua J, Zhuang S, Scott BT, Klos M, Casteel DE, Frangos JA, Dillmann W, Boss GR, Pilz RB (2014) Nongenomic thyroid hormone signaling occurs through a plasma membrane-localized receptor. *Science signaling* **7**: ra48
- Kim JY, Jeong HS, Chung T, Kim M, Lee JH, Jung WH, Koo JS (2017) The value of phosphohistone H3 as a proliferation marker for evaluating invasive breast cancers: A comparative study with Ki67. *Oncotarget* **8**: 65064-65076
- Kress E, Rezza A, Nadjar J, Samarut J, Plateroti M (2009) The frizzled-related sFRP2 gene is a target of thyroid hormone receptor alpha1 and activates beta-catenin signaling in mouse intestine. *The Journal of biological chemistry* **284**: 1234-1241
- Kress E, Skah S, Sirakov M, Nadjar J, Gadot N, Scoazec JY, Samarut J, Plateroti M (2010) Cooperation between the thyroid hormone receptor TRalpha1 and the WNT pathway in the induction of intestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* **138**: 1863-1874
- Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, Koplev S, Jenkins SL, Jagodnik KM, Lachmann A, McDermott MG, Monteiro CD, Gundersen GW, Ma'ayan A (2016) Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic acids research* **44**: W90-97
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**: 923-930
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* **15**: 550
- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H (2010) A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature neuroscience* **13**: 133-140
- Mi H, Lazareva-Ulitsky B, Loo R, Kejariwal A, Vandergriff J, Rabkin S, Guo N, Muruganujan A, Doremioux O, Campbell MJ, Kitano H, Thomas PD (2005) The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways. *Nucleic acids research* **33**: D284-288
- Mullur R, Liu YY, Brent GA (2014) Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological reviews* **94**: 355-382
- Nielsen PS, Riber-Hansen R, Jensen TO, Schmidt H, Steiniche T (2013) Proliferation indices of phosphohistone H3 and Ki67: strong prognostic markers in a consecutive cohort with stage I/II melanoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **26**: 404-413
- Noah TK, Donahue B, Shroyer NF (2011) Intestinal development and differentiation. *Experimental cell research* **317**: 2702-2710

- Plateroti M, Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Freund JN, Samarut J, Kedinger M (1999) Involvement of T3Ralpha- and beta-receptor subtypes in mediation of T3 functions during postnatal murine intestinal development. *Gastroenterology* **116**: 1367-1378
- Plateroti M, Gauthier K, Domon-Dell C, Freund JN, Samarut J, Chassande O (2001) Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development. *Molecular and cellular biology* **21**: 4761-4772
- Plateroti M, Kress E, Mori JI, Samarut J (2006) Thyroid hormone receptor alpha1 directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells. *Molecular and cellular biology* **26**: 3204-3214
- Qi Z, Li Y, Zhao B, Xu C, Liu Y, Li H, Zhang B, Wang X, Yang X, Xie W, Li B, Han JJ, Chen YG (2017) BMP restricts stemness of intestinal Lgr5(+) stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nature communications* **8**: 13824
- Quignodon L, Vincent S, Winter H, Samarut J, Flamant F (2007) A point mutation in the activation function 2 domain of thyroid hormone receptor alpha1 expressed after CRE-mediated recombination partially recapitulates hypothyroidism. *Molecular endocrinology* **21**: 2350-2360
- Riccio O, van Gijn ME, Bezdek AC, Pellegrinet L, van Es JH, Zimmer-Strobl U, Strobl LJ, Honjo T, Clevers H, Radtke F (2008) Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO reports* **9**: 377-383
- Sancho R, Cremona CA, Behrens A (2015) Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease. *EMBO reports* **16**: 571-581
- Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**: 262-265
- Shi YB, Hasebe T, Fu L, Fujimoto K, Ishizuya-Oka A (2011) The development of the adult intestinal stem cells: Insights from studies on thyroid hormone-dependent amphibian metamorphosis. *Cell & bioscience* **1**: 30
- Sirakov M, Boussouar A, Kress E, Frau C, Lone IN, Nadjari J, Angelov D, Plateroti M (2015) The thyroid hormone nuclear receptor TRalpha1 controls the Notch signaling pathway and cell fate in murine intestine. *Development* **142**: 2764-2774
- Sirakov M, Kress E, Nadjari J, Plateroti M (2014) Thyroid hormones and their nuclear receptors: new players in intestinal epithelium stem cell biology? *Cellular and molecular life sciences* : *CMLS* **71**: 2897-2907
- Spit M, Koo BK, Maurice MM (2018) Tales from the crypt: intestinal niche signals in tissue renewal, plasticity and cancer. *Open biology* **8**

- Supek F, Bosnjak M, Skunca N, Smuc T (2011) REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PloS one* **6**: e21800
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research* **43**: D447-452
- Tian H, Biehs B, Chiu C, Siebel CW, Wu Y, Costa M, de Sauvage FJ, Klein OD (2015) Opposing activities of Notch and Wnt signaling regulate intestinal stem cells and gut homeostasis. *Cell reports* **11**: 33-42
- Uchuya-Castillo J, Aznar N, Frau C, Martinez P, Le Neve C, Marisa L, Penalva LOF, Laurent-Puig P, Puisieux A, Scoazec JY, Samarut J, Ansieau S, Plateroti M (2018) Increased expression of the thyroid hormone nuclear receptor TRalpha1 characterizes intestinal tumors with high Wnt activity. *Oncotarget* **9**: 30979-30996
- Umar S (2010) Intestinal stem cells. *Current gastroenterology reports* **12**: 340-348
- van der Flier LG, Clevers H (2009) Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual review of physiology* **71**: 241-260
- van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, Cozijnsen M, Robine S, Winton DJ, Radtke F, Clevers H (2005) Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**: 959-963
- VanDussen KL, Carulli AJ, Keeley TM, Patel SR, Puthoff BJ, Magness ST, Tran IT, Maillard I, Siebel C, Kolterud A, Grosse AS, Gumucio DL, Ernst SA, Tsai YH, Dempsey PJ, Samuelson LC (2012) Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development* **139**: 488-497
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, 3rd, Nusse R (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**: 448-452
- Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ, Zoghbi HY (2001) Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* **294**: 2155-2158
- Yin X, Farin HF, van Es JH, Clevers H, Langer R, Karp JM (2014) Niche-independent high-purity cultures of Lgr5+ intestinal stem cells and their progeny. *Nature methods* **11**: 106-112
- Zhang L, Valdez JM, Zhang B, Wei L, Chang J, Xin L (2011) ROCK inhibitor Y-27632 suppresses dissociation-induced apoptosis of murine prostate stem/progenitor cells and increases their cloning efficiency. *PloS one* **6**: e18271

Figure Legends

Figure 1. Analysis of growth potentialities and features of cultured crypts. A,B) Crypts were prepared from WT intestine and maintained in culture for several days in the absence (Control) or presence of 10^{-7} M T3 as indicated, allowing complex organoid development and structuration. Pictures in (A) have been taken under inverted microscope at the indicated days after the start of the culture, and are representative of three/four independent experiments, each conducted on six replicates. Bar= 30 μ m, magnification insets 15 μ m). B) The number of simple structure (spheres) or organoids of increasing complexity (1 or 2 buds, more than 3 buds) were scored under the inverted microscope during seven days of culture. Multilayered histograms represent the mean \pm SD, n=6, of each counted structure in the cultured crypts in control or T3 condition. (C) Ki67 and Cleaved-caspase 3 immunolabeling of proliferating or apoptotic cells in organoids in control or T3 condition, as indicated, at D2 and D4 time-points. Images show merged specific immunolabeling (red) and nuclear staining (blue). Bar= 20 μ m. D) Western-blot analysis of Histone H3, Cleaved-caspase 3 levels in organoids in control or T3 condition, as indicated, at D2 and D4. Actin was used as the loading control. Pictures are representative of two independent experiments.

Figure 2. T3 treatment in organoids induces unbalanced epithelial cell differentiation.

A) RT-qPCR experiments were performed to analyse the expression of markers of early epithelial progenitors (*Math1*, *Hes1*), committed progenitors of different lineages (*Elf3*, *Klf4*, *Ngn3*, *Sox9*) and of differentiated cells (*Fabp2*, *Muc1*, *Lyz*, *Gcg*) in control or T3 conditions, as indicated at D2 and D4. Histograms represent mean \pm SD, N=4, after normalization with *Ppib*. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$ and ***, $P<0.001$ compared to the respective control condition. The result is representative of two independent experiments. B) Analysis of mucus-producing goblet cells differentiation in organoids maintained in control or T3 conditions, as indicated,

at D4. Upper panel shows mucus cells stained with PAS or by immunolabelling with anti-MUC2 antibodies (the images show merged MUC2 (red) and nuclear staining (blue)). Bar= 10 μ m. Histograms in the lower panel (mean \pm SD) summarize the quantification of PAS-cells positive in organoids depending on the culture condition. Approximately 50 organoids per condition were scored from pictures by ImageJ software.

Figure 3. Effect of T3 treatment of organoids on intestinal stem cells. A,B) Analysis of GFP-expressing stem cells performed by inverted microscope (A) or by Flow cytometry (B). Representative pictures of brightfield or GFP-fluorescence have been taken under a Zeiss AxioVert inverted microscope in control or T3 conditions, as indicated, at D2 and D4. Bar= 15 μ m. Pictures are representative of four independent experiments. Cytometry analysis (B) has been performed in single-cell dissociated organoids at the indicated days of T3 treatment. C) RT-qPCR analysis of the indicated stem cell markers in control or T3 conditions at D2 and D4. Histograms represent mean \pm SD, N=4, after normalization with *Ppib*. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$ and ***, $P<0.001$ compared to the respective control condition. The result is representative of two independent experiments. D) Western-blot analysis of GFP protein levels in the organoids maintained in control or T3 conditions, as indicated, at D2 and D4 conditions. Actin was used as the loading control. Image is representative of two independent experiments. E,F) Colony assay performed on single cells dissociated from organoids maintained 2 days in culture in control or T3 condition. 5000 cells were cultured in Matrigel in control (Control_Control, T3_Control) or T3 condition (Control_T3, T3_T3) as indicated. Pictures in (E) have been taken under a Zeiss AxioVert inverted microscope at D7. Bar= 15 μ m. Pictures are representative of four independent experiments each conducted in four replicates. Histograms in (F) show the colony number formed (upper panel) and the number of buddings per organoid (lower panel) in each condition after 7 days in culture. Bars

represent mean \pm SD, N=4. *, $P<0.05$ and ***, $P<0.001$ compared to Control_Control; \$\$\$, $P<0.001$ compared with Control_T3.

Figure 4. Rescuing of the organoids' T3 phenotype by VPA. A) Replicated organoids have been cultured during 4 days (D4) in the absence (Control) or presence of 10^{-7} M T3, of 0.5mM of VPA or T3+VPA as indicated. The brightfield or GFP-fluorescence pictures have been taken under a Zeiss AxioVert inverted microscope and are representative of three independent experiments, each conducted on six replicates Bar= 10 μ m. Histograms in the lower panel show the percentage of normal-shaped organoids in the different culture conditions compared with the untreated-control condition. Bars represent mean \pm SD, N=20. **, $P<0.01$ and ***, $P<0.001$ compared to control condition. B) RT-qPCR experiments were performed to analyse the expression of stem cell markers (*Lgr5*, *Olfm4*, *Ascl2* and *mTert*), of early epithelial progenitors (*Math1*, *Hes1*), committed progenitors of different lineages (*Elf3*, *Klf4*, *Ngn3*, *Sox9*) and of differentiated cells (*Fabp2*, *Muc1*, *Lyz*, *Gcg*) in the different culture conditions, as indicated, at D4. Histograms represent mean \pm SD, N=4, after normalization with *Ppib*. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$ and ***, $P<0.001$ compared to control condition; \$\$, $P<0.01$ and \$\$\$, $P<0.001$ compared to T3 condition and €, $P<0.01$ compared to VPA. The result is representative of two independent experiments. C) Analysis of proliferating Ki67- positive cells in organoids maintained in different conditions, as indicated, at D4. The images show merged Ki67 (red) and nuclear staining (blue). Bar= 20 μ m.

Figure 5. Analysis of TH-dependent signaling in organoids. A) RT-qPCR analysis of different TRs (TR α 1, TR α 2 and TR β 1) of the TH-metabolizing enzyme Dio1 and on the transporters (Mct8 and Mct10) in control or T3 conditions at D2 and D4. Histograms represent mean \pm SD, N=4, after normalization with *Ppib*. **, $P<0.01$ compared to the

respective control condition. The result is representative of two independent experiments. (B) PCNA (proliferating cells) and TR α 1 immunolabeling in organoids in control or T3 condition, as indicated, at D2 and D4 time-points. Images show merged specific immunolabeling (red) and nuclear staining (blue). Pictures are representative of three independent experiments each conducted in six replicates. Bar= 20 μ m. C) Western-blot analysis of TR α 1 levels in organoids in control or T3 condition, as indicated, at D2 and D4. Actin was used as the loading control. Pictures are representative of two independent experiments. + Ctrl: Caco2 cells transfected with a TR α 1-expression vector; MW, molecular weight marker.

Figure 6. Involvement of TR subtypes in the T3-dependent phenotype of organoids. A,B) Crypts were prepared from WT, TR $\alpha^{0/0}$ and TR $\beta^{-/-}$ intestines and maintained in culture for several days in the absence (Control) or presence of 10^{-7} M T3 as indicated, allowing complex organoid development and structuration. Multilayered histograms in (A) represent the mean \pm SD, n=6, of each counted structure in the cultures from different genotype maintained in control or T3 condition. In (B) The number of simple structure (spheres) or organoids of increasing complexity (1 or 2 buds, more than 2 buds) were scored under the inverted microscope during seven days of culture. Multilayered histograms in (A) represent the mean \pm SD, n=6, of each counted structure in the cultured crypts in control or T3 condition. **, $P<0.01$ and ***, $P<0.001$ TR $\alpha^{0/0}$ compared with WT; \$\$, $P<0.01$ and \$\$\$, $P<0.001$ TR $\beta^{-/-}$ compared to WT. C) The number of buddings per organoid has been scored at different time points in cultures organoids of different genotype in control and T3 condition, as indicated. **, $P<0.01$ compared to control condition of the same genotype; \$, $P<0.05$ compared to control of WT and TR $\beta^{-/-}$ genotypes.

Figure 7. Inducible TR α 1-dominant negative expression has a negative effect on organoids development and structuration. A) Crypts were prepared from TRami/*Lgr5*-EGF/*Rosa*-Tomato intestines. Animals received Tamoxifen injection before sacrifice (1 daily injection during 5 days of 100 μ l of a solution 10mg/ml). Cultures were maintained for several days in the absence (Control) or presence of 10^{-7} M T3 as indicated. Tamoxifen injections induced deletion of floxed sites enabling the expression of Tomato protein (red fluorescence) as well as of the TRami allele. Pictures have been taken under inverted microscope at the indicated days after the start of the culture, and are representative of two independent experiments, each conducted on six replicates (Bar=50 μ m). Note that each organoid visualized by brightfield microscopy expresses the GFP and co-stain for Tomato demonstrating the efficiency of recombination. At D4 and D7 almost all the cells composing the organoids express the Tomato protein, clearly indicating that the primary recombination event was in SCs. B) The number of simple structure (spheres) or organoids of increasing complexity (1 or 2 buds, more than 2 buds) were scored under the inverted microscope during seven days of culture. TRami/*Lgr5*-EGFP/*Rosa*-Tomato animals were injected with Tamoxifen or with the vehicle (sunflower oil, negative control) as indicated. Multilayered histograms (upper panel) and bar lines (lower panel) represent the mean \pm SD, n=6, of each counted structure in the cultured crypts in control or T3 condition. **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$ T3 oil compared with control oil; compared to control condition; \$\$\$, $P < 0.001$ control Tam compared with Control oil; €, $P < 0.01$ and €, €, $P < 0.001$ T3 Tam compared with control oil.

Figure 8. Comparative transcription profile analysis of T3-treated organoids by RNA-seq study. A) Replicated WT organoids have been cultured for different length of time up to 24h in the absence (Control) or presence of 10^{-7} M T3, as indicated. The pictures have been

taken under a Zeiss AxioVert inverted microscope and are representative of three independent experiments, each conducted on six replicates. Bar= 30µm. B) RT-qPCR experiments were performed to analyse the expression of stem cell markers (*Lgr5*, *Olfm4*, *Ascl2* and *mTert*), of early epithelial progenitors (*Math1*, *Hes1*), committed progenitors of different lineages (*Elf3*, *Klf4*, *Ngn3*, *Sox9*) and of differentiated cells (*Fabp2*, *Muc2*, *Lyz*, *Gcg*) at different time points, as indicated. C) Same analysis as in (B) on TH metabolizing enzyme *Dio1* and transporter *Mct10* used as positive control for the efficiency of T3 treatment. *Ccnd1* (Cyclin D1) was used as proliferative marker. Histograms represent mean ± SD, N=4, after normalization with *Ppib*. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$ and ***, $P<0.001$ compared to the respective control condition. D-H) T3 treatment alters the expression of stem cell and progenitor genes. D) Diagram shows comparison between different datasets to evaluate the expression changes induced by T3 treatment. Our dataset was compared to two studies (GSE23672- Stem cells vs. progenitor cells and GSE25109 - Stem cells vs. Paneth Cells) and to the stem cell signature genes defined by Munoz et al. 2013. E) Venn diagrams show the overlaps between our dataset and GSE2367. Upregulated set in our analysis shows a large number of genes highly expressed in progenitor cells while the downregulated set is similar to the gene set expressed in stem cell. F) Venn diagrams show comparison between downregulated genes in our dataset and “stem cell” signatures. p-values show significance of overlap based on the number of expressed and altered genes. G) Enriched gene ontology (GO) terms associated with “stem cell related genes” present in the downregulated set in our study. GO analysis was performed with Panther and GO terms were grouped using Revigo. H) Network of stem cell related genes present in the downregulated set. Analysis was performed with String. Different clusters are defined by colors and based on functional association.

Figure 9. Effect of T3 treatment *in vivo* on intestinal cell populations. A) Analysis of PCNA-positive proliferating cells in intestinal sections from *Lgr5*-EGFP animals in control or T3 condition, as indicated. PCNA-positive cells have been scored under a Zeiss imager microscope. Approximately 30 crypts were scored from three mice per condition (upper panel). The images in the lower panels show merged PCNA (red) and nuclear staining (blue). Pictures are representative of three different animals per condition. Bar= 10 μ m. B) GFP expressing stem cells have been monitored under the fluorescence microscope. Pictures are representative of three different animals per condition. Bar= 10 μ m, magnification insets 5 μ m. C) Analysis of differentiation markers in distal small intestinal sections of control or T3-treated mice as indicated. ANPEP (enterocytes), Lysozyme (LYZ, Paneth cells) and chromogranin A (CHGA, enteroendocrine cells) were analyzed by immunolabelling. The images show merged differentiation marker (red) and nuclear staining (blue). Bar= 10 μ m. Mucus-producing goblet cells were stained with PAS. Bar= 20 μ m. Pictures are representative of three different animals per condition.

Supplementary Figure Legends

Figure S1. Effect of T3 on intestinal organoids. A) Measurement of the number of normal-shaped organoids established from WT intestine. Organoids were maintained in control condition or treated with T3 at different concentrations (10^{-7} M, 10^{-8} M and 10^{-9} M), as indicated; the percentage of normal-shaped organoids was compared to control organoids after 4 days in culture. **, $P < 0.01$ compared with control; #, $P < 0.05$ compared with T3 10^{-9} M condition. This experiment enabled to choose the concentration of 10^{-7} M T3 for all the following studies. B) Time-course of fresh crypts isolated from WT intestine. Crypts were treated (T3) or not (Control) and developing structures were counted under a Zeiss AxioVert microscope. The percentage of spheres, simple organoids, 1-2 buds organoids and more complex organoids (>2buds) was evaluated every day during 1 week. **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$ compared with the respective control condition. C) Images of control and T3-treated organoids after replication (D0), 2 days (D2) and 4 days (D4) of culture. Bar= 30 μ m, magnification insets 15 μ m

Figure S2. Expression of differentiation markers in organoids. A) Analysis of differentiation markers in organoids paraffin sections in control or T3-treated condition, as indicated. ANPEP (enterocytes), Lysozyme (LYZ, Paneth cells) and chromogranin A (CHGA, enteroendocrine cells) were analyzed by immunolabelling. The images show merged differentiation marker (red) and nuclear staining (blue). Pictures are representative of three independent experiments. Bar= 10 μ m, magnification insets 5 μ m. B) Western-blot analysis of indicated proteins from control and T3-treated organoids after 2 and 4 days of culture (D2 and D4). Actin was used as loading control.

Figure S3. Action of T3 on stem cell compartment in organoids. A) Live GFP fluorescence analysis of fresh *Lgr5*-EGFP organoids cultured in presence or absence of T3 for 2 days (D2), 4 days (D4) and 7 days (D7). Bar= 10 μ m, magnification insets 5 μ m. B) Images show organoids replicated and cultured in presence or absence of T3 during 2 days (D2) before dissociation, filtering and counting (upper panel). Bar= 30 μ m, magnification insets 15 μ m. 5000 cells per well were plated and the images show the equivalence of the single cell cultures in each condition at the beginning of the cultures (lower panel). Bar= 15 μ m.

Figure S4. Rescuing experiments with growth factors and small molecules in organoids.

A,B) Analysis of the effect of growth factors or small molecules on the T3-dependent phenotype in organoids. A) Replicated organoids were maintained in control, T3 (10⁻⁷M), CHIR (1mM), Y27632 (10mM), T3 and CHIR (CHIR+T3), Y27632 and T3 (Y27632+T3) as indicated or B) Noggin (500ng/ml), Wnt3a (100ng/ml), T3 and Noggin5X (Noggin+T3), T3 and Wnt3a (Wnt3a+T3) for 4 days. Images are representative of two independent experiments. Bar= 30 μ m, magnification insets 15 μ m.

Figure S5. Expression of TR β 1 in organoids. Western-blot analysis of indicated proteins from WT or TR β ^{-/-} organoids, to confirm the specificity of the antibody used (left panel). TR β 1 levels were analyzed in control and T3-treated organoids, established from WT mice, after 2 and 4 days of culture (D2 and D4) (right panel). Actin was used as loading control. The images are representative of two independent experiments.

Figure S6. Analysis of different TH-related molecules in organoids. A) Replicated organoids were maintained in control, T3 (10⁻⁷M), T4 (10⁻⁶M), T2 (10⁻⁷M) or B) T3 and Tetrac (10⁻⁷M) (T3+Tetrac) for 4 days. The number of buds per organoid was evaluated for

each condition and compared to control organoids. Images are representative of two independent experiments. Bar= 30 μ m, magnification insets 15 μ m. ***, $P<0.001$ compared to the control or to T2 condition (A) or compared to the control condition (B).

Figure S7. Organoids development and structuration from TR $\alpha^{0/0}$ and TR $\beta^{-/-}$ animals.

Time course of fresh crypts isolated from TR $\alpha^{0/0}$ and TR $\beta^{-/-}$ intestines as indicated. Crypts were treated (T3) or not (Control) and developing structures were counted under an AxioVert inverted microscope. The percentage of spheres, simple organoids (egg-shaped), 1-2 buds organoids and more complex organoids (>2buds) was evaluated every day during 1 week. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$ and ***, $P<0.001$ compared with the respective control condition.

Figure S8. mRNA analysis of markers of different epithelial cell populations in organoids.

Quantitative real-time PCR analysis of relative mRNA expression of SC markers (*Lgr5*, *mTert*, *Ascl2*, *Olfm4*), of early progenitors (*Hes1*, *Math1*), of engaged progenitors (*Ngn3*, *Sox9*, *Klf4*, *Elf3*) and of differentiated cells (*Fabp2*, enterocytes; *Muc2*, goblet cells; *Gcg*, enteroendocrine cells; *Lyz*, Paneth cells) in organoids cultured for 2 and 4 days (D2 and D4). Organoid samples were established from WT (blue), TR $\alpha^{0/0}$ (red) and TR $\beta^{-/-}$ (green) mice, replicated and maintained in presence or absence (C) of the T3 hormone. Histograms represent mean \pm SD, N=4, after normalization with *Ppib*. The expression value of each gene, for each genotype, is represented as fold change related to one sample of the control condition at D2. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$ and ***, $P<0.001$ compared to the respective control condition.

Figure S9. Generation and validation of the TRami/*Lgr5*-EGFP/*Rosa*-Tomato animals and organoids.

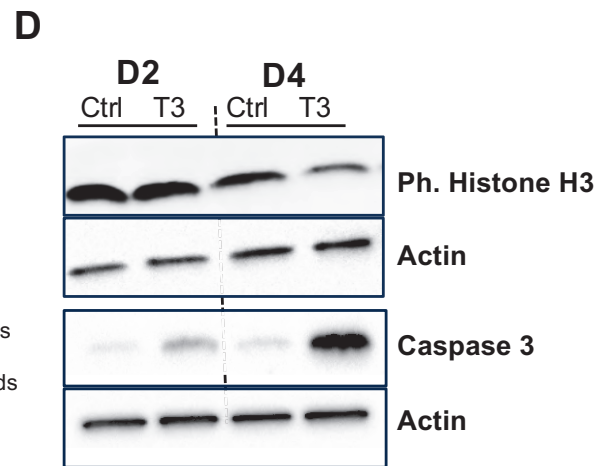
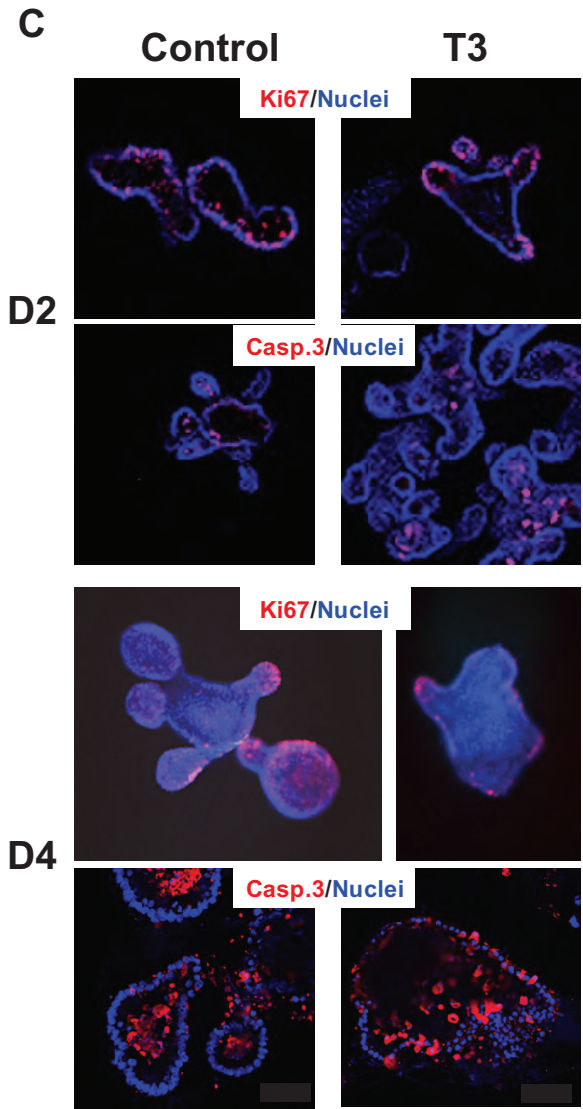
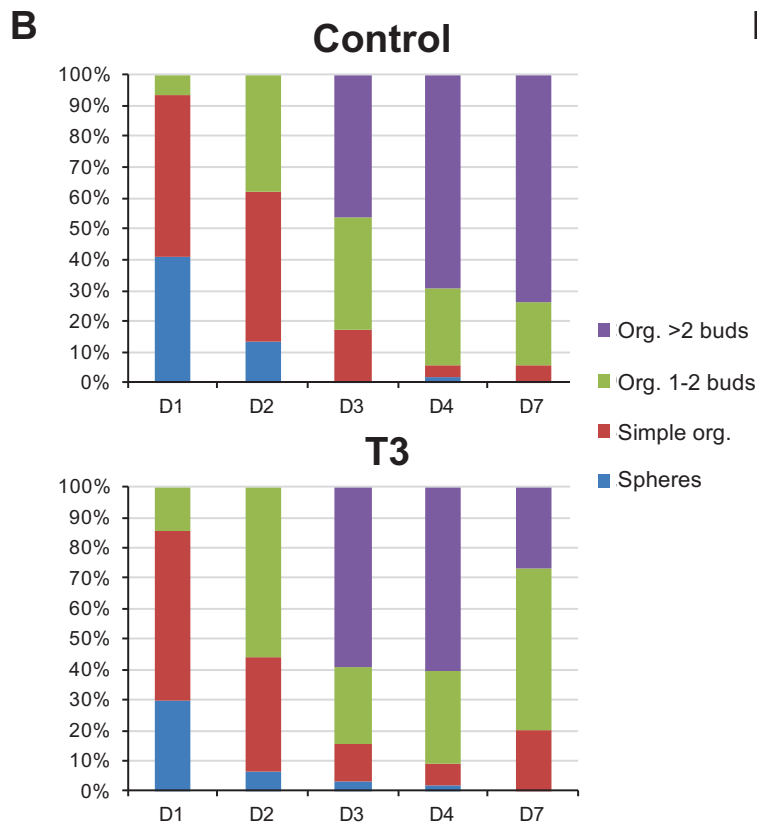
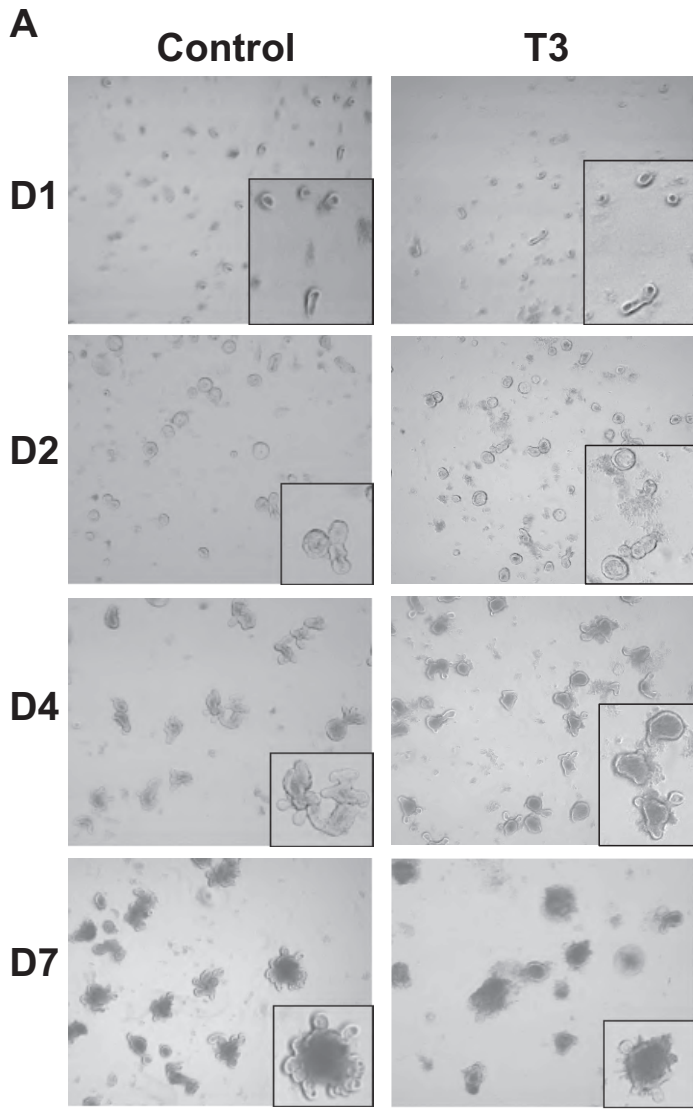
A, B) PCR analysis on gDNA from triple transgenic TRami/*Lgr5*-EGFP/*Rosa*-Tomato organoids from previously tamoxifen (A) or oil (B) injected animals.

Recombination of gDNA was evaluated after 4 days of culture and compared to controls (intestinal gDNA from TRami mice, intestinal gDNA from *Lgr5*-EGFP mice, PCR Mix). Combination of two (DE) or three (BDE) primers was used to amplify gDNA by PCR. In presence of Tamoxifen, 800bp amplicons were detected, revealing the presence of the recombined TRami allele (A) whereas they were not detected when mice were injected with oil (B). C) Effect of tamoxifen treatment on Trami/*Lgr5*-EGFP organoids. Organoids were established and maintained in control or treated with 4-OH Tamoxifen (0.2 mg/ml) and recovered after 3, 4, 5 and 6 days after treatment. RTqPCR analysis were performed to analyze expression levels of a direct TRα1 target (*Ctnnb1*), Wnt target (*Ccnd1*), Notch target (*Hes1*) and of SC markers (*Lgr5*, *mTert*, *Ascl2*, *Olfm4*). Histograms represent mean ± SD, N=4, after normalization with *Ppib*. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$ and ***, $P<0.001$ compared to the control condition.

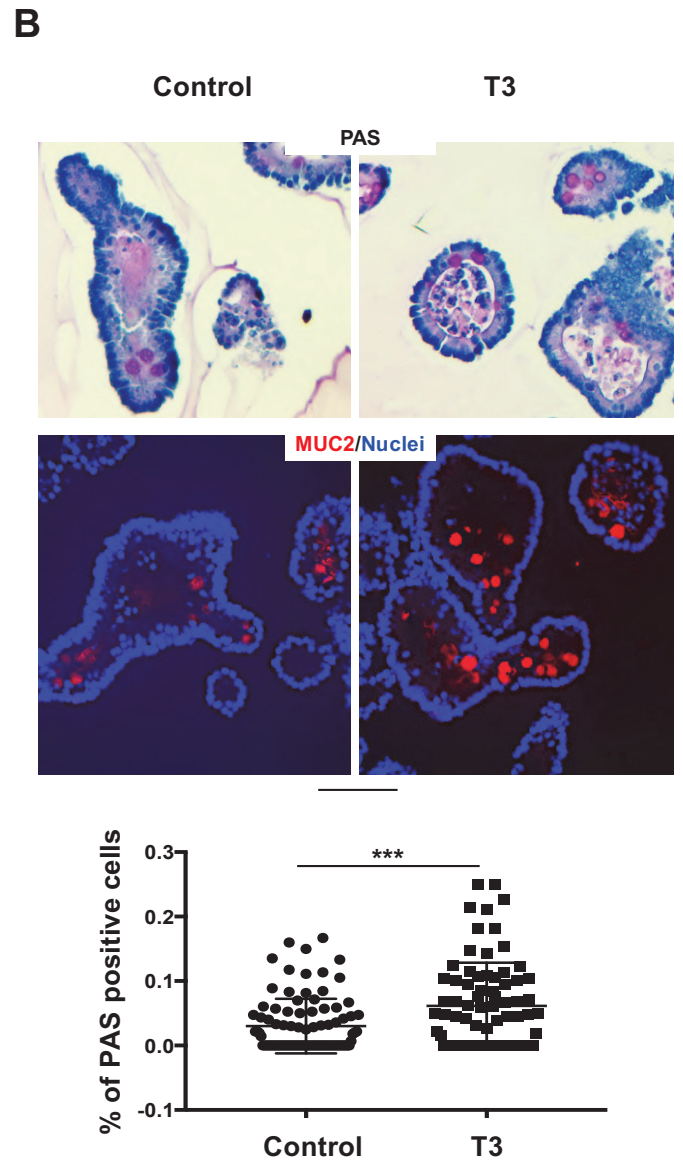
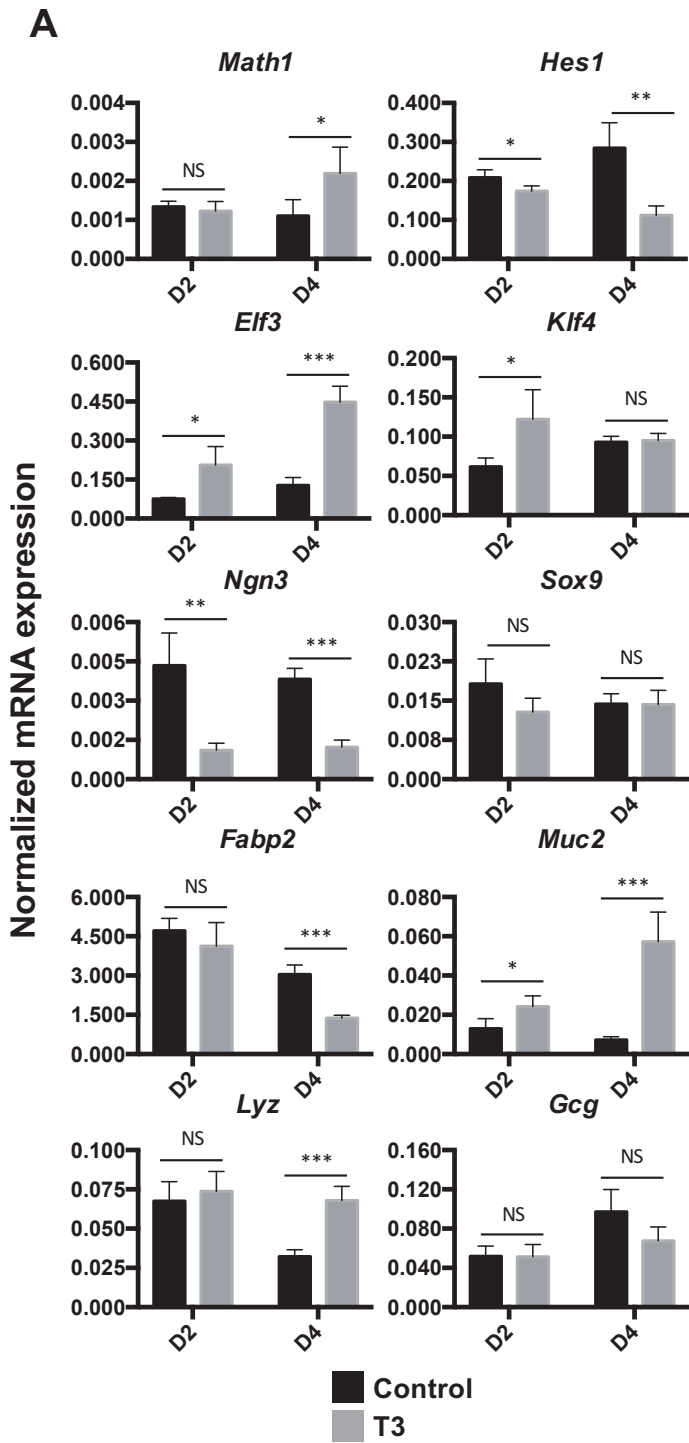
Figure S10. Phenotypic analysis of the TRami/*Lgr5*-EGFP/*Rosa*-Tomato organoids. A) Live GFP and RFP fluorescence analysis of fresh triple transgenic organoids established from oil-injected mice and observed after 2 days (D2), 4 days (D4) and 7 days (D7) of culture under an inverted Zeiss AxioVert microscope. No recombination can be observed in organoids established from oil-treated animals, confirmed by the absence of Tomato signal. Left: GFP, Middle: Tomato, Right: Brightfield. Pictures are representative of 2 independent experiments. Bar= 15µm, magnification insets 15µm. B) Time course of fresh crypts isolated from TRami/*Lgr5*-EGFP/*Rosa*-Tomato injected with oil or tamoxifen, as indicated. Crypts were treated (T3) or not (Control) and developing structures were observed after 1 day (D1), 2 days (D2), 4 days (D4) and 7 days (D7) of culture. Pictures are representative of 2 independent experiments. The insets focus on representative organoids cultured from each condition. Bar= 30µm, magnification insets 15µm.

Figure S11. Gene ontology and GSEA of the up regulated set. A,B) Gene Ontology (GO) terms enriched among genes showing increased (A) or decreased (B) expression upon treatment. GO enriched terms are summarized using REViGO (Supek *et al*, 2011).

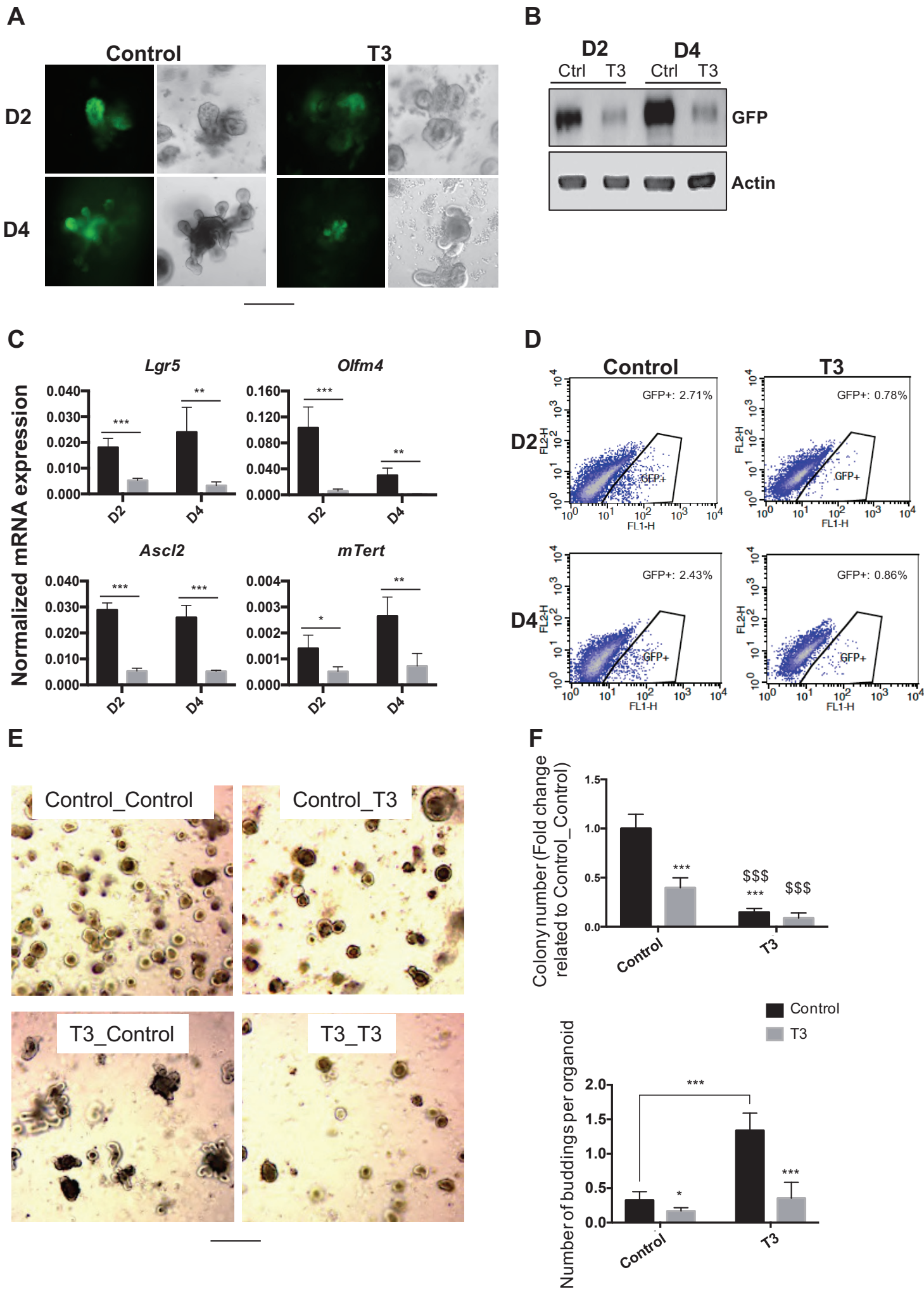
Godart et al, Figure 1



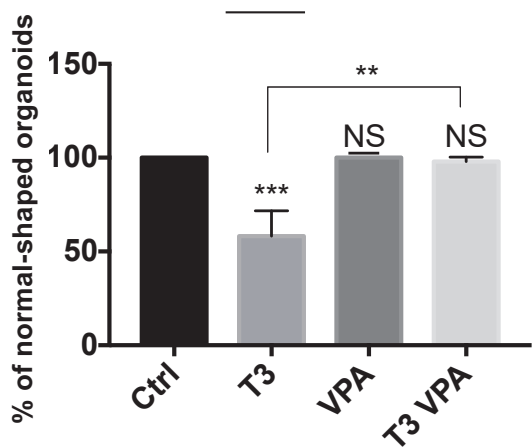
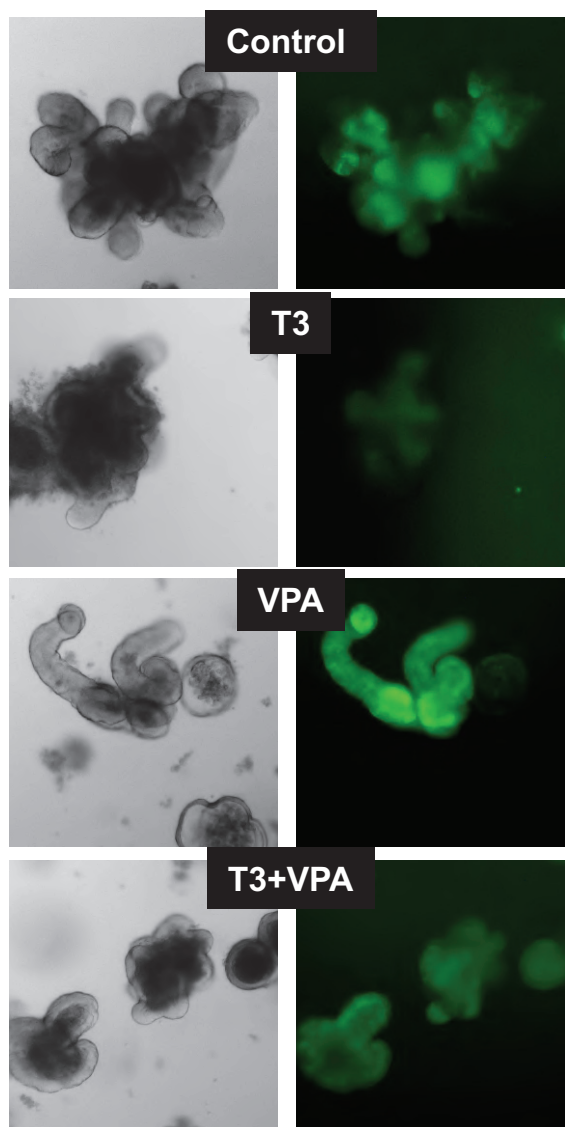
Godart et al, Figure 2



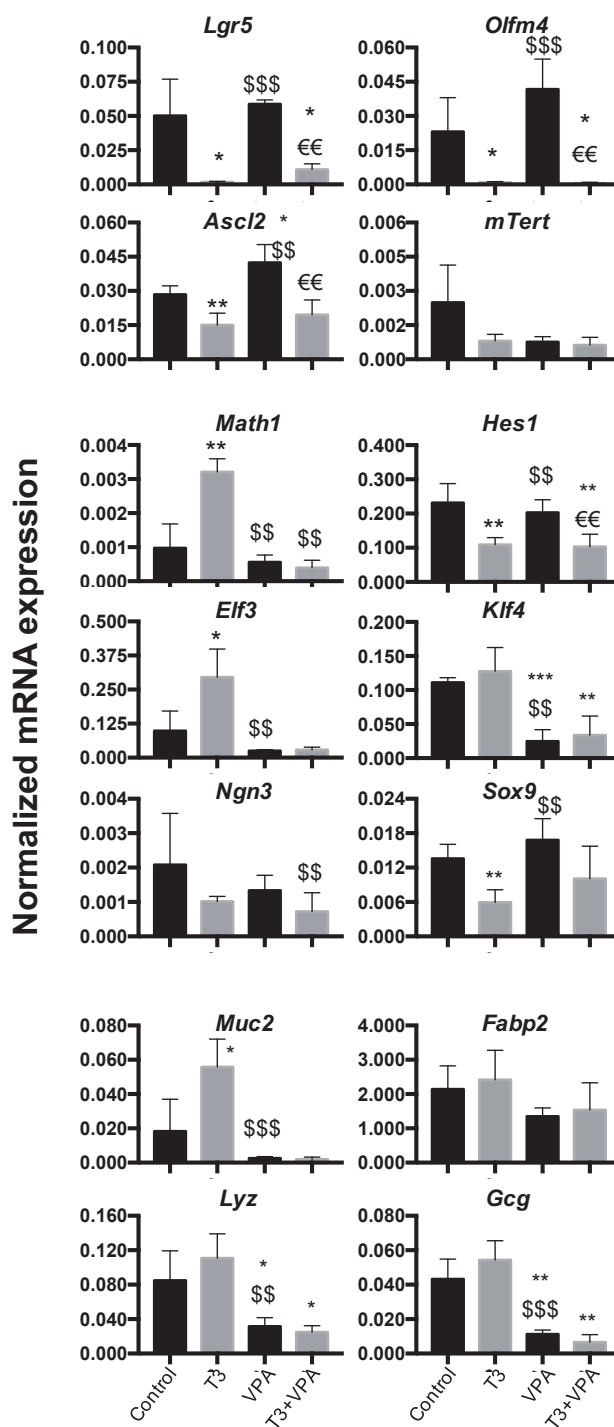
Godart et al, Figure 3



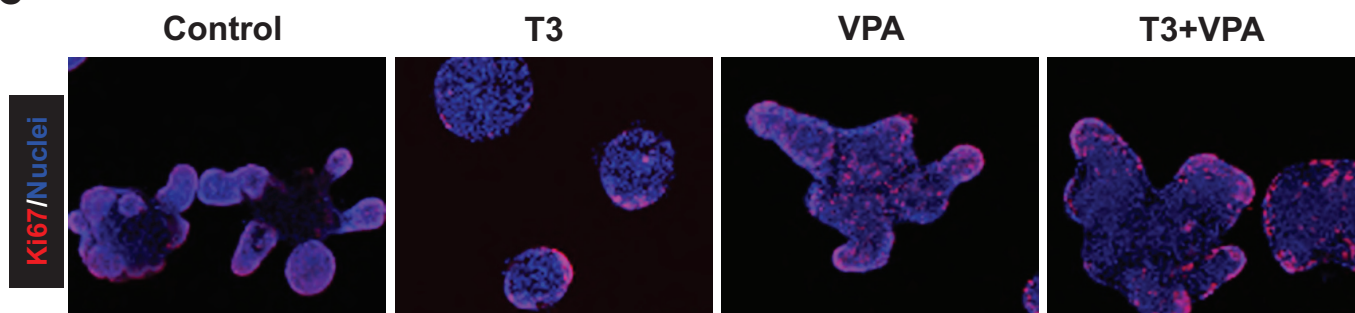
A



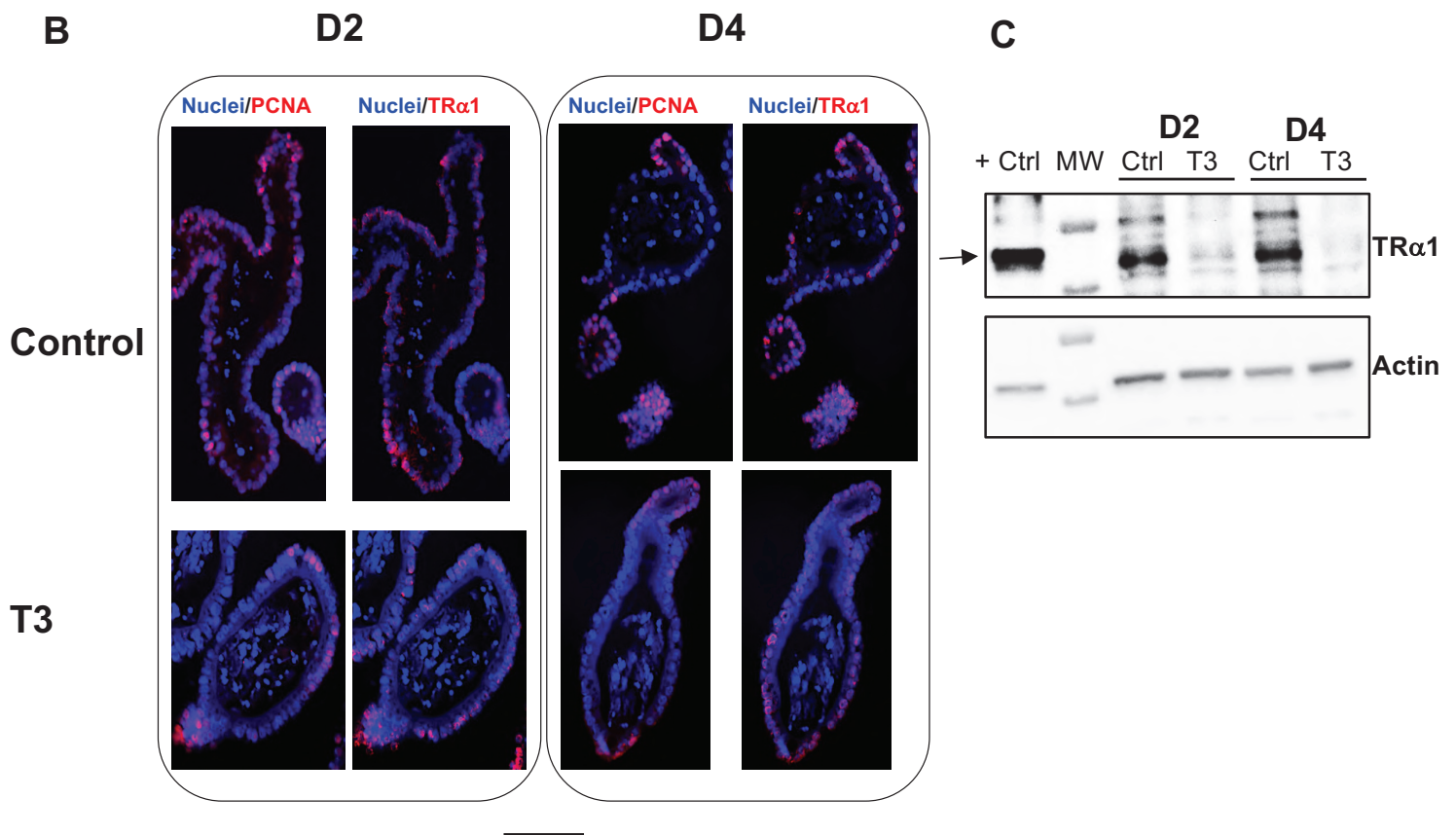
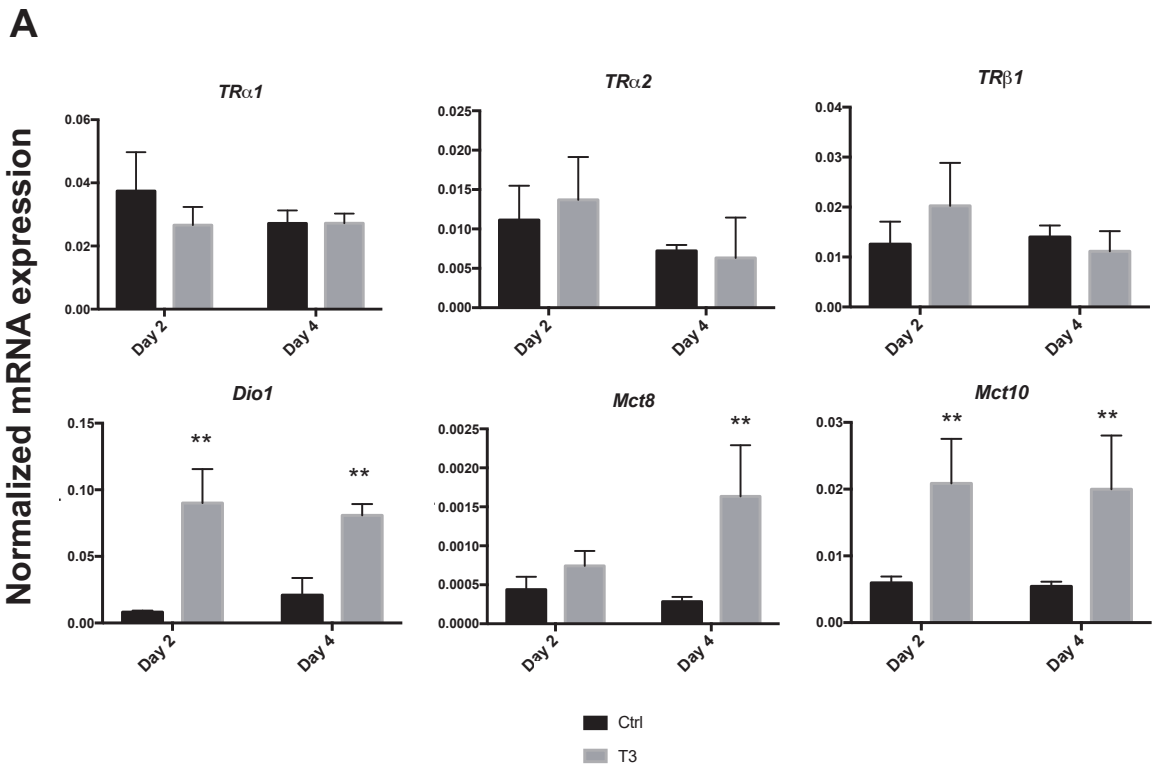
B



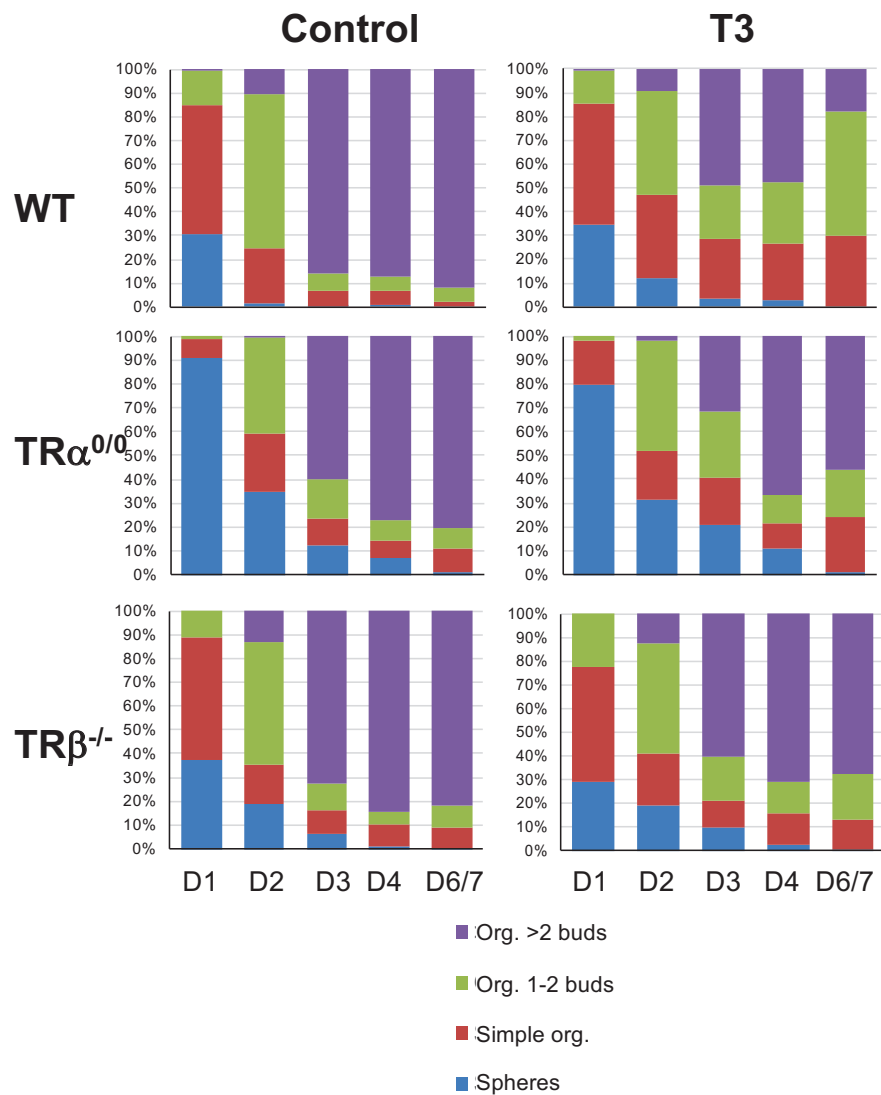
C



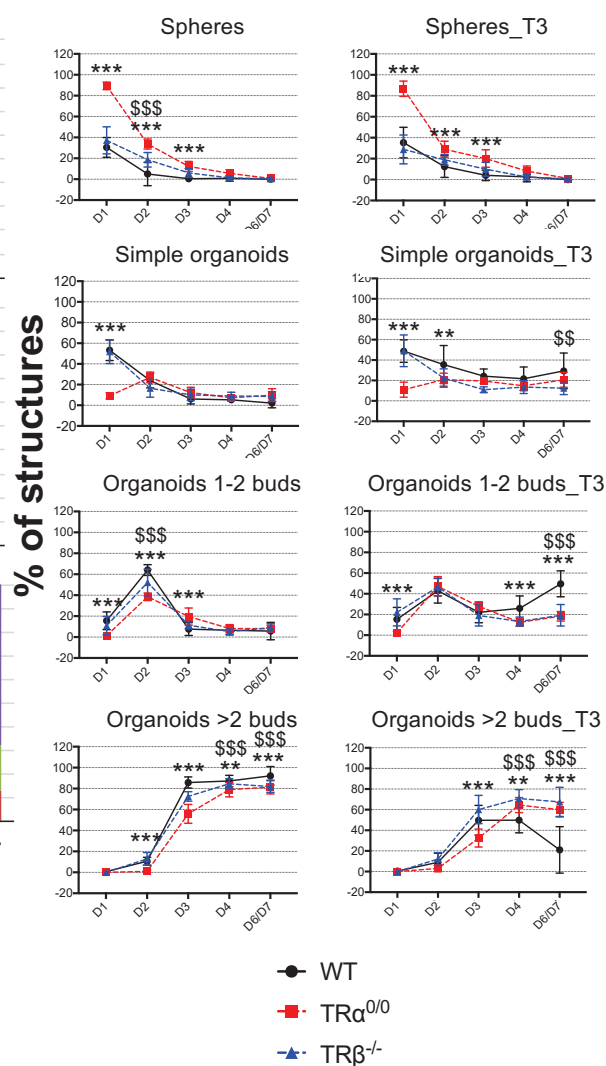
Godart et al, Figure 5



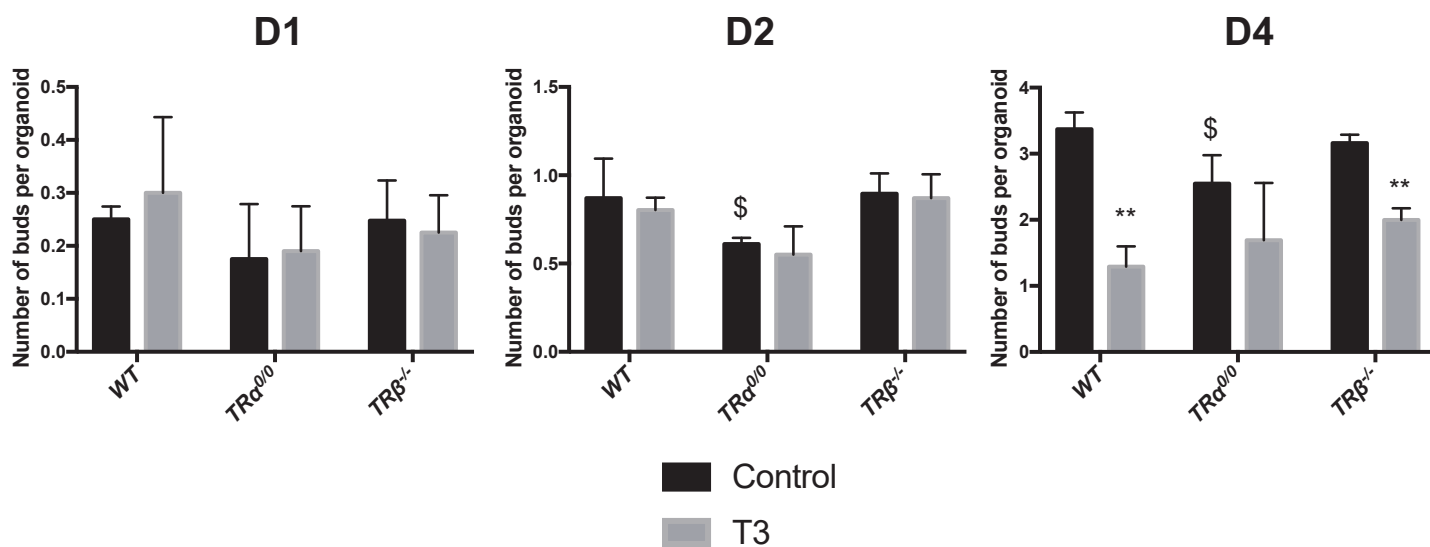
A



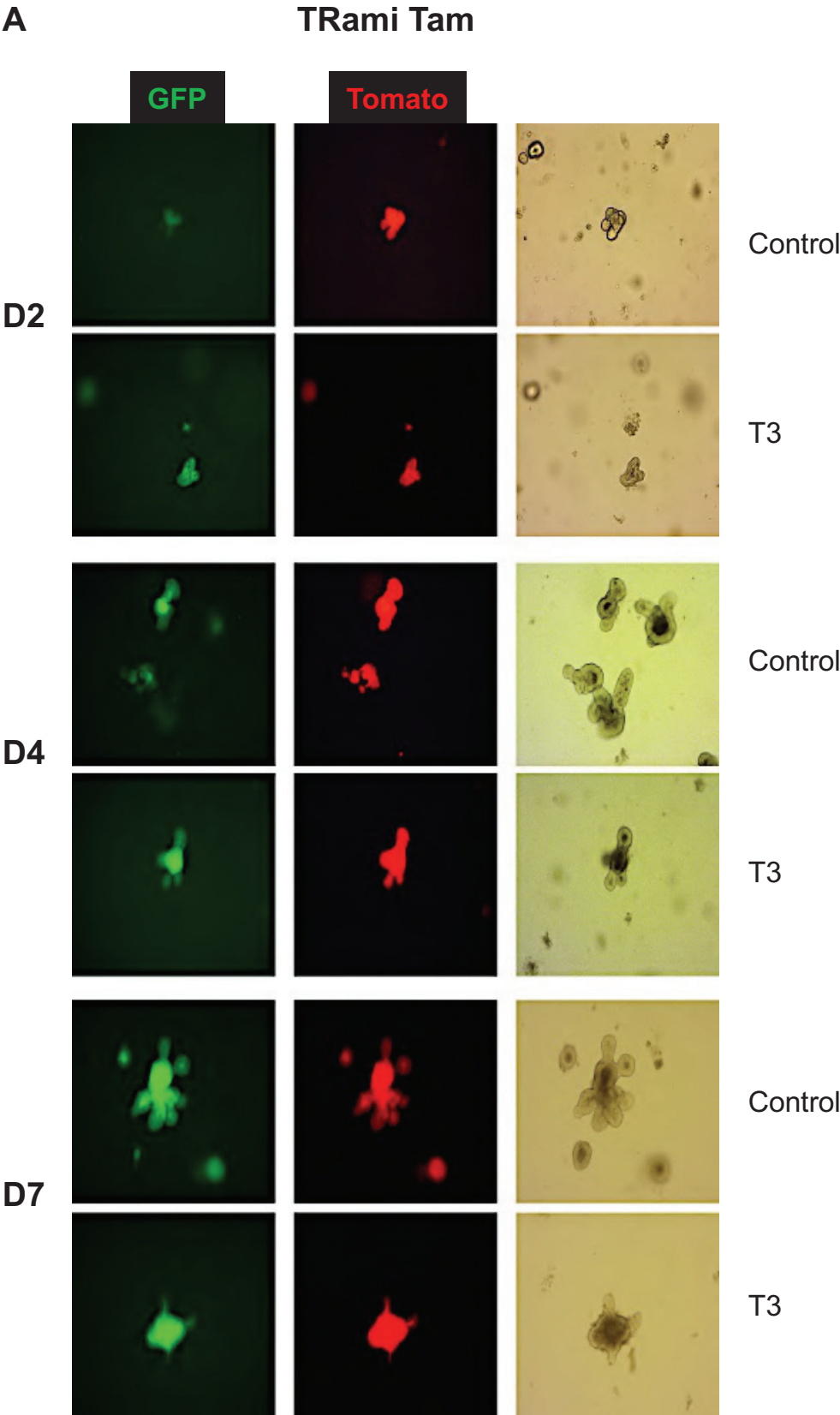
B



C



Godart et al, Figure 7

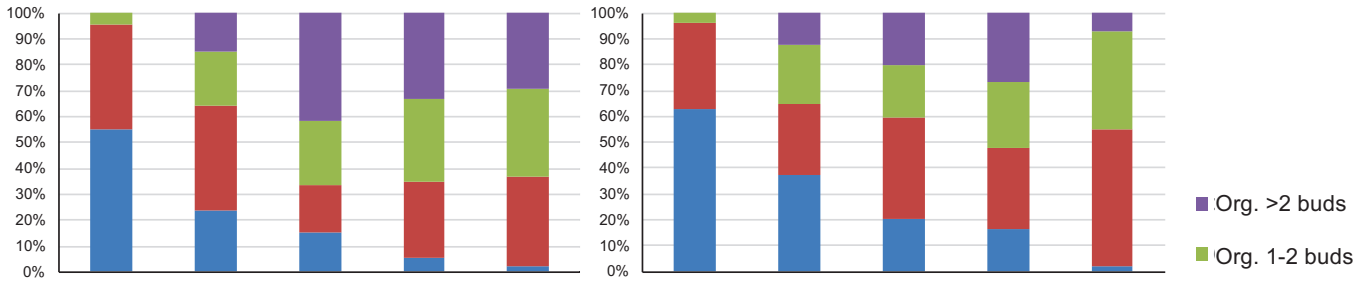


B

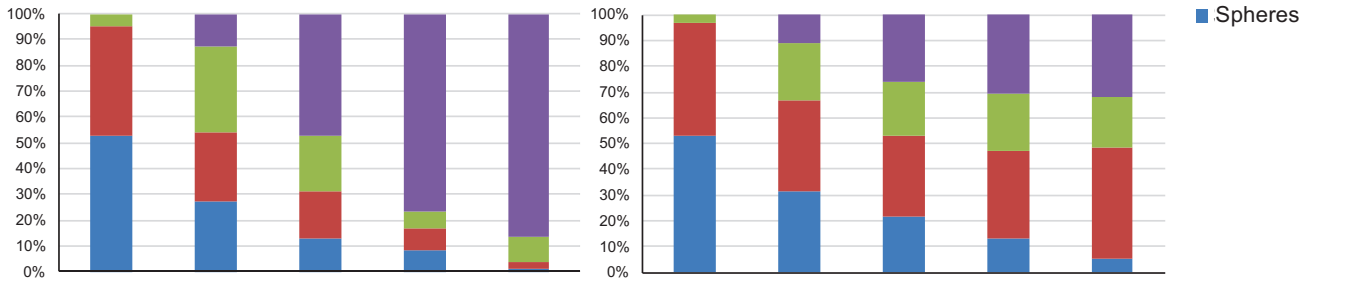
TRami Tam

Control

T3

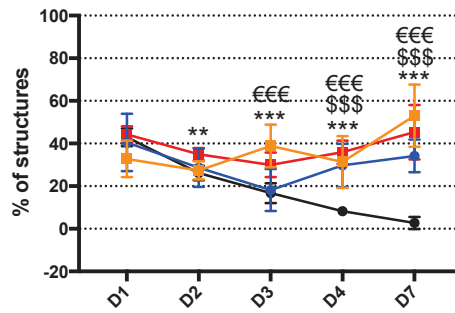
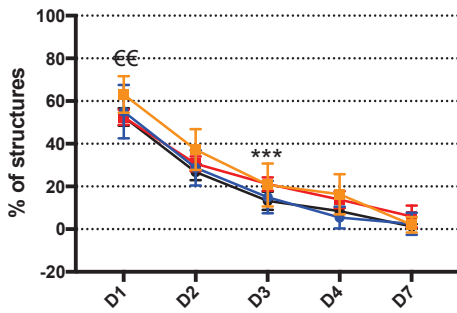


TRami Oil



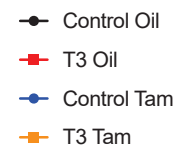
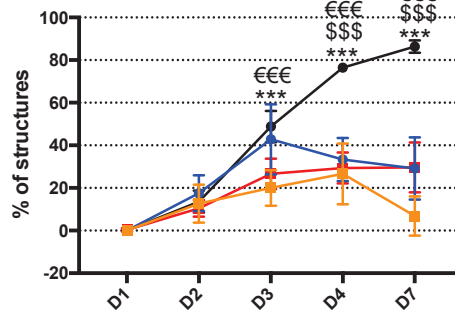
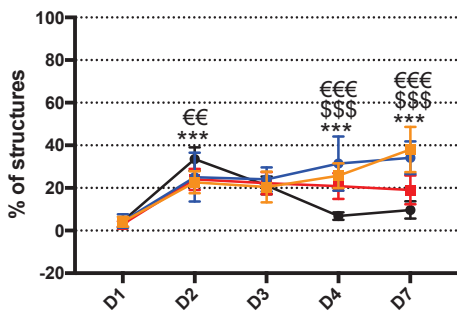
Spheres

Simple organoids

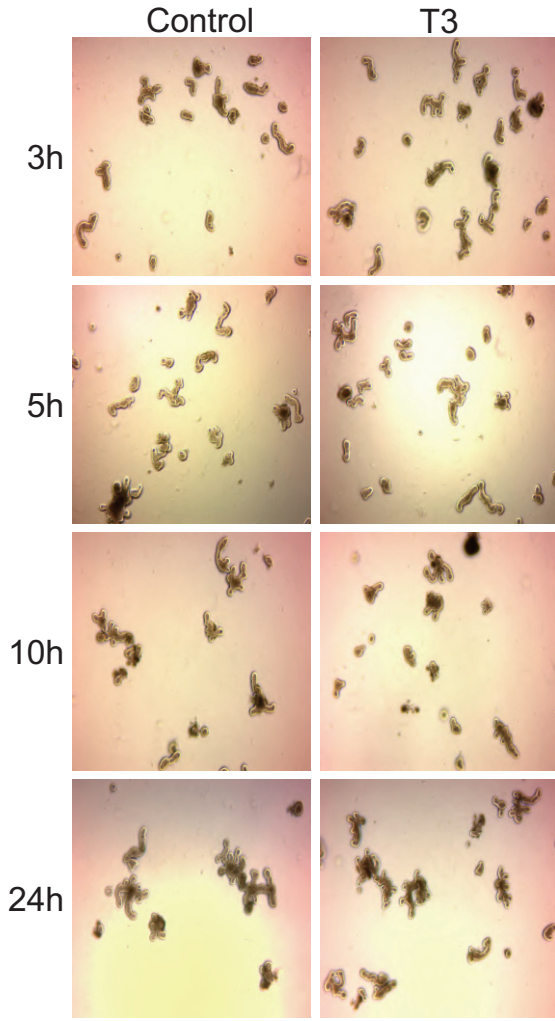


Organoids 1-2 buds

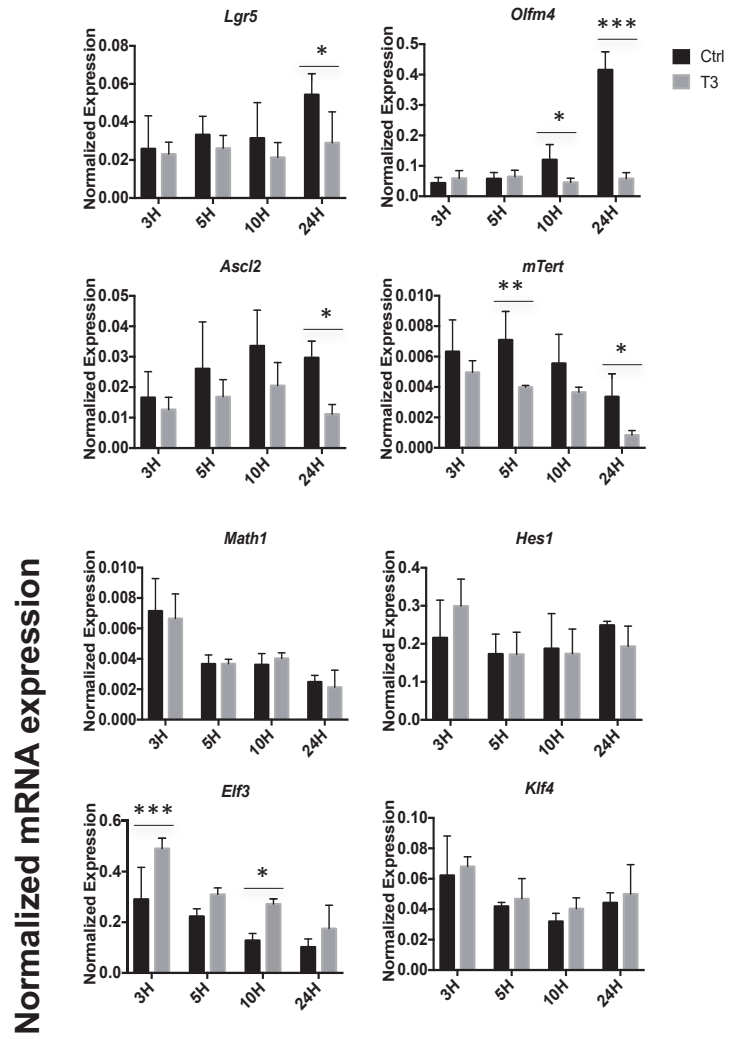
Organoids >2 buds



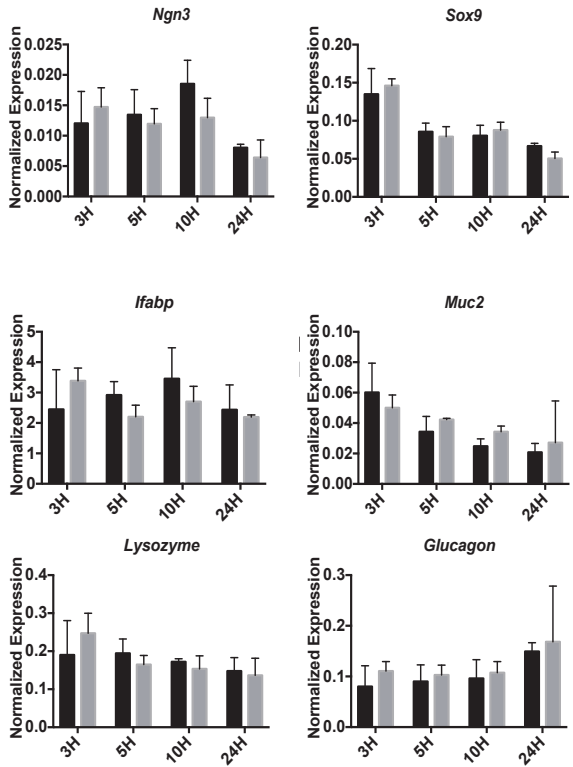
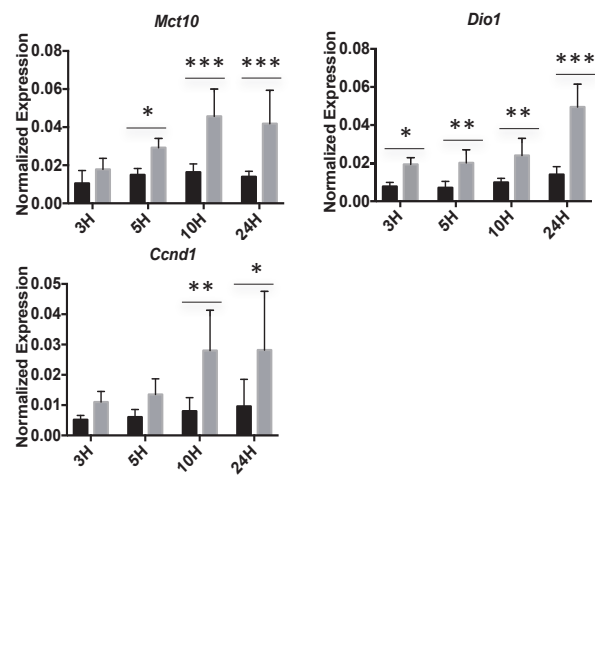
A



B

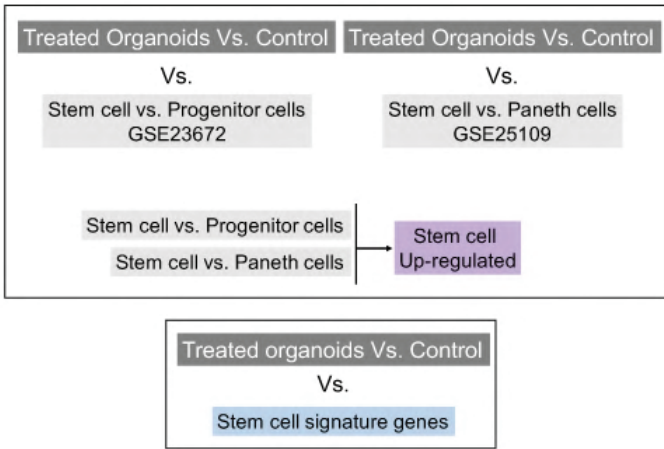


C

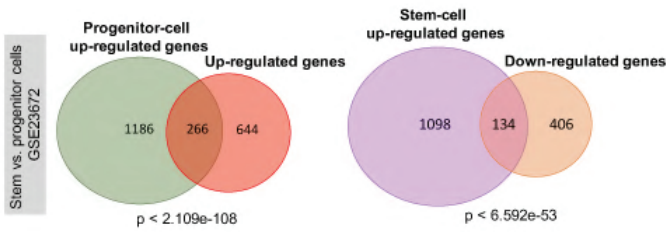


Godart et al, Figure 8

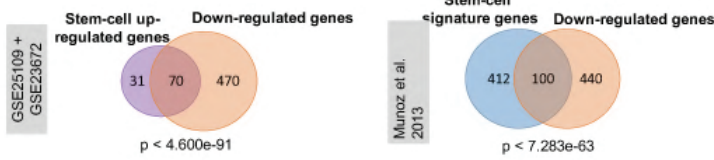
D



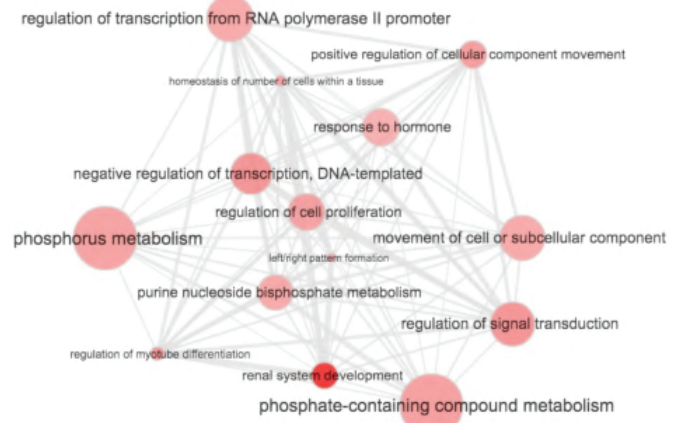
E



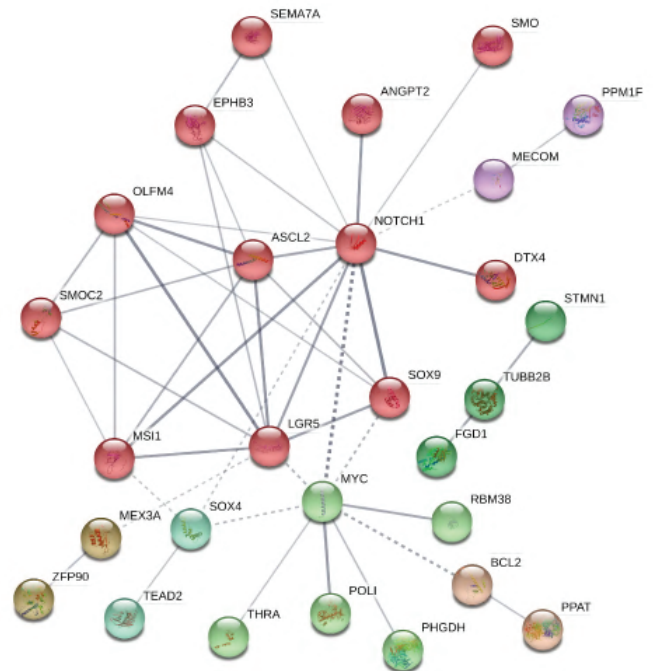
F



G

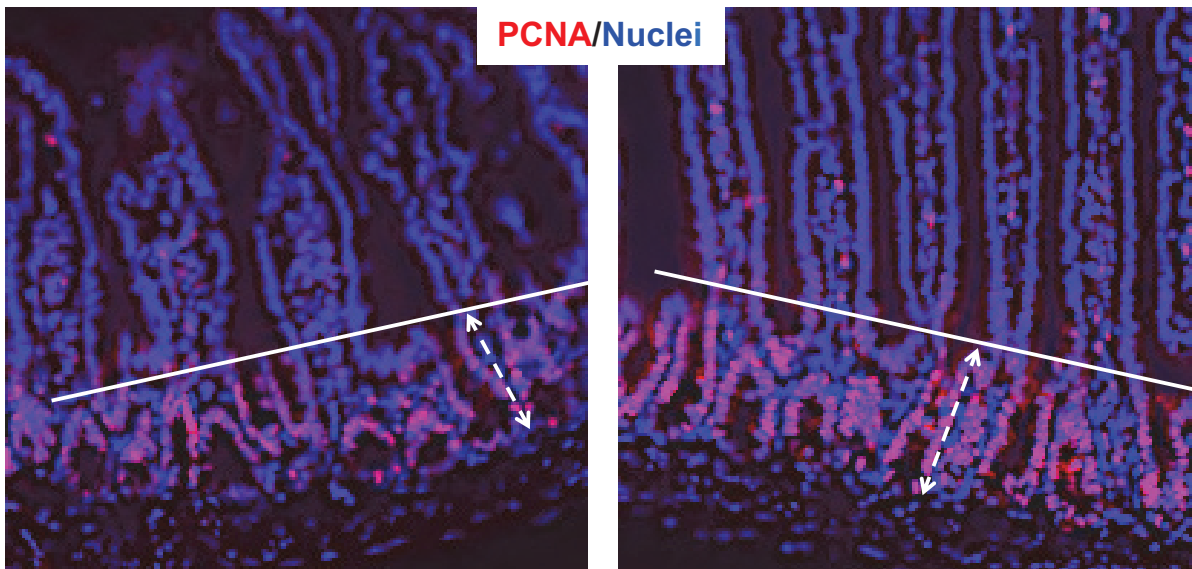
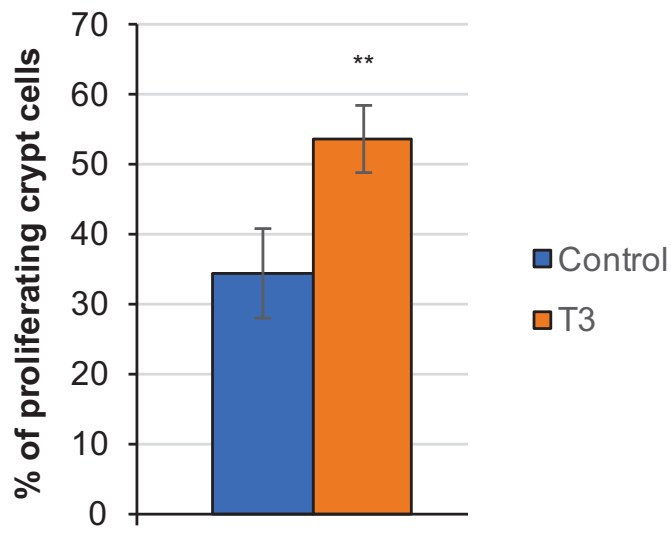


H

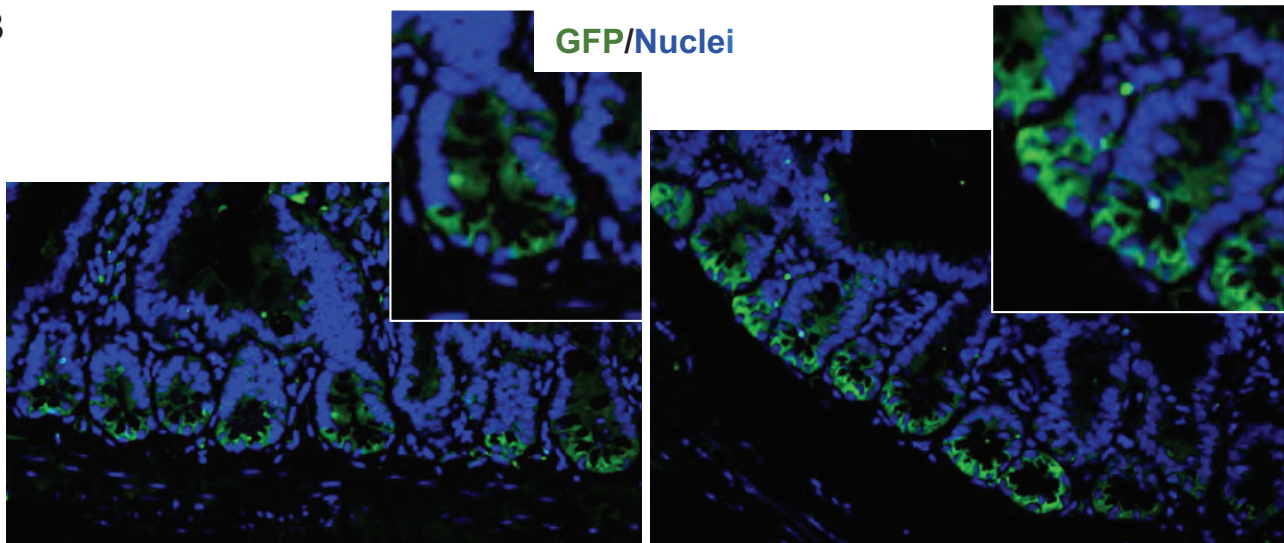


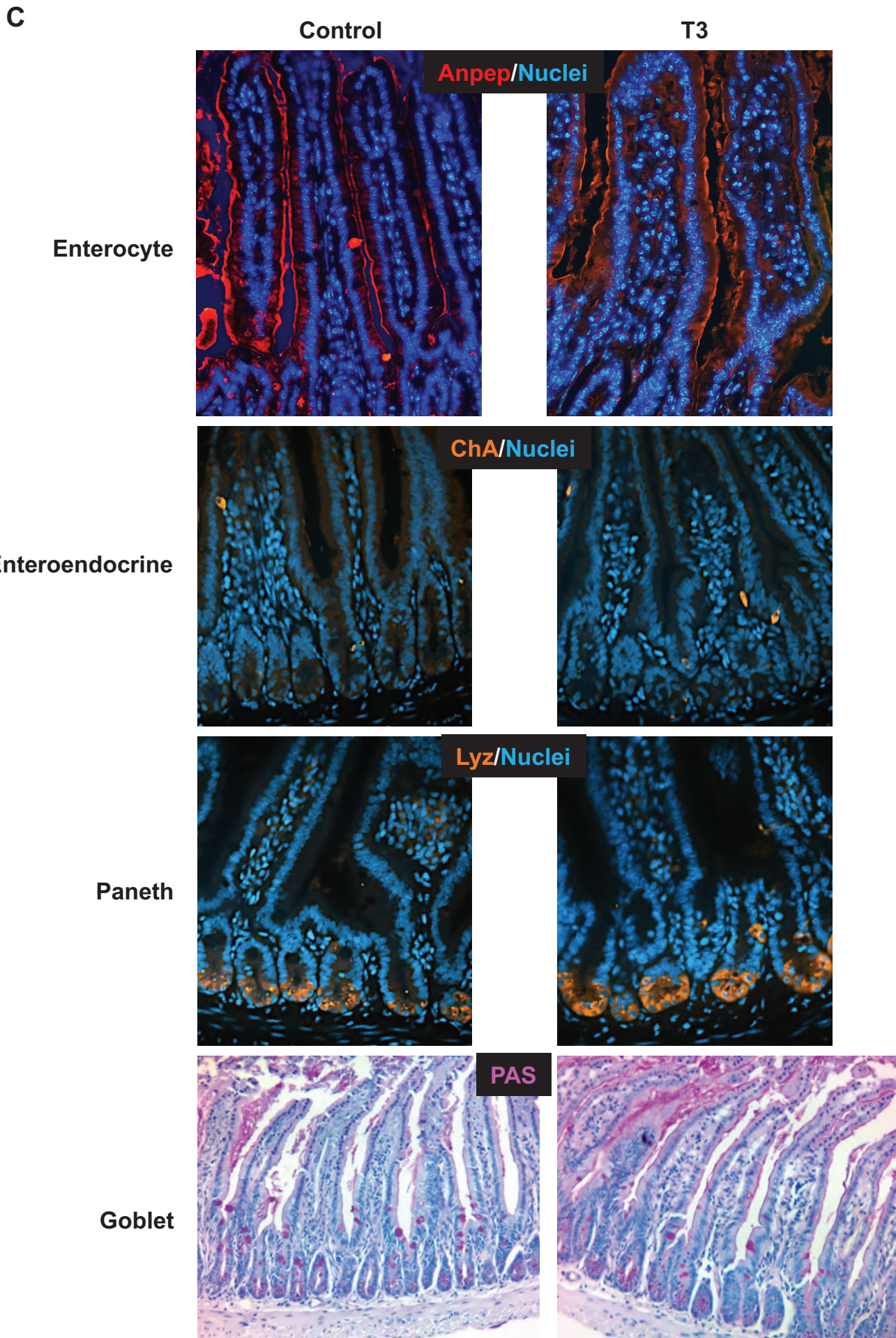
Godart et al, Figure 9

A

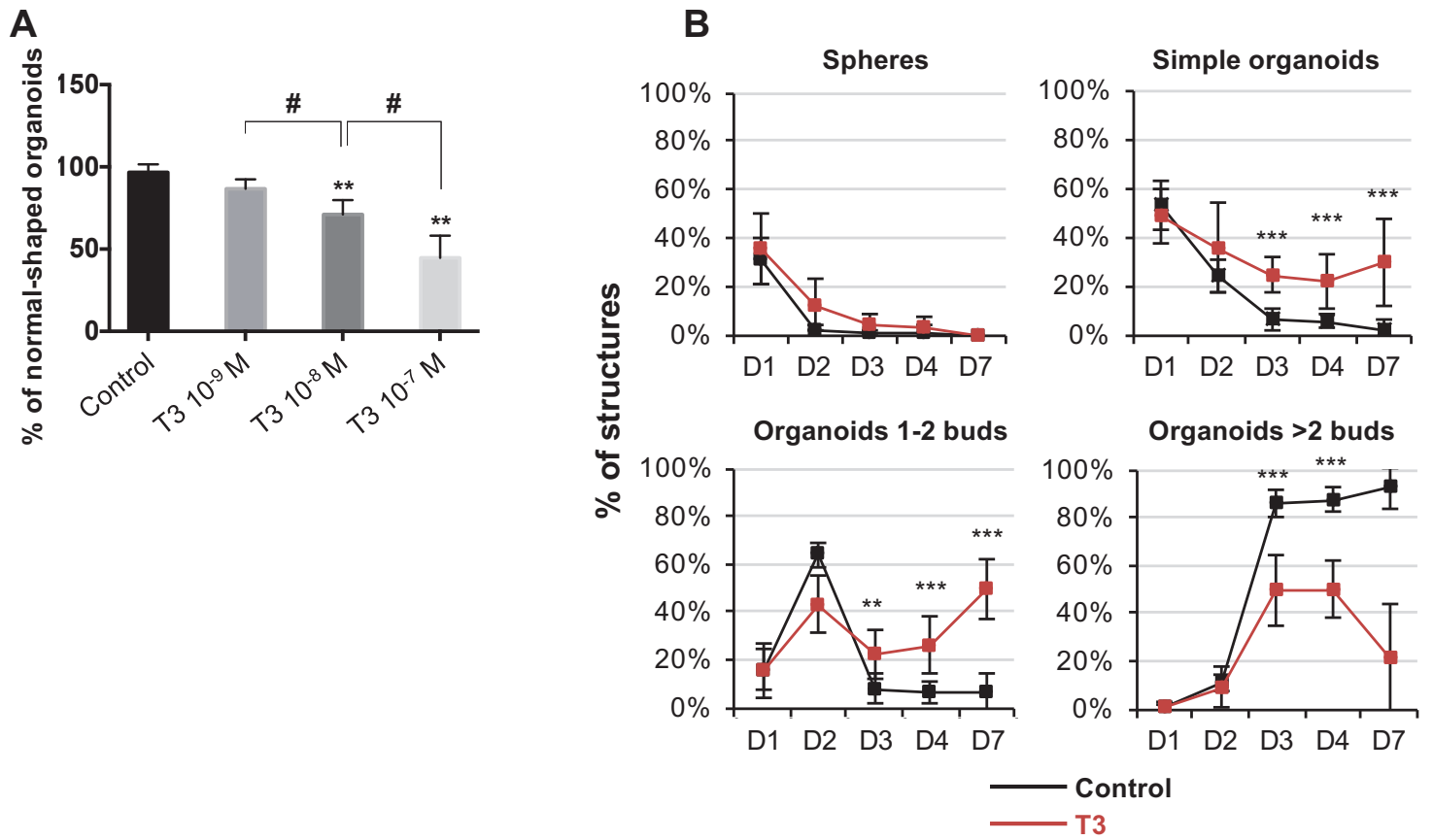


B

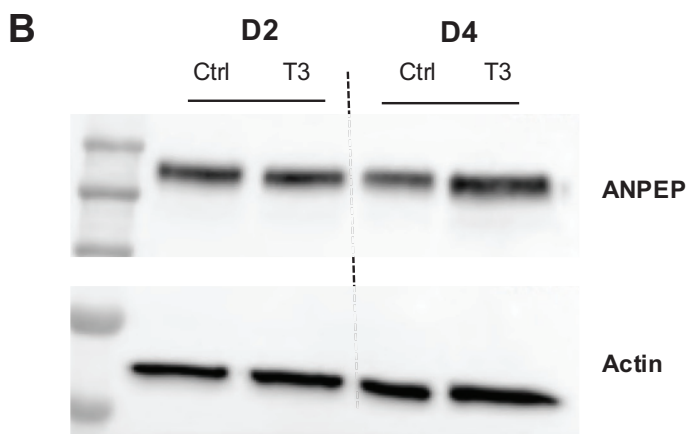
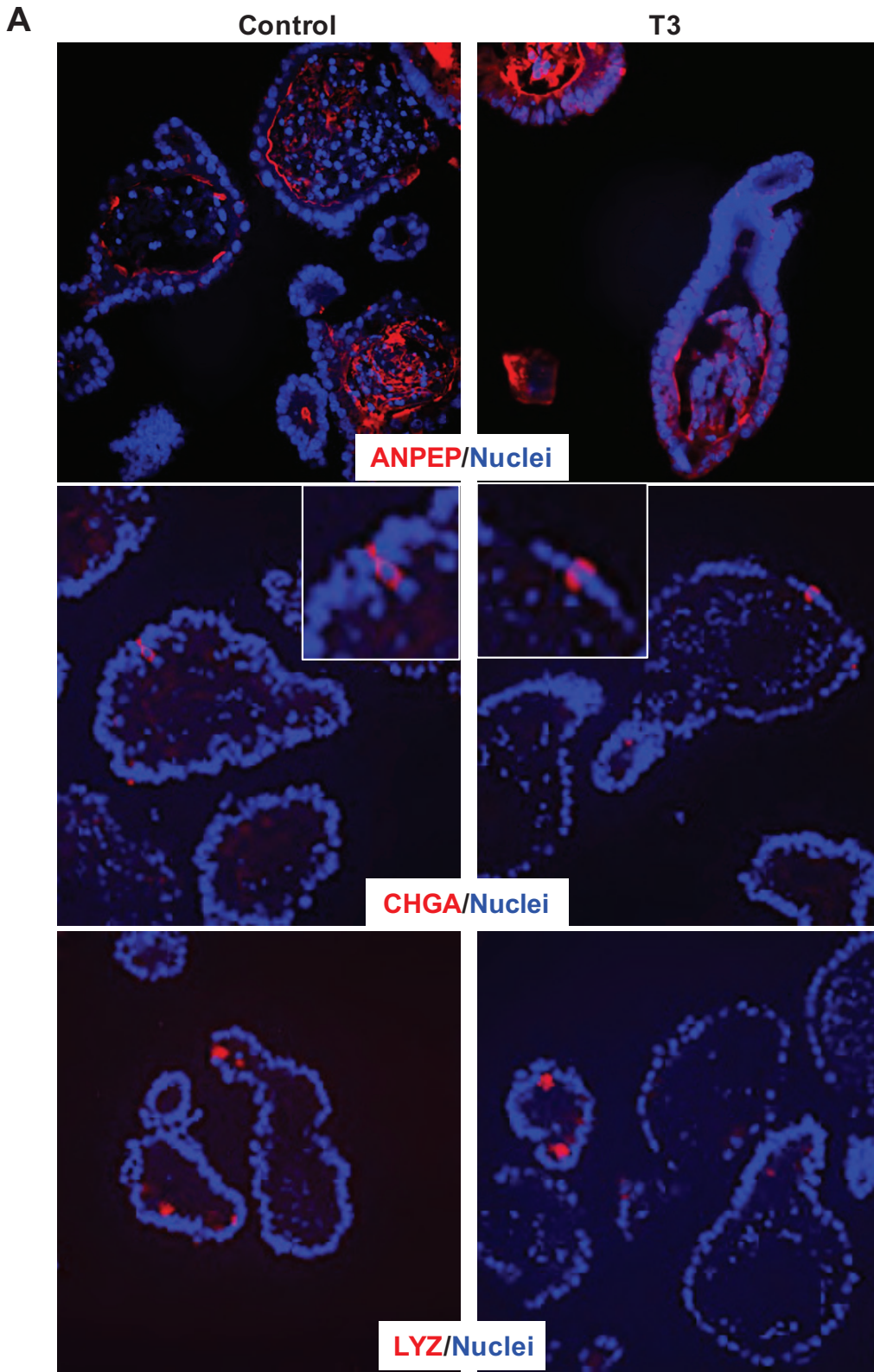




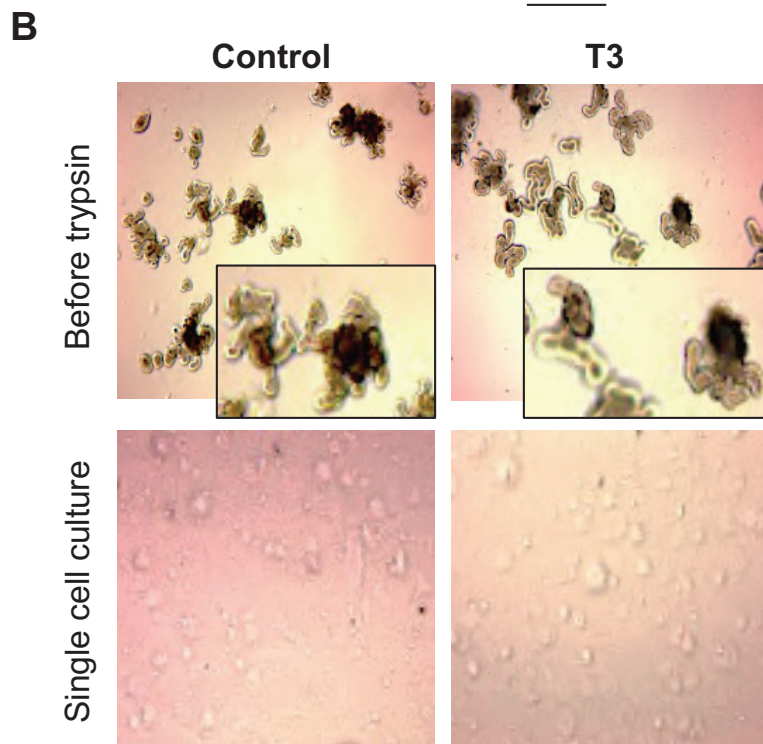
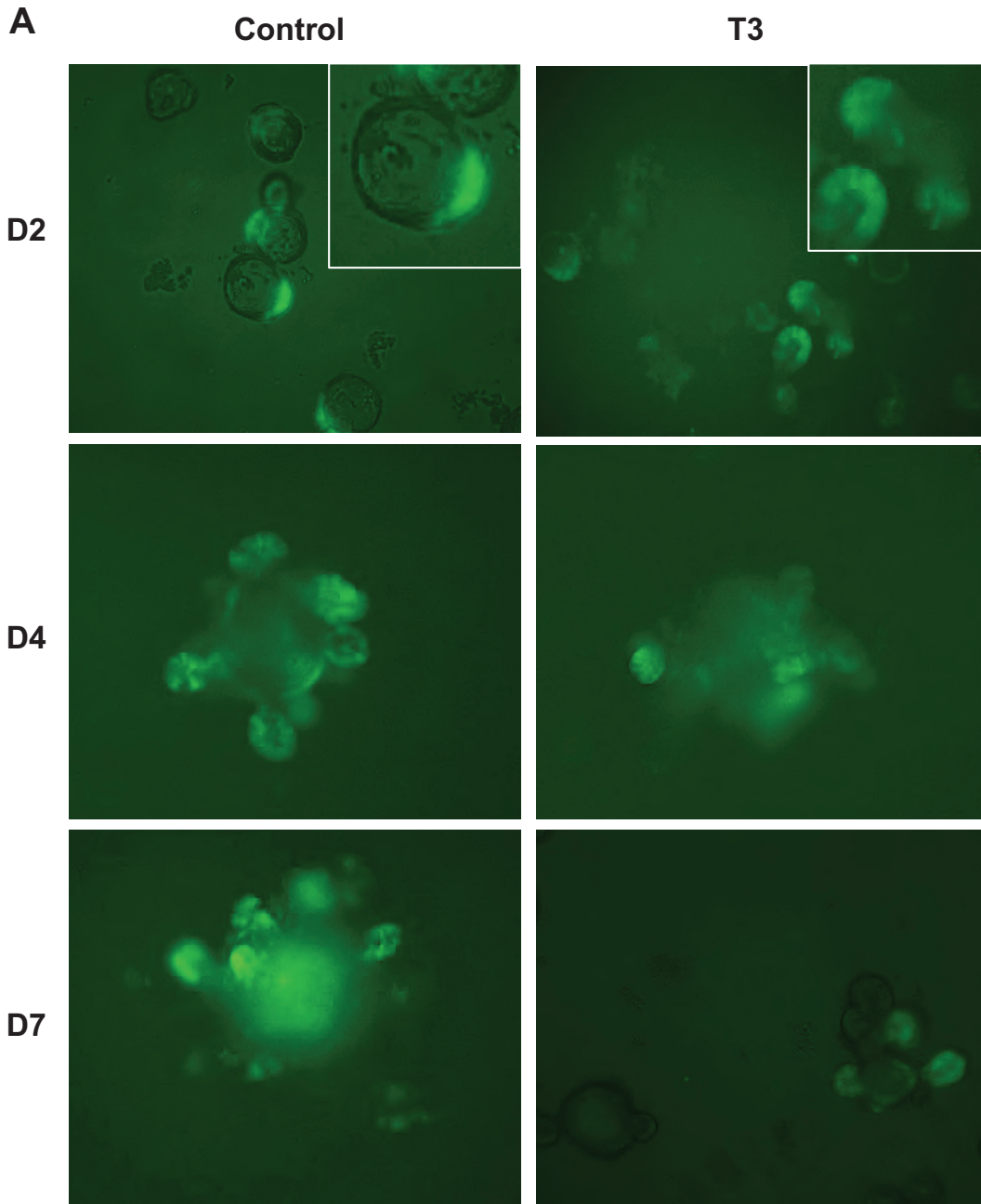
Godart et al, Figure S1



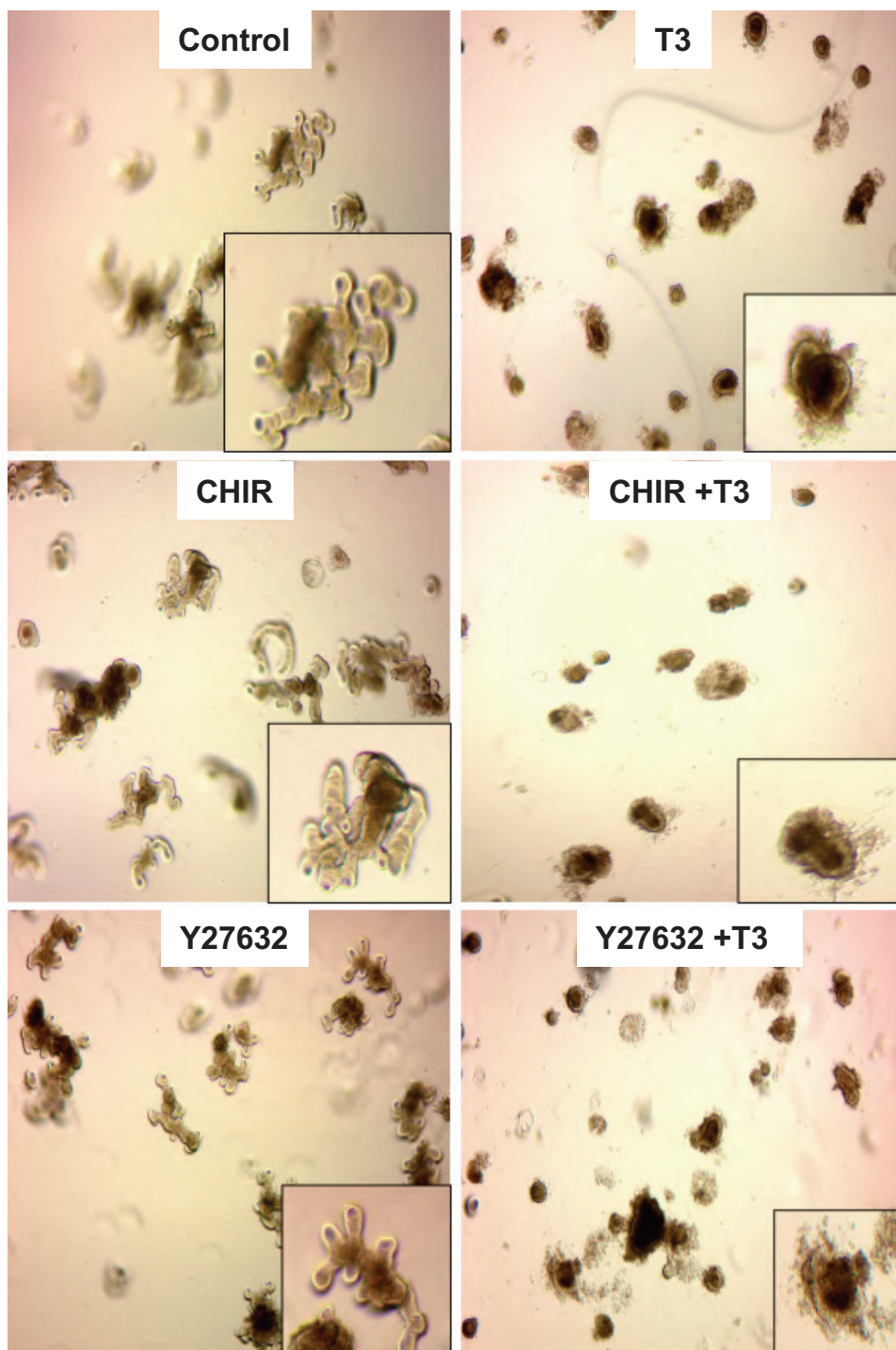
Godart et al, Figure S2



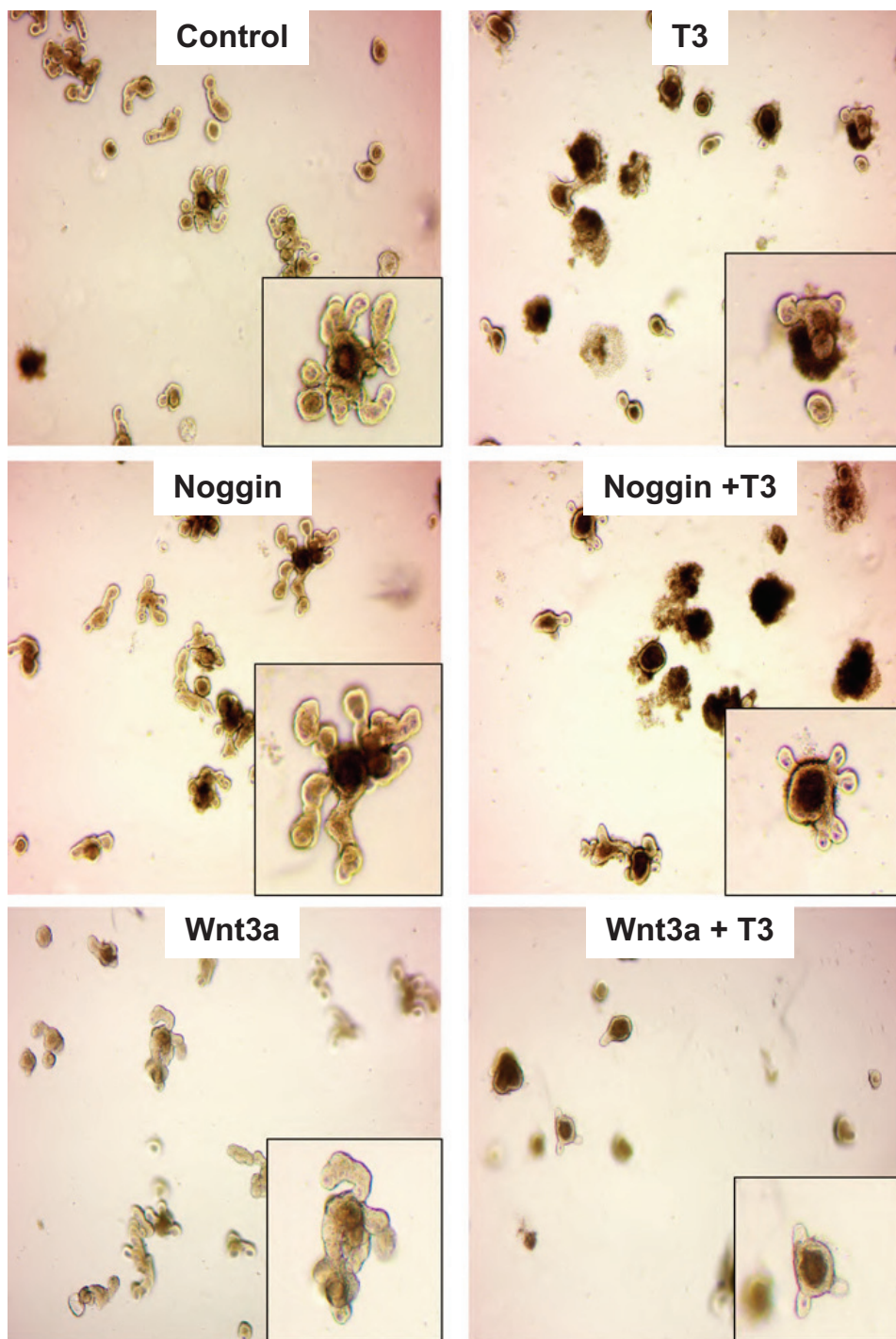
Godart et al, Figure S3



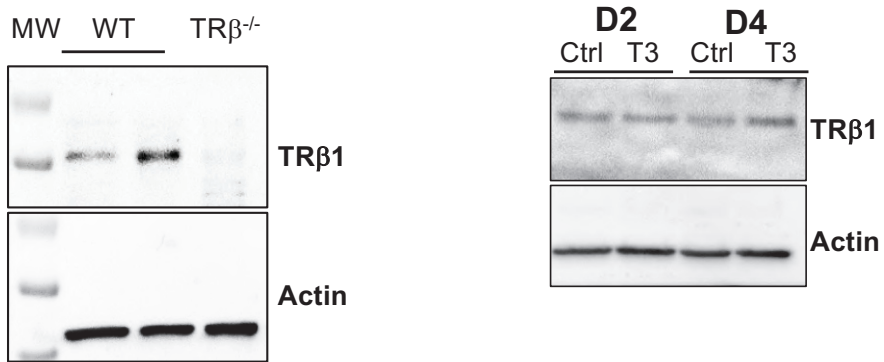
A



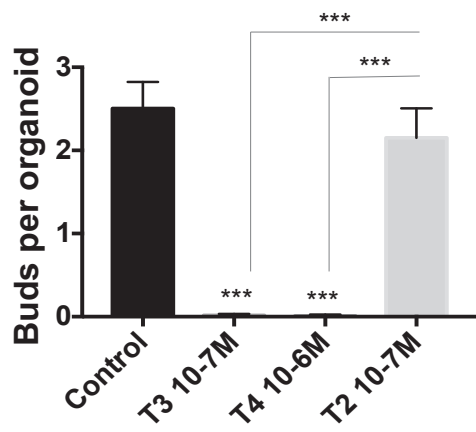
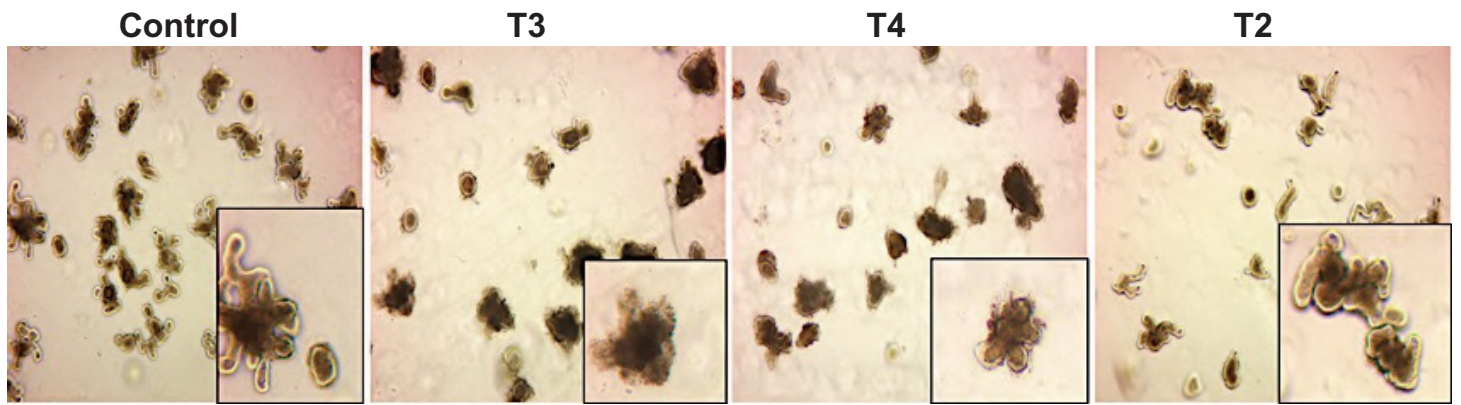
B



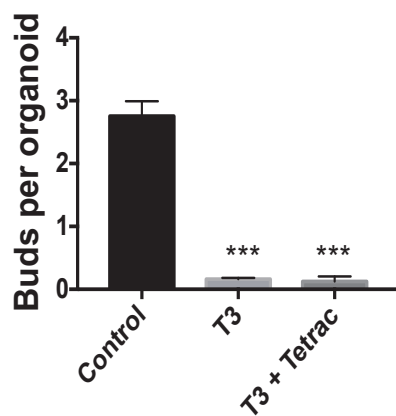
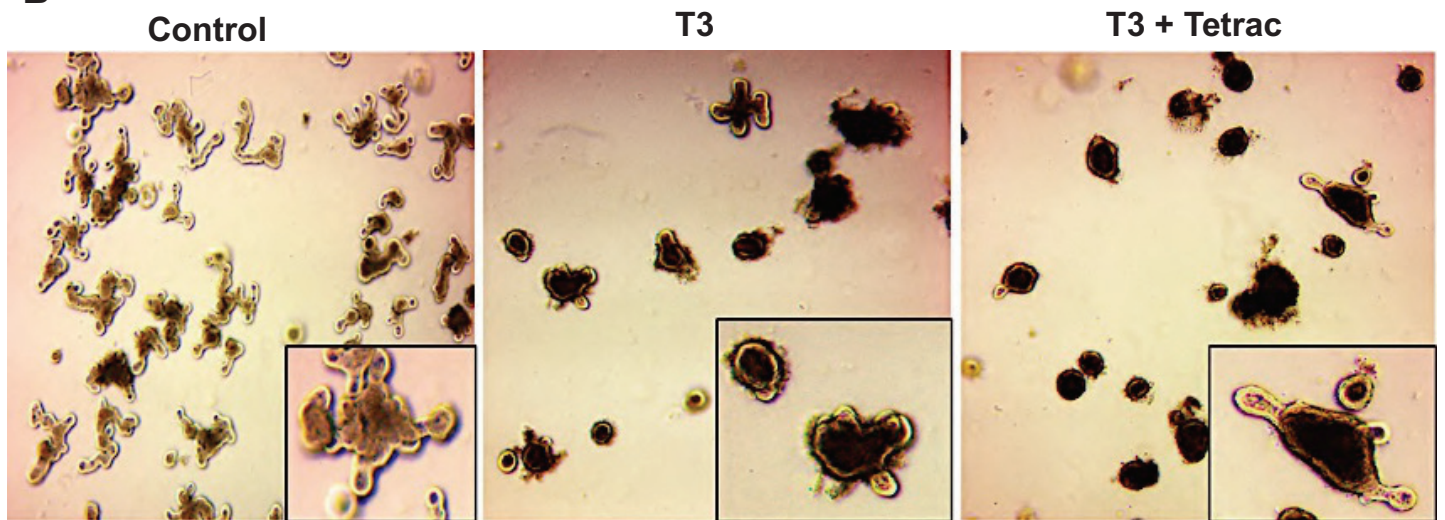
Godart et al, Figure S5



A

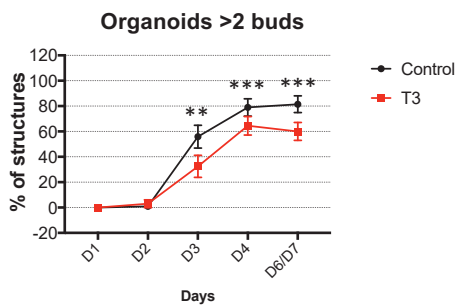
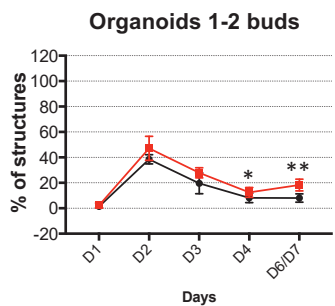
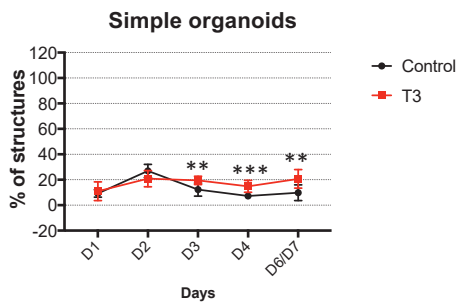
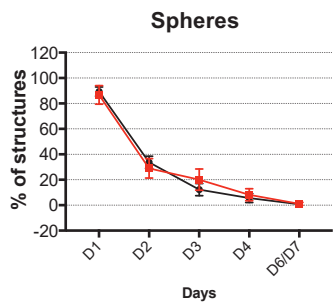


B

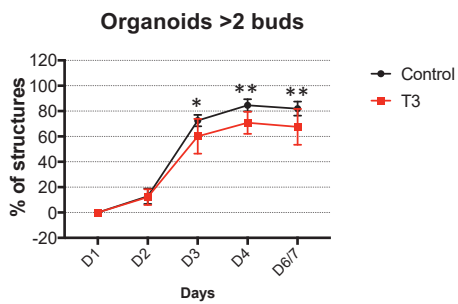
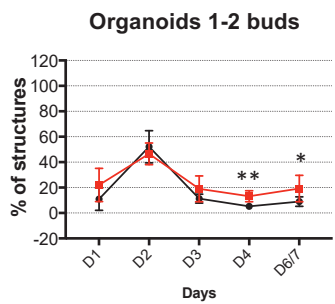
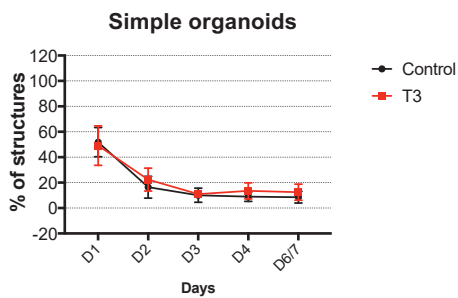
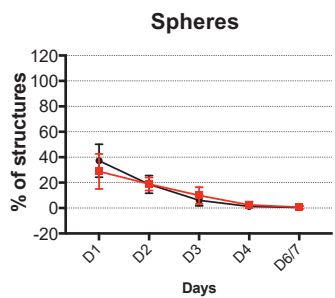


Godart et al, Figure S7

TR $\alpha^{0/0}$

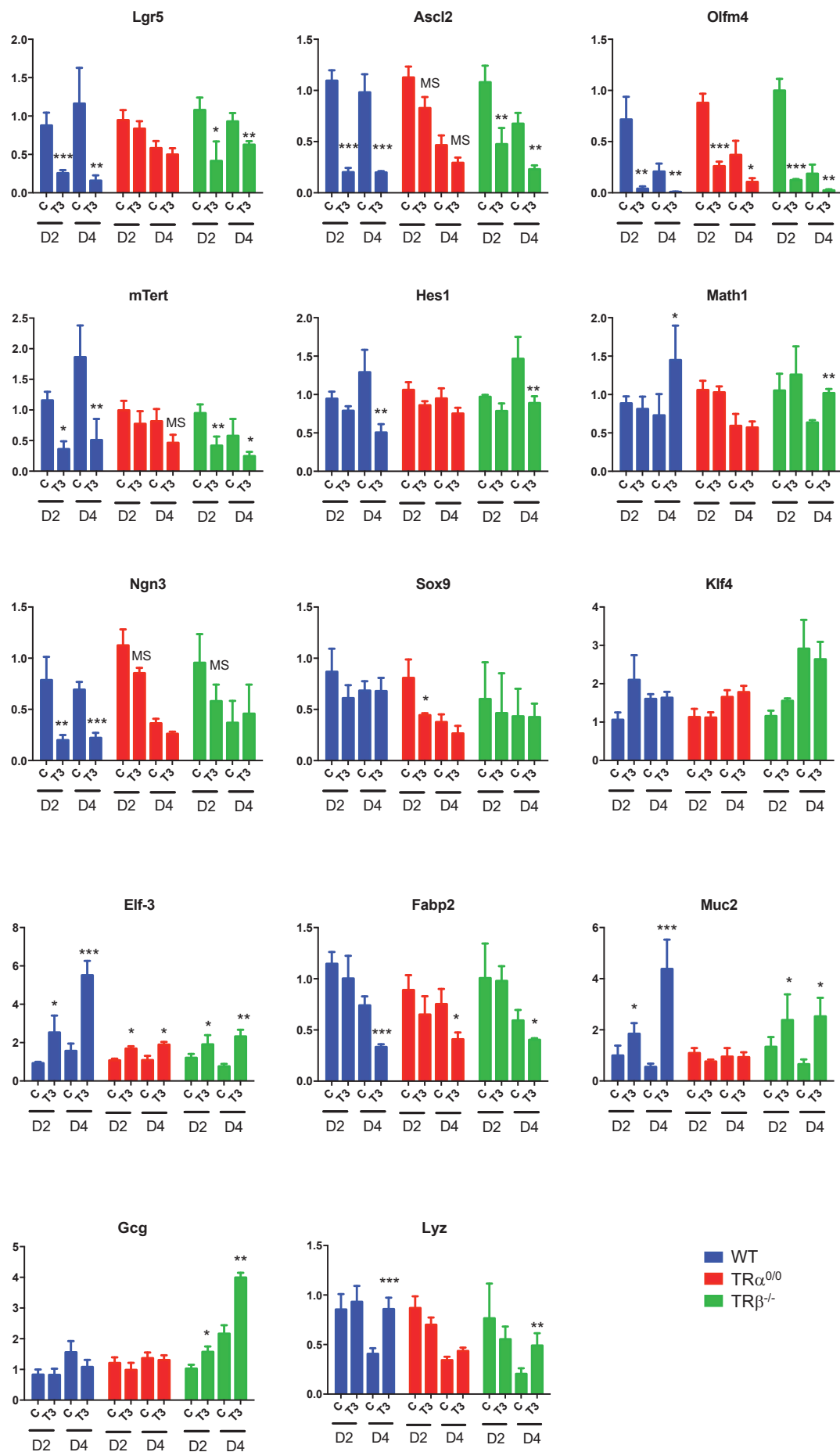


TR $\beta^{-/-}$

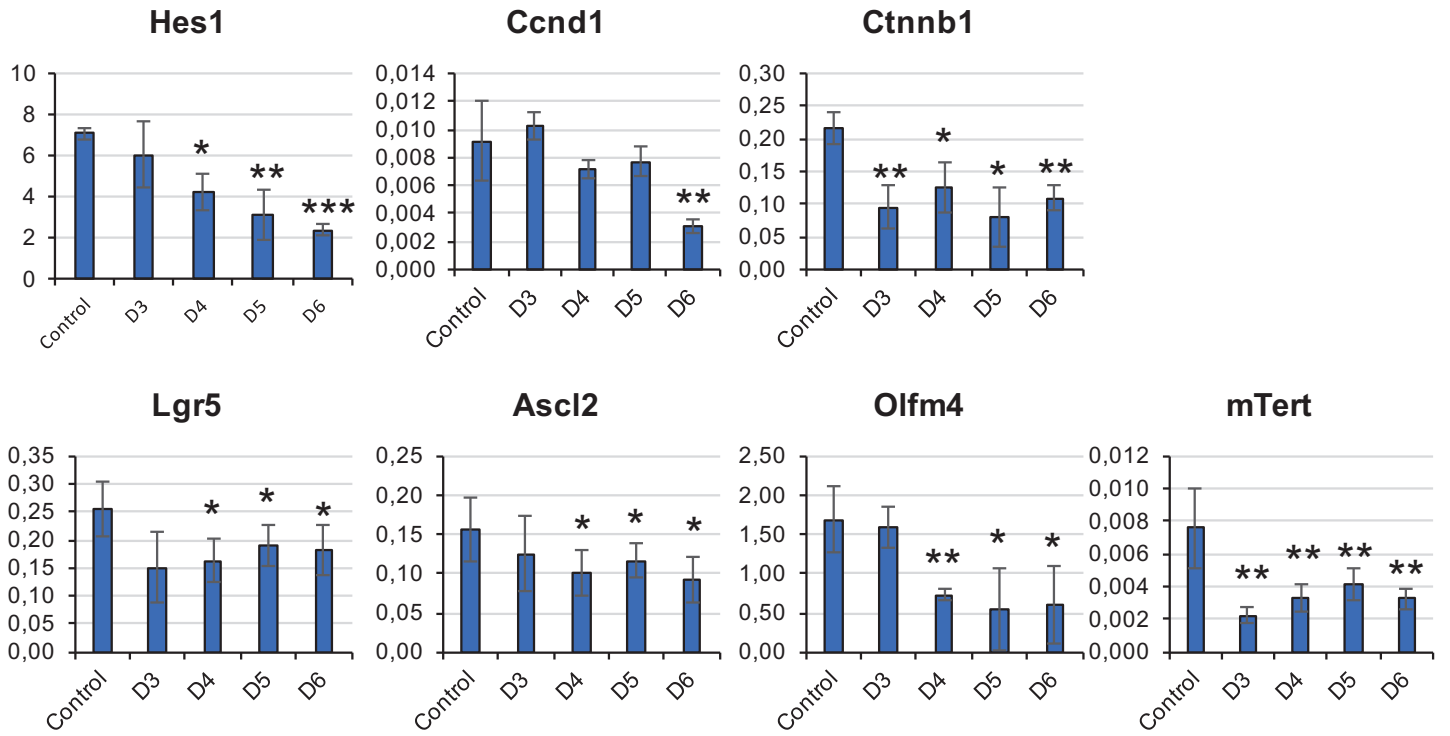


Godart et al, Figure S8

Normalized mRNA expression



C



C

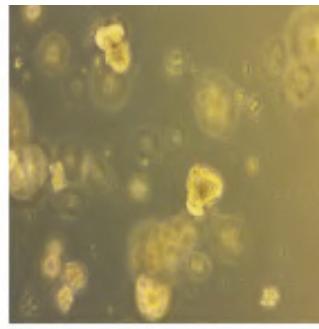
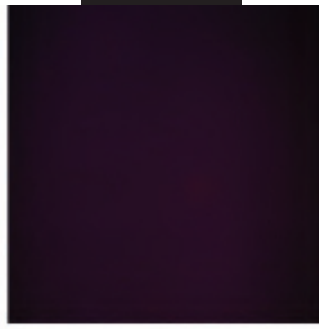
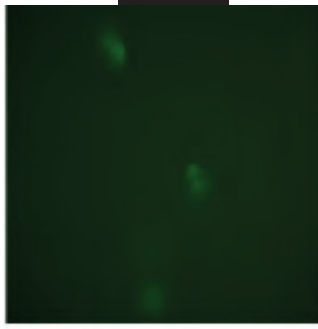
Trami Oil

Godart et al, Figure S10

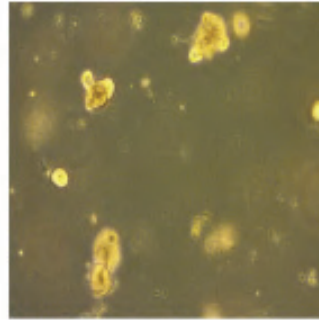
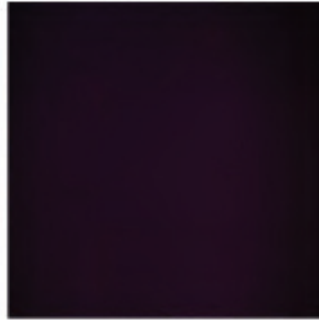
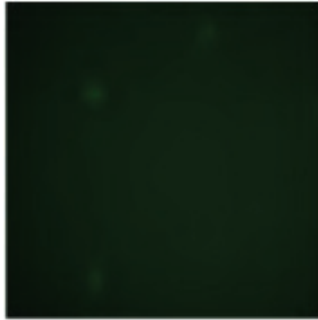
GFP

Tomato

D2

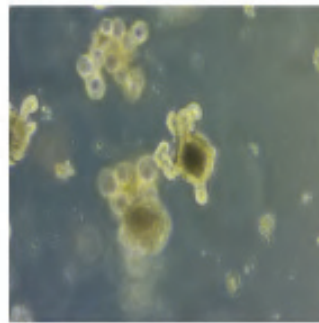
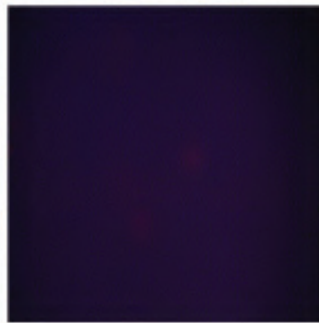
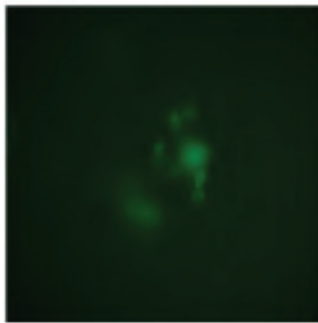


Control

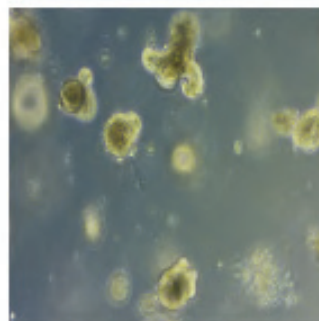
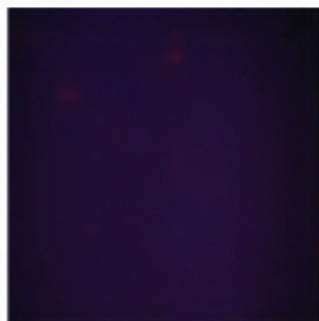
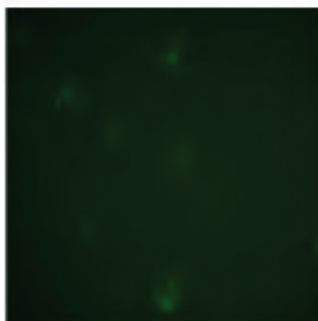


T3

D4

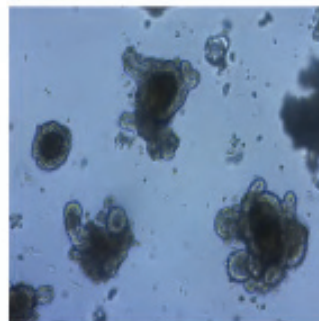
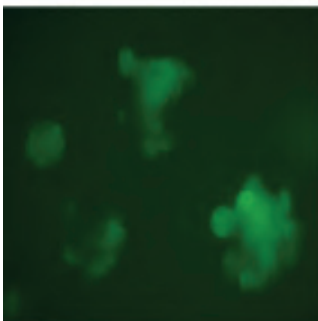


Control

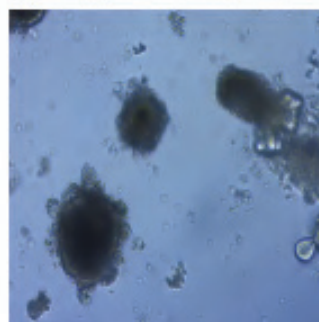
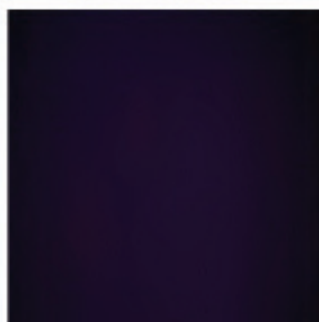
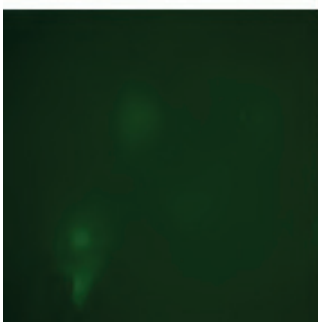


T3

D7

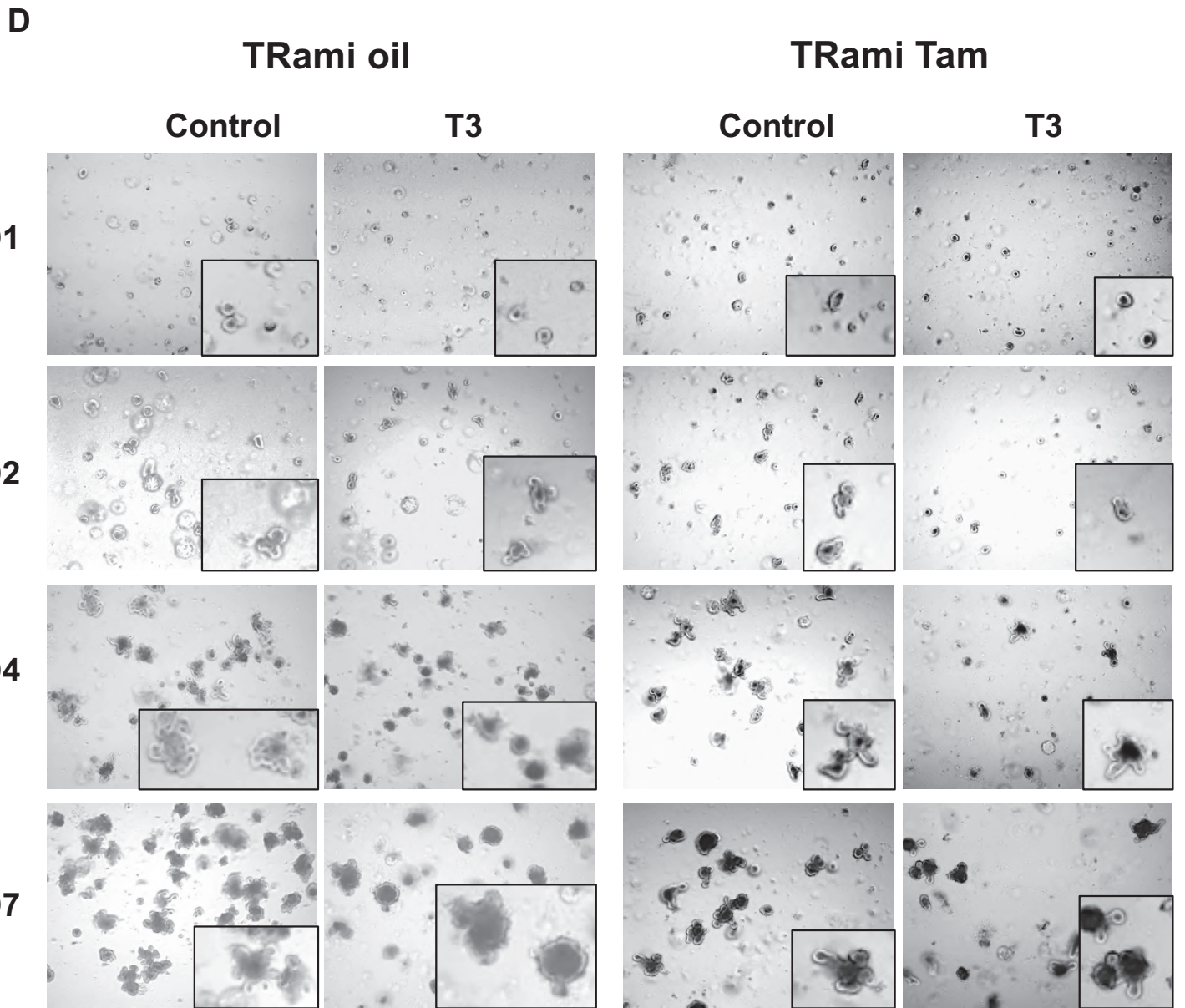


Control



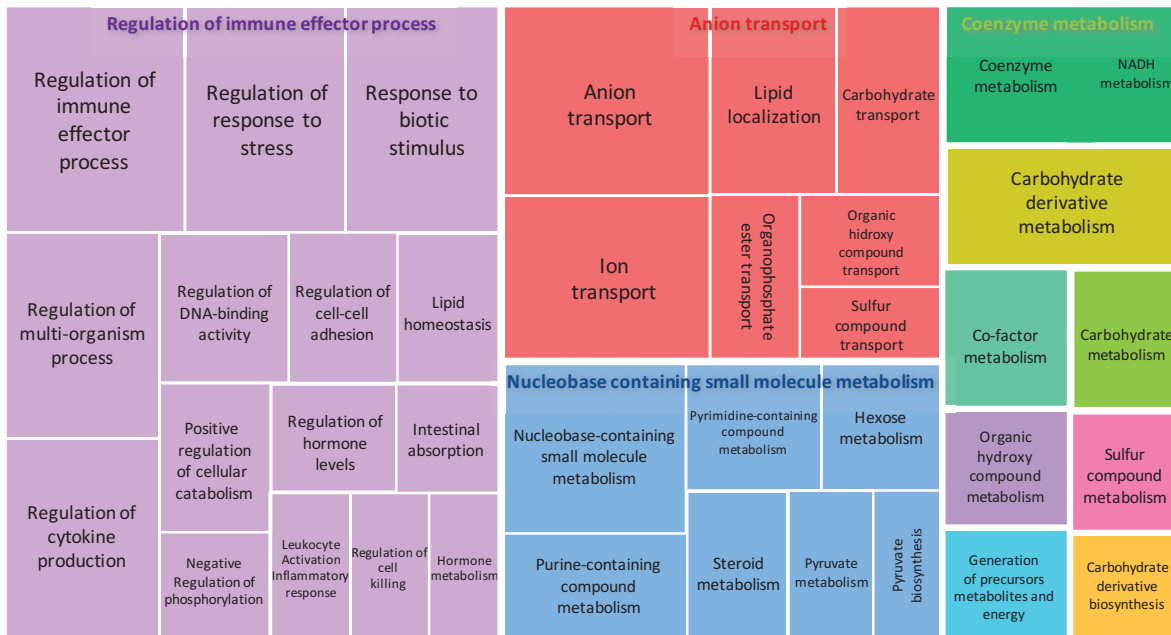
T3



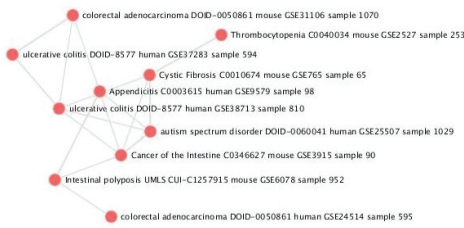


A

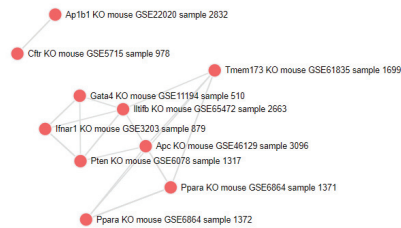
Up-regulated genes



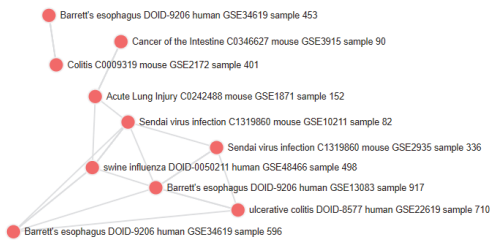
Diseases perturbation down



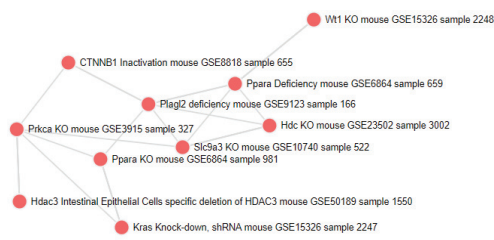
Single gene perturbation down



Diseases perturbation up

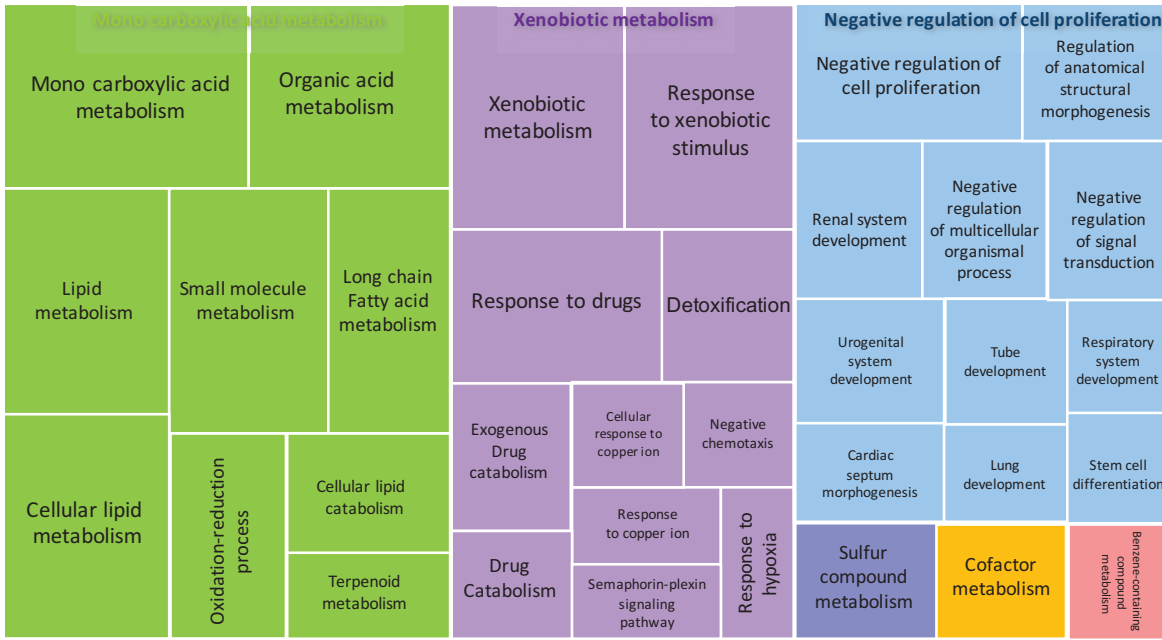


Single gene perturbation up

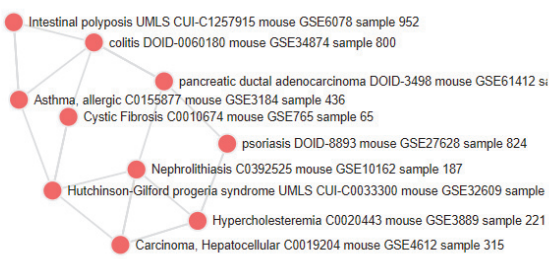


B

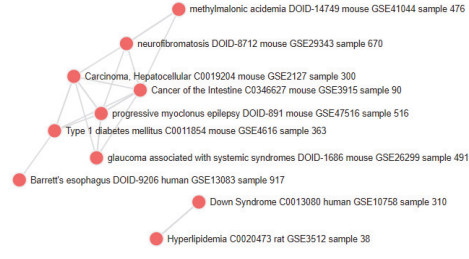
Down-regulated genes



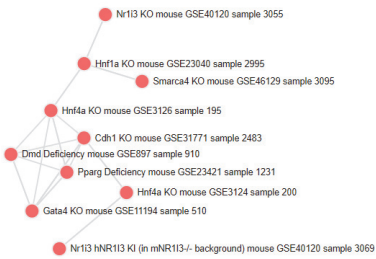
Disease Perturbation Down



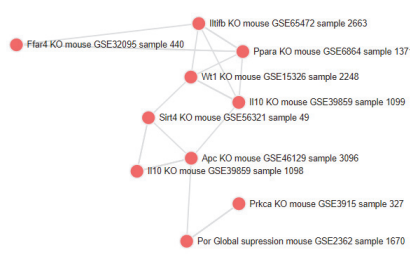
Disease Perturbation UP



Single gene Perturbation Down



Single gene Perturbation UP



ARTICLE DE REVUE



Thyroid hormone regulation of intestinal epithelial stem cell biology



Carla Frau, Matthias Godart, Michelina Plateroti*

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Université de Lyon, Université Lyon 1, Centre Léon Bérard, Département de La Recherche, 69000 Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2017

Received in revised form

28 February 2017

Accepted 2 March 2017

Available online 10 March 2017

Keywords:

Intestinal epithelium

Thyroid hormone

Thyroid hormone receptor TR

Stem cells

Wnt and notch pathways

ABSTRACT

The gastrointestinal tract is a well-characterized target of thyroid hormones and thyroid hormone nuclear receptors TRs, as extensively described in the literature. The paradigm is its important remodelling in amphibians during thyroid hormone-dependent metamorphosis. Interestingly, several studies have described the conservation of this hormonal signal during intestinal development in mammals. Additional data suggested that it may also play a role in intestinal homeostasis, stem cell physiology and progenitor commitment as well as in tumour development. It is worth underlining that in the mammalian intestine the functionality of the TR α 1 receptor is coordinated and integrated with other signalling pathways, such as Wnt and Notch, specifically at the level of stem/progenitor cell populations. Here, we summarize these data and concepts and discuss this new role for thyroid hormones and the TR α 1 receptor in the biology of intestinal epithelial precursor cells.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Thyroid hormones (THs), namely T3 and T4, are well known for their pleiotropic effects. Indeed, they are involved in multiple functions including metabolic processes, organism development and tissue homeostasis (Mullur et al., 2014). Thyroxin or T4 represents the principal form of THs synthesised by the thyroid gland. This production is directly controlled by the hypothalamo-pituitary-thyroid axis through hormones such as the thyrotropin realising hormone (TRH) and the thyroid-stimulating hormone (TSH) (Wondisford, 2004). T4 is released into the bloodstream and enters target cells that express TH transporters (Abe et al., 2002; Visser et al., 2011). T4 can have specific functions within cells (Davis et al., 2008, 2011), but its deiodination permits the synthesis of T3, which is the natural ligand of the thyroid hormone nuclear receptors TRs. TRs are actually T3-modulated transcription factors displaying specific expression patterns and functionalities depending on the tissue/cell context (Pascual and Aranda, 2013). Two genes in mammals, *THRA* and *THRB*, generate different TR isoforms through the use of different promoters or by alternative splicing (Cheng, 2000). Interestingly, both *THRA* and *THRB* encode *bona fide* nuclear receptors as well as proteins displaying a

dominant negative action, as a result of loss of specific functional domains (Cheng, 2000). The balanced expression of the different isoforms produced by the same locus, behaving in an antagonistic manner, actively participates in maintaining tissue homeostasis (Plateroti et al., 2001; Williams, 2000). From these observations, it appears clearly how all levels of dysfunction in T3/TR-dependent signalling, from the production of THs to the nuclear action, may cause many kinds of disorders, including growth impairment, delayed bone formation, dyslipidaemia, mental and motor development pathologies (Brown et al., 2013; Juby et al., 2016; Sayre and Lechleiter, 2012). For the specific aim of this review we will focus in particular on the importance of the T3-TRs in intestinal stem cell physiopathology, which also includes cancer development.

Organ-specific adult stem cells are of crucial importance for the maintenance of organ homeostasis (Mimeault and Batra, 2008). Their peculiarity lies in their ability to self-renew and to differentiate into specialized cell types in order to replace physiological cell loss or to regenerate and repair a tissue after injury (Barker et al., 2010; Mimeault and Batra, 2008; Williams and Hare, 2011; Yao et al., 2012). The clinical potentialities of stem cells is a major focus of medical research, especially in the field of regenerative medicine and cancer. Consequently, in recent years several efforts have been made to investigate stem cell biology and to explore their benefits and applications in transplantation (Barker et al., 2010; Mimeault and Batra, 2008; Williams and Hare, 2011; Yao et al., 2012). In addition, cancer stem cells are being deeply investigated, as the cells at the origin of cancer development and

* Corresponding author. Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), 28 Rue Laennec, 69373 Lyon, France.

E-mail address: michelina.plateroti@univ-lyon1.fr (M. Plateroti).

maintenance (Abbaszadegan et al., 2016), for their specific targeting. In this context, the mammalian intestine represents a powerful model to study organ-specific stem cells because of its high rate of proliferation and regeneration (Beumer and Clevers, 2016). In fact, crypt stem cells have become a very attractive model to study the role of stem cells both in physiological and pathological conditions (Li and Jasper, 2016).

Interestingly, the role of the THs and of the TRs on the stem cell biology of several tissues are being increasingly documented (Remaud et al., 2014; Sirakov et al., 2014; Sun et al., 2016; Swaroop et al., 2010), given that they have been shown to control the balance between cell proliferation and differentiation and cell fate decisions (Kress et al., 2009b; Pascual and Aranda, 2013; Puzianowska-Kuznicka et al., 2006). In mammals, stem cells of the central nervous system, muscles, skin and embryonic stem cells represent good examples of TH targets (Dentice et al., 2014; Lee et al., 2010; Lemkine et al., 2005; Lopez-Juarez et al., 2012; Milanesi et al., 2016; Tiede et al., 2010). The intestinal epithelium, the focus of this review, is another well-established TH target (Henning et al., 1994; Su et al., 1999). The importance of TH and of the TR α gene on intestinal physiology is evidenced by the fact that several diseases are associated with TR α mutations and/or altered TH levels in both human and animal models (Brown et al., 2013; Ebert, 2010; Kress et al., 2010; Moran and Chatterjee, 2015; Sirakov and Plateroti, 2011; van Mullem et al., 2012). Regarding intestinal cancers, in particular, experimental evidences support the concept that cancer initiating cells -or cancer stem cells- derive from the transformation of physiological stem cells and are at the origin of these cancers (Barker et al., 2009). However, studies also indicate that a marked plasticity is present within the intestinal crypts, suggesting that other cells of origin may exist (Huels and Sansom, 2015). Despite the accumulation of data, the role of THs and TR α 1 in the biology of the intestinal crypt cell populations needs to be more precisely defined, in particular regarding their action on cell plasticity. This need is further emphasized when considering the divergent effects of this same hormone in physiological versus pathological conditions (Brown et al., 2013; Sirakov et al., 2014; Skah et al., 2017). The development of engineered mouse models (knockin, knockout, reporter) together with the establishment of innovative cell culture approaches have revealed important mechanistic insights into the functions of THs in the intestinal epithelium. Here we summarize the most important findings regarding their role in intestinal physiology and stem cell biology.

2. Structure and functions of the intestinal epithelium

The mammalian intestine is a tubular organ that develops along an anterior-posterior axis and is subdivided into two regions: the small intestine and the colon. Three tissue layers constitute this organ, i) an outer layer composed of smooth muscle mainly involved in peristalsis which is controlled by the parasympathetic nervous system, ii) a middle layer of fibrous connective tissue, the submucosa, and finally iii) the inner layer or epithelium, directly in contact with the intestinal lumen and organized in a single sheet of polarized columnar cells (Randall et al., 2002).

The intestinal epithelium is responsible for the processing and absorption of nutrients; its absorptive surface is strongly enhanced by the presence of folds that in the small intestine (SI) appear as finger-like protrusions into the lumen and invaginations into the submucosa, the villi and the crypts of Lieberkuhn. In the colon, villi are missing and the cells at the top of the crypts form a flat surface (Stappenbeck et al., 1998). Interestingly, the vertical organization of the epithelium recapitulates a functional organization. Indeed, the villi (SI)/surface epithelium (colon) represent the differentiated compartment of the intestinal epithelium in which specialized cell

types are located (Crosnier et al., 2006; Noah et al., 2011), including absorptive cells, enteroendocrine cells and mucus-secreting goblet cells. A fourth cell type is present only in the SI, the Paneth cells, representing the only differentiated cells residing at the bottom of the crypts. These cells are responsible for the secretion of antimicrobial peptides and involved in the maintenance of the stem cell niche. The intestinal crypts represent the proliferative compartment of the epithelium, in which stem cells (SC) and progenitors are located and are responsible for the continuous renewal of the epithelium (Barker, 2014; Stappenbeck et al., 1998). SCs are crucial for intestinal homeostasis; through sophisticated and finely regulated processes they are considered to be the architects of the entire renewal of the epithelium, which is very rapid in mammals (4–5 days) and occurs continuously throughout life (Barker, 2014; Stappenbeck et al., 1998). Under physiological conditions, SCs self-renew and generate proliferative-committed progenitors that proliferate and differentiate, while migrating toward the tip of the axis, where they are finally exfoliated into the intestinal lumen after death by apoptosis (Barker, 2014; Clevers, 2013). A finely tuned crosstalk between several signalling pathways, including Wnt/ β -catenin, Notch, Hedgehog and bone morphogenetic protein (BMP) (van der Flier and Clevers, 2009), participates in the regulation of continuous self-renewal/proliferation/differentiation programs. Together with these more traditional pathways, THs and TRs, the specific focus of this review, play an important role in this network, both during intestinal development and in adult homeostasis (Kress et al., 2008; Plateroti et al., 1999, 2001). Of note, deregulation of this signal has been associated with cancer development (Kress et al., 2010).

2.1. The intestinal epithelium stem cells

The existence of intestinal epithelial SCs (ISC) has been proposed by Cheng and Leblond (1974). They suggested that all epithelial cells derive from a single stem cell residing in the intestinal crypts, named crypt base columnar (CBC) cells. Successively, functional approaches including labelling-retention, epithelial regeneration analysis and lineage tracing studies showed that ISCs are essentially quiescent in homeostatic conditions, are capable of generating all differentiated epithelial cells and that they are located around the +4 positions from the bottom of the crypts (Potten, 1977; Chwalinski et al., 1988; Bjerknes and Cheng, 1999). More recent studies identified specific ISCs markers leading to important advances in the characterization of their role in intestinal homeostasis, tissue repair and cancer development (Barker and Clevers, 2010). The most studied *bona fide* ISC marker is the leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (Lgr5), which is a Wnt target with an expression domain restricted to the crypts. Interestingly, using reporter mouse lines and lineage tracing approaches, Barker and colleagues (Barker et al., 2007) showed that Lgr5 is expressed specifically in CBC cells and that these cells are multipotent. However, conversely to the acquired notion on slow cycling somatic stem cells, they demonstrated that CBCs cycle actively every 24 h (Barker et al., 2007). A very elegant model of 3D-single cell culture revealed that a single Lgr5-positive stem cell is able to generate long-lived self-organising intestinal organoids, both from SI and colon (Sato et al., 2009). Their rapid cycling makes this population specifically implicated in the continuous renewal of the epithelium and renders these cells more sensitive to environmental stress. Interestingly, in agreement with the older studies, a population of slow cycling ISCs also exists, located around the +4 position of the crypts, that expresses several markers including mTert, Bmi1 and Hopx (Montgomery et al., 2011; Sangiorgi and Capecchi, 2008; Schepers et al., 2011; Takeda et al., 2011). Similar lineage tracing strategies have been employed to follow the fate of

the cells expressing these different markers and revealed that these cells are also *bona fide* stem cells with the ability to self-renew and give rise to all differentiated intestinal epithelium cell lineages (Montgomery et al., 2011; Sangiorgi and Capecchi, 2008; Takeda et al., 2011). Unlike CBC cells, however, this population is very slow cycling and therefore more protected from exogenous insults. It has been demonstrated that after the specific ablation of Lgr5-positive ISCs, Bmi1-expressing ISCs undergo activation in order to replenish CBC-type ISCs (Tian et al., 2011). As expected from their properties, Lgr5-positive ISCs are also able to generate new +4 stem cells (Takeda et al., 2011). Therefore, a dynamic inter-relationship between these two populations exists each of which exerts specific functions: one pool is involved in maintaining epithelium homeostasis and its continuous renewal (high-cycling/CBC cells) and the other pool represents a reservoir of ISCs specifically activated by injuries and responsible for the regeneration process. In accordance with these observations, a mouse model expressing the protein eGFP under the control of Musashi1's promoter, labelled the two populations of ISCs and enabled to describe their differences in terms of position within the crypts, expression of ISC markers and cycling activity (Cambuli et al., 2013).

Altogether, these studies demonstrate the presence of a complex stem-cell zone within the intestinal crypts, where the ISC populations exhibit different characteristics and plasticity.

3. Models to study TH-TR in intestinal stem cell physiopathology

A remarkable advance in our understanding of the different functions played by THs and TR genes has been made, based on the development of animal models recapitulating TH-linked disorders in patients. Mouse models such as Pax8^{-/-}, TTF1^{-/-} and hyt/hyt (C.RF/J-hyt/hyt mice) are well known examples of homozygote gene alterations mimicking congenital hypothyroidism, that leads to several degrees of TH-producing follicular cell aplasia or absence of the thyroid gland (Green et al., 1988; Mansouri et al., 1998; Montanelli and Tonacchera, 2010). The identification and study of these mutations not only contributed to a better understanding of endocrine diseases such as thyroid dysgenesis but also in defining the involvement of THs in the development and homeostasis of different organs and tissues (Green et al., 1988; Mansouri et al., 1998; Montanelli and Tonacchera, 2010). Moreover, these different and thorough studies paved the way for genetic analyses conducted in patients displaying TH-related pathologies. Indeed, the characterization of the syndrome of resistance to thyroid hormones (RTH) indicated the existence of mutations within *THRA* or *THRB* genes (Dumitrescu and Refetoff, 2000; Moran and Chatterjee, 2015). Given that tissues express different levels of TR α or TR β receptors, the RTH symptoms differ according to a specific organ or function analysed (Dumitrescu and Refetoff, 2000). Whereas TR β predominates in the hypothalamus-pituitary axis, kidney and liver (Flamant and Quignodon, 2010), TR α predominates in the heart, central nervous system, skeletal muscles, bone and intestine (Ortiga-Carvalho et al., 2014). When dealing with the RTH syndrome, the clinical picture is very different whether it depends on *THRA* or *THRB* gene (Dumitrescu and Refetoff, 2000). Of note, while the *THRB* mutations responsible for the RTH β syndrome were characterized in the nineties (Refetoff et al., 1994), the RTH α syndrome has a shorter history, since the first *THRA* mutation was characterized and the pathological traits described in a patient in 2012 (Bochukova et al., 2012).

Interestingly, mutations described in RTH β patients have been introduced in mouse models and permitted the detailed analysis of the importance of these mutations in different tissues/organs (Picou et al., 2014). One example is represented by the TRami

mouse (Quignodon et al., 2007), a model engineered to control the expression of a mutated receptor based on a point mutation described in RTH β patients (Darimont et al., 1998; Feng et al., 1998). This inducible (Cre/LoxP-dependent expression) mutated TR α 1 receptor (TR α 1L400R) is unable to release the corepressors and to recruit coactivators, therefore exerting a dominant negative activity, both in the presence or in the absence of T3 (Flamant and Quignodon, 2010; Quignodon et al., 2007). In these mice a retarded development is observed in several tissues/organs, such as the intestine, bone, and spleen hematopoietic cells, mimicking congenital hypothyroidism in mice (Flamant and Quignodon, 2010). All TR α 1 dominant negative mouse models including TR α 1L400R (Quignodon et al., 2007), TR α 1R438C (Tinnikov et al., 2002), TR α 1PV (Kaneshige et al., 2001), and TR α 1P398H (Liu et al., 2007), and similar TR β mutant mice (Picou et al., 2014) underline the importance of TRs for the pleiotropic functions played by THs during development, homeostasis and metabolism.

TRs are expressed in different organs not only during development but also in adulthood, which might explain their different functions during developmental or postnatal stages. In a complex tissue, such as the intestinal epithelium, which is physiologically rapidly regenerated, the importance of the TR α 1 receptor has been demonstrated, notably in controlling postnatal intestinal maturation. Indeed, TR α ^{-/-} mice present abnormal intestinal morphology, as assessed by a decrease in the number of epithelial cells and proliferating crypt cells (Plateroti et al., 1999). Using TR α ^{0/0} mice (Gauthier et al., 2001), it was shown that TR α 1 also participates in maintaining intestinal homeostasis of the crypt progenitor/stem cells through the regulation of the canonical Wnt pathway, by controlling sFRP2 and β -catenin expression and stabilization (Fig. 1) (Kress et al., 2009a; Plateroti et al., 2006). Interestingly, TR α 1 can also control the Notch pathway (Fig. 1) (Sirakov et al., 2015), known to be very important in intestinal SC biology and cell fate determination (Fre et al., 2011). Studies on an engineered mouse model expressing TR α 1 along the entire vertical epithelial axis (Kress et al., 2010) showed that this overexpression is sufficient to trigger a tumorigenic sequence in the murine intestinal epithelium (Kress et al., 2010). These results suggest that in the intestinal epithelium, as well as in other organs, the T3-TR pathway plays an important role in development and homeostasis, but that its deregulation can lead, on the one hand, to severe growth impairment and on the other hand, to hyperplasia and cancer.

To further explore the impact of this pathway on the balance between hypoplasia/hyperplasia and differentiation/proliferation, the use of *in vitro* models is critical. In the case of the intestinal epithelium several *ex vivo* models have been proposed, allowing in depth cellular and molecular analyses (Chopra et al., 2010). Organ cultures use small fragments of foetal or adult intestinal explants maintained in standard culture media enriched in foetal calf serum (Lorenzen et al., 2016). While offering some advantages, owing to the presence of the different tissues composing the intestinal mucosa, it was of limited interest in TH-TR studies. An *ex vivo* model of intestinal epithelium primary cultures has, however, been very helpful and used in several studies aimed at defining in depth mechanisms of action of T3 and TR α 1 (Kress et al., 2009a; Plateroti et al., 2006; Sirakov et al., 2015). The method has been highly improved since 1992 when Evans and colleagues (Evans et al., 1992) succeeded in establishing a primary new-born intestinal crypt culture system, in which epithelial cells adhered to collagen type-I-coated tissue culture dishes. According to the approach, the cells could be maintained in culture for several weeks (Evans et al., 1992). Despite the fact that this model is not adapted to study cell differentiation mechanisms, it is quite efficient for short-term analyses dealing with cell proliferation and with precursor cell biology. An improvement of this culture could be a co-culture

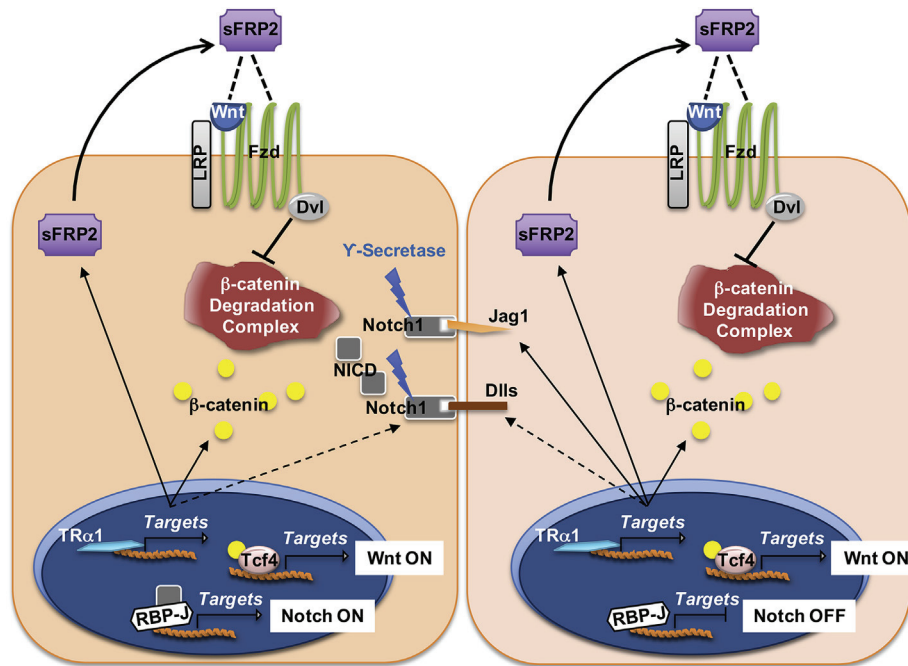


Fig. 1. Proposed molecular model for the action of TR α 1 on the Wnt and Notch pathways in intestinal crypt precursors. In the cells of intestinal crypts TR α 1 regulates the expression of several targets participating to the Wnt and Notch pathways. In the case of the Wnt pathway (right and left diagrams), the binding of TR α 1 to TREs positively regulates the expression of *Ctnnb1* (encoding for β -catenin) and *Sfrp2* genes. In turn, sFRP2 protein by interacting with the Wnt ligands (Wnt) and/or Frizzled receptors (Fzd) allows the recruitment of the cytoplasmic protein Dishevelled (Dvl) and the subsequent stabilization of β -catenin. In fact, this cascade results in the blockage of the β -catenin degradation complex and the translocation of β -catenin to the nucleus where it forms complexes with the transcription factor Tcf4, leading to the increased expression of Wnt-target genes. In the case of the Notch pathway the action of TR α 1 is exerted on two adjacent cells, one expressing Notch receptor(s) (left diagram) the other expressing Notch ligand(s) (right diagram). The enhanced transcription and expression of *Jag1* as well as the increased expression of Dlls (Dll1 and Dll4) in the ligand-expressing cell and of Notch1 on the adjacent cell is responsible for Notch1-intracellular domain (NICD) cleavage by the γ -secretases. NICD then translocates into the nucleus where it participates to the transcriptional regulation of Notch-target genes by forming a complex with the RBP-J transcription factor. By consequence, while TR α 1 and Wnt are active in both cell types, only the Notch-expressing cells display an active Notch pathway. Dashed arrows indicate indirect regulation; full arrows indicate direct transcriptional regulation.

model in which mesenchymal cells are present, enabling a reconstruction of the complex epithelial-mesenchymal interactions important for epithelial maturation (Fritsch et al., 2002; Plateroti et al., 1997), as it has elegantly been documented in the case of T3-dependent adult intestinal epithelium differentiation during amphibian metamorphosis (Hasebe et al., 2016a; Wen et al., 2015).

4. The role of TH on intestinal physiology

4.1. TH and TRs in intestinal physiology

The role of THs in intestinal development was first determined in studies on amphibian metamorphosis. In fact, during this post-natal developmental program, the gastrointestinal tract undergoes a dramatic remodelling, which includes a first phase of apoptosis and successively a strong increase in cell proliferation (Brown and Cai, 2007). As said in the previous section, the generation of animal models has strongly helped in defining the function of THs and TRs in this organ (Sirakov and Plateroti, 2011). More importantly, recent works described mutations in the TR α 1 receptor in patients, affecting its functionality. Interestingly, these mutations disturb the intestinal functionality (Bochukova et al., 2012; van Mullem et al., 2012).

Cellular TH availability, thus TR's functionality, depends on the expression pattern of genes/proteins controlling TH signal reception and metabolism. The deiodinase selenoenzymes, which are responsible for THs activation and inactivation (Bianco and Kim, 2006), are dynamically expressed during amphibian metamorphosis. In particular, at the climax the intestinal expression of

Dio2 increases and that of Dio3 decreases (Cai and Brown, 2004; Ishizuya-Oka and Shi, 2005). The modulation of both Dio2 and Dio3 expression can be correlated with increased levels of T3 that in turn induce the cell proliferation within the developing adult epithelium (Ishizuya-Oka and Shi, 2005). In mammals, the deiodinases are expressed at very low levels both during the intestinal development and in adult stages (Bates et al., 1999; Sirakov et al., 2012; Dentice et al., 2012). Regarding the expression of the TRs, in the pre-metamorphic intestine of tadpoles TR α displays low expression levels that remain almost unaltered all along the metamorphosis. On the contrary, TR β , that is also slightly expressed before the metamorphosis, is strongly induced by increased TH levels (Ishizuya-Oka and Shi, 2005). Interestingly, both TRs play a fundamental role during the entire gut remodelling processes (Das et al., 2010). In mammals a clear function of TR β in the intestinal development and/or homeostasis has not been established (Plateroti et al., 1999), despite its expression in villus-associated differentiated epithelial cells (Sirakov et al., 2014). A few reports described that both TR α 1 and TR β 1 expression in the postnatal intestine is developmentally regulated (Hodin et al., 1994; Plateroti et al., 1999, 2006). Moreover, we showed that TR α 1 is present exclusively in the cells of the intestinal crypts and of the smooth muscle layers (Plateroti et al., 1999, 2006; Kress et al., 2009a; Sirakov et al., 2014).

According to the specific expression pattern, the analyses performed in TR α and TR β knockout mouse models (Fraichard et al., 1997; Gauthier et al., 1999, 2001; Plateroti et al., 2001) showed that THs through the TR α 1 receptor regulate the proliferation of crypt epithelial precursors during the maturation at weaning as

well as at adulthood (Plateroti et al., 1999; rev. in Sirakov and Plateroti, 2011). Interestingly, this regulation involves complex gene networks that include the Wnt, Notch and BMP pathways (Kress et al., 2009a).

Contrariwise to the data available for intestinal development, the role of THs in adult intestinal physiology remained poorly described and findings were limited to their function in metabolic processes, such as the absorption and secretion of nutrients (Henning et al., 1994; Jumarie and Malo, 1994; Matosin-Matekalo et al., 1999). The characterization of mutations in the TR α 1 receptor in patients has clearly renewed the interest in studying this receptor in the context of the RTH α syndrome and also provided a novel view regarding the role of TR α 1 in intestinal physiopathology. The two original mutations described generate a non-functional dominant negative receptor, which in fact blocks the functionality of the WT TR α 1 (Bochukova et al., 2012; van Mullem et al., 2012). The patients present symptoms of hypothyroidism, including high levels of circulating TSH, impaired bone maturation and brain development. In addition, both patients suffer from altered intestinal peristalsis, characterized in particular by reduced bowel movements. The enteric nervous system through the smooth muscle tissues controls these movements (Furness, 2012), opening to new potential functions of TR α 1 in the pathophysiology of these tissues. One of the two studies analysed the histology of the colon mucosa, but no overt abnormalities have been found (Bochukova et al., 2012). This result strongly suggests that we need more detailed studies to define the origin of the reduced bowel motility due to the TR α 1 mutation. Interestingly, one of the first TR α -mutant mouse model, the TR α ^{-/-} animals (Fraichard et al., 1997), lacking the expression of TR α 1 and TR α 2 but retaining the expression of the short TR $\Delta\alpha$ isoforms, present a strongly reduced ileal muscular activity together with a substantial reduction in the number of intestinal epithelial proliferating cells. Given that all the phenotypical alterations of these mice are stronger than that described for the complete TR α (TR α ^{0/0}) or TR α 1 knockouts (Gauthier et al., 2001; Plateroti et al., 2001; Wikstrom et al., 1998), it is worth speculating that in TR α ^{-/-} mice, the short isoforms, behaving as negative modulators of the TRs or of other nuclear receptors (Chassande et al., 1997), might mimic the dominant negative activity of TR α 1 mutations described in patients.

4.2. THs and TRs in intestinal stem cell biology

As already mentioned in previous sections, increasing amount of data are describing the role of the THs and of the TRs on the stem cell biology (rev. in Remaud et al., 2014; Sirakov et al., 2014; Sun et al., 2016; Swaroop et al., 2010). This is the case of mammalian embryonic stem cells or of stem cells of the central nervous system, muscles and skin (Dentice et al., 2014; Lee et al., 2010; Lemkine et al., 2005; Lopez-Juarez et al., 2012; Milanese et al., 2016; Tiede et al., 2010), where TH-TR can control the balance between cell proliferation and differentiation as well as cell fate decisions (rev. in Kress et al., 2009b; Pascual and Aranda, 2013; Puzianowska-Kuznicka et al., 2006).

In the case of the intestinal epithelial progenitor/stem cell physiology, the focus of this review, several evidences support the specific actions of TH-TR α 1, given that they can influence their proliferative capacity (Sirakov and Plateroti, 2011). In fact, the regeneration of the intestinal epithelium in TR α ^{0/0} mice exposed to γ -ray irradiation is strongly impaired (Kress et al., 2008), while the targeted overexpression of TR α 1 in the intestinal epithelium (*vil*-TR α 1 mice) promotes crypt hyperplasia, hyperproliferation and adenoma development (Kress et al., 2010). It is worth underlying that the aberrant villi architecture observed in these mice can be due to increased crypt fission (Park et al., 1995), which directly

reflects an increased stem cell activity (Snippert et al., 2014). In agreement with this assumption, TR α 1 overexpression in a tumour-prone model (*vil*-TR α 1/*Apc* mice) accelerates the intestinal tumorigenic process (Kress et al., 2010). Regarding the function of TH in human gastrointestinal physiopathology, except for an effect on bowel movements (Ebert, 2010), we have only limited, and sometimes contradictory, data (Iishi et al., 1992; Rose and Davis, 1981). This is also the case for mutations or altered expression of TRs in human gastric or colon cancers (Horkko et al., 2006; Lin et al., 1996, 1997; Modica et al., 2010; Wang et al., 2002). In light of the different sets of data from both animal models and human pathology, we may speculate on an eventual reduction of the intestinal epithelial cell proliferation in RTH α patients. This negative action of the mutated TR α 1 can have specific repercussions in the case of intestinal pathologies needing intact proliferative capacities of the precursor cells, such as epithelial regeneration after inflammation (Koch and Nusrat, 2012).

A specific mechanism of TH-TR action on the intestinal stem cell biology, which includes self-renewal and multipotency, is emerging and, as mentioned above, several findings support this action (Sirakov et al., 2013; Sirakov et al., 2014). Indeed, the larval intestinal epithelium of *Xenopus* tadpoles lacks stem cells, but they emerge when the adult epithelium forms at the climax of the TH-dependent metamorphosis (Ishizuya-Oka et al., 2009). Interestingly, several genes that are suitable or putative markers of intestinal epithelial stem cells in mammals are strongly and transiently up-regulated by the increased TH levels during the process of stem cell appearance (Shi et al., 2011). One of these markers, Musashi1, is regulated by THs in both metamorphic gut in tadpoles and in developing mouse intestine (Rezza et al., 2010). Of note, THs not only induce the expression of common stem cell markers but also activate the Wnt and Notch pathways in both developing models (Kress et al., 2009a; Sirakov et al., 2015; Hasebe et al., 2016a, 2016b). In addition, a recent study on human colon cancer stem cells indicated a function of T3 in blocking stem cells and in inducing their differentiation (Catalano et al., 2016). Interestingly, the activation of both Notch and BMP pathways has been shown in accordance with the mentioned studies in mouse models (Kress et al., 2009a; Sirakov et al., 2015).

5. Conclusions

Investigators have been studying the function of the THs for over a century. In fact, TH and amphibian metamorphosis represented a key system for developmental biologists (Shi and Ishizuya-Oka, 2001; Tata, 2006), and thyroid-related human pathologies enabled scientists to understand the clinical consequences of altered TH levels (Horsley, 1885; Ord, 1878; Pitt-Rivers, 1963; Ross, 1994). After a century this dogma has now been enlarged to studies aimed at better characterizing the importance of these hormones and of TRs in stem cell biology and cancer. Indeed, new concepts have been proposed regarding the cross-regulations between TH-TRs and other signalling pathways as well as their implication in stem/progenitor cell biology, for instance in intestinal crypts. In fact, recent studies illustrate that the TH is integrated with other tissue-intrinsic signals at the level of the stem/progenitor crypt cells (Ishizuya-Oka and Shi, 2012; Kress et al., 2009a), participating in a complex signalling network (Kress et al., 2009a, 2010; Sirakov et al., 2015) (Fig. 1). These cross-regulations are important not only for stem/progenitor cell physiology but also, according to a new emerging concept, for “cancer stem cell” biology (Vermeulen et al., 2008). It is worth noting that even if debated (Huels and Sansom, 2015) the “stem cell origin” of intestinal tumours is now well documented in animal models (Barker et al., 2009), and confirmed in humans (Li and Jasper, 2016). In light of these emerging

functions, we can attempt to alter the TH-TR α 1 signal or its reception specifically in stem/progenitor cells. Some interesting 3D culture models are now proposed to generate pure epithelial organoids (Date and Sato, 2015; Mahe et al., 2015; Sato et al., 2009) or multi-tissue organoids generated by mixing epithelial and mesenchymal cells (Ootani et al., 2009), both of which can be transplanted into an injured mucosa where they are integrated and participate in maintaining intestinal homeostasis (Shaker and Rubin, 2012). These systems, in effect, can provide multiple applications not only for regenerative medicine but also as diagnostic tests and disease modelling. Indeed, specific genes can be engineered by using the new technology based on CRISPR/CAS9 editing enzymes (Clevers, 2016) to repair or to introduce mutations. Altogether, these new technologies will help address unresolved issues concerning RTHs and other TH-linked human pathologies by facilitating cognitive approaches as well as clinical trials.

Acknowledgements

The work in the Plateroti lab is supported by Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (N^o PGA1201402000834), by the Institut National pour le Cancer (PLBIO14-292) and by the Département du Rhone de la Ligue contre le cancer (grant N^o 137838). CF received support by the Fondation ARC (N^o PDF20141202107).

References

- Abbaszadegan, M.R., Bagheri, V., Razavi, M.S., Momtazi, A.A., Sahebkar, A., Gholamin, M., 2016. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: a review. *J. Cell. Physiol.* [Epub ahead of print].
- Abe, T., Suzuki, T., Unno, M., Tokui, T., Ito, S., 2002. Thyroid hormone transporters—recent advances. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 215–220.
- Barker, N., 2014. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature reviews. Mol. cell Biol.* 15, 19–33.
- Barker, N., Bartfeld, S., Clevers, H., 2010. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell stem cell* 7, 656–670.
- Barker, N., Clevers, H., 2010. Lineage tracing in the intestinal epithelium. *Current Protocols in Stem Cell Biology* Chapter 5, Unit5A 4.
- Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., Clevers, H., 2009. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608–611.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al., 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003–1007.
- Bates, J.M., St Germain, D.L., Galton, V.A., 1999. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology* 140, 844–851.
- Beumer, J., Clevers, H., 2016. Regulation and plasticity of intestinal stem cells during homeostasis and regeneration. *Development* 143, 3639–3649.
- Bianco, A.C., Kim, B.W., 2006. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* 116, 2571–2579.
- Bjerknes, M., Cheng, H., 1999. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 116, 7–14.
- Bochukova, E., Schoenmakers, N., Agostini, M., Schoenmakers, E., Rajanayagam, O., Keogh, J.M., Henning, E., Reinemund, J., Gevers, E., Sarri, M., et al., 2012. A mutation in the thyroid hormone receptor alpha gene. *N. Engl. J. Med.* 366, 243–249.
- Brown, A.R., Simmen, R.C., Simmen, F.A., 2013. The role of thyroid hormone signaling in the prevention of digestive system cancers. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 16240–16257.
- Brown, D.D., Cai, L., 2007. Amphibian metamorphosis. *Dev. Biol.* 306, 20–33.
- Cai, L., Brown, D.D., 2004. Expression of type II iodothyronine deiodinase marks the time that a tissue responds to thyroid hormone-induced metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 266, 87–95.
- Cambuli, F.M., Rezza, A., Nadjar, J., Plateroti, M., 2013. Musashi1-Egfp mice, a new tool for differential isolation of the intestinal stem cell populations. *Stem Cells* 31, 5.
- Catalano, V., Dentice, M., Ambrosio, R., Luongo, C., Carollo, R., Benfante, A., Todaro, M., Stassi, G., Salvatore, D., 2016. Activated thyroid hormone promotes differentiation and chemotherapeutic sensitization of colorectal cancer stem cells by regulating Wnt and BMP4 signaling. *Cancer Res.* 76, 1237–1244.
- Chassande, O., Fraichard, A., Gauthier, K., Flamant, F., Legrand, C., Savatier, P., Laudet, V., Samarut, J., 1997. Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Mol. Endocrinol.* 11, 1278–1290.
- Cheng, H., Leblond, C.P., 1974. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am. J. Anat.* 141, 461–479.
- Cheng, S.Y., 2000. Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 1, 9–18.
- Chopra, D.P., Dombkowski, A.A., Stemmer, P.M., Parker, G.C., 2010. Intestinal epithelial cells in vitro. *Stem cells Dev.* 19, 131–142.
- Chwalinski, S., Potten, C.S., Evans, G., 1988. Double labelling with bromodeoxyuridine and [3H]-thymidine of proliferative cells in small intestinal epithelium in steady state and after irradiation. *Cell tissue Kinet.* 21, 317–329.
- Clevers, H., 2013. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* 154, 274–284.
- Clevers, H., 2016. Modeling development and disease with organoids. *Cell* 165, 1586–1597.
- Crosnier, C., Stamatakis, D., Lewis, J., 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* 7, 349–359.
- Darimont, B.D., Wagner, R.L., Apriletti, J.W., Stallcup, M.R., Kushner, P.J., Baxter, J.D., Fletterick, R.J., Yamamoto, K.R., 1998. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes & Dev.* 12, 3343–3356.
- Das, B., Matsuda, H., Fujimoto, K., Sun, G., Matsuura, K., Shi, Y.B., 2010. Molecular and genetic studies suggest that thyroid hormone receptor is both necessary and sufficient to mediate the developmental effects of thyroid hormone. *General Comp. Endocrinol.* 168, 174–180.
- Date, S., Sato, T., 2015. Mini-gut organoids: reconstitution of the stem cell niche. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 31, 269–289.
- Davis, P.J., Davis, F.B., Mousa, S.A., Luidens, M.K., Lin, H.Y., 2011. Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 99–115.
- Davis, P.J., Leonard, J.L., Davis, F.B., 2008. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 211–218.
- Dentice, M., Ambrosio, R., Damiano, V., Sibilio, A., Luongo, C., Guardiola, O., Yennek, S., Zordan, P., Minchiotti, G., Colao, A., et al., 2014. Intracellular inactivation of thyroid hormone is a survival mechanism for muscle stem cell proliferation and lineage progression. *Cell metab.* 20, 1038–1048.
- Dentice, M., Luongo, C., Ambrosio, R., Sibilio, A., Casillo, A., Iaccarino, A., Troncone, G., Fenzi, G., Larsen, P.R., Salvatore, D., 2012. beta-Catenin regulates deiodinase levels and thyroid hormone signaling in colon cancer cells. *Gastroenterology* 143, 1037–1047.
- Dumitrescu, A.M., Refetoff, S., 2000. Impaired Sensitivity to Thyroid Hormone: Defects of Transport, Metabolism and Action. *Endotext*.
- Ebert, E.C., 2010. The thyroid and the gut. *J. Clin. Gastroenterol.* 44, 402–406.
- Evans, G.S., Flint, N., Somers, A.S., Eyden, B., Potten, C.S., 1992. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *J. cell Sci.* 101 (Pt 1), 219–231.
- Feng, W., Ribeiro, R.C., Wagner, R.L., Nguyen, H., Apriletti, J.W., Fletterick, R.J., Baxter, J.D., Kushner, P.J., West, B.L., 1998. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 280, 1747–1749.
- Flamant, F., Quignodon, L., 2010. Use of a new model of transgenic mice to clarify the respective functions of thyroid hormone receptors in vivo. *Heart Fail. Rev.* 15, 117–120.
- Fraichard, A., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J.P., Trouillas, J., Dehay, C., Legrand, C., Gauthier, K., Kedinger, M., Malaval, L., et al., 1997. The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *EMBO J.* 16, 4412–4420.
- Fre, S., Bardin, A., Robine, S., Louvard, D., 2011. Notch signaling in intestinal homeostasis across species: the cases of *Drosophila*, Zebrafish and the mouse. *Exp. cell Res.* 317, 2740–2747.
- Fritsch, C., Swietlicki, E.A., Lefebvre, O., Kedinger, M., Iordanov, H., Levin, M.S., Rubin, D.C., 2002. Epimorphin expression in intestinal myofibroblasts induces epithelial morphogenesis. *J. Clin. investigation* 110, 1629–1641.
- Furness, J.B., 2012. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature reviews. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 286–294.
- Gauthier, C., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J.P., Legrand, C., Pain, B., Rousset, B., Weiss, R., Trouillas, J., Samarut, J., 1999. Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J.* 18, 623–631.
- Gauthier, K., Plateroti, M., Harvey, C.B., Williams, G.R., Weiss, R.E., Refetoff, S., Willott, J.F., Sundin, V., Roux, J.P., Malaval, L., et al., 2001. Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus. *Mol. Cell Biol.* 21, 4748–4760.
- Green, R.P., Birkenmeier, E.H., Beamer, W.G., Maltais, L.J., Gordon, J.I., 1988. The hypothyroid (hyt/hyt) mouse: a model system for studying the effects of thyroid hormone on developmental changes in gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5592–5596.
- Hasebe, T., Fujimoto, K., Kajita, M., Ishizuya-Oka, A., 2016a. Thyroid hormone activates Wnt/ β -catenin signaling involved in adult epithelial development during intestinal remodeling in *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res.* 365 (2), 309–318.
- Hasebe, T., Fujimoto, K., Kajita, M., Fu, L., Shi, Y.B., Ishizuya-Oka, A., 2016b. Thyroid hormone-induced activation of Notch signaling is required for adult intestinal stem cell development during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Stem cells*, 2016 Nov 21.
- Henning, S.J., Rubin, D., Shulman, J., 1994. Ontogeny of the intestinal mucosa. In: Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, third ed. Raven

- Press, New York, pp. 571–601.
- Hodin, R.A., Meng, S., Chamberlain, S.M., 1994. Thyroid hormone responsiveness is developmentally regulated in the rat small intestine: a possible role for the alpha-2 receptor variant. *Endocrinology* 135, 564–568.
- Horkko, T.T., Tuppurainen, K., George, S.M., Jernvall, P., Karttunen, T.J., Mäkinen, M.J., 2006. Thyroid hormone receptor beta1 in normal colon and colorectal cancer: association with differentiation, polypoid growth type and K-ras mutations. *Int. J. Cancer* 118, 1653–1659.
- Horsley, V., 1885. The Brown lectures on pathology. *Br. Med. J.* 1, 419–423.
- Huels, D.J., Sansom, O.J., 2015. Stem vs non-stem cell origin of colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 113, 1–5.
- Iishi, H., Tatsuta, M., Baba, M., Okuda, S., Taniguchi, H., 1992. Enhancement by thyroxine of experimental carcinogenesis induced in rat colon by azoxymethane. *Int. J. Cancer* 50, 974–976.
- Ishizuya-Oka, A., Hasebe, T., Buchholz, D.R., Kajita, M., Fu, L., Shi, Y.B., 2009 Aug. Origin of the adult intestinal stem cells induced by thyroid hormone in *Xenopus laevis*. *FASEB J. official Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23 (8), 2568–2575.
- Ishizuya-Oka, A., Shi, Y.B., 2005. Molecular mechanisms for thyroid hormone-induced remodeling in the amphibian digestive tract: a model for studying organ regeneration. *Dev. Growth & Differ.* 47, 601–607.
- Ishizuya-Oka, A., Shi, Y.B., 2012. Evolutionary insights into postembryonic development of adult intestinal stem cells. *Cell Biosci.* 1, 37.
- Juby, A.G., Hanly, M.G., Lukaczer, D., 2016. Clinical challenges in thyroid disease: time for a new approach? *Maturitas* 87, 72–78.
- Jumarie, C., Malo, C., 1994. Alkaline phosphatase and peptidase activities in Caco-2 cells: differential response to triiodothyronine. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 30A, 753–760.
- Kaneshige, M., Suzuki, H., Kaneshige, K., Cheng, J., Wimbrow, H., Barlow, C., Willingham, M.C., Cheng, S., 2001. A targeted dominant negative mutation of the thyroid hormone alpha 1 receptor causes increased mortality, infertility, and dwarfism in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 15095–15100.
- Koch, S., Nusrat, A., 2012. The life and death of epithelia during inflammation: lessons learned from the gut. *Annu. Rev. Pathol.* 7, 35–60.
- Kress, E., Rezza, A., Nadjar, J., Samarut, J., Plateroti, M., 2008. The thyroid hormone receptor-alpha (TRalpha) gene encoding TRalpha1 controls deoxyribonucleic acid damage-induced tissue repair. *Mol. Endocrinol.* 22, 47–55.
- Kress, E., Rezza, A., Nadjar, J., Samarut, J., Plateroti, M., 2009a. The frizzled-related sFRP2 gene is a target of thyroid hormone receptor alpha1 and activates beta-catenin signaling in mouse intestine. *J. Biol. Chem.* 284, 1234–1241.
- Kress, E., Samarut, J., Plateroti, M., 2009b. Thyroid hormones and the control of cell proliferation or cell differentiation: paradox or duality? *Mol. Cell. Endocrinol.* 313, 36–49.
- Kress, E., Skah, S., Sirakov, M., Nadjar, J., Gadot, N., Scoazec, J.Y., Samarut, J., Plateroti, M., 2010. Cooperation between the thyroid hormone receptor TRalpha1 and the WNT pathway in the induction of intestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* 138, 1863–1874.
- Lee, Y.K., Ng, K.M., Chan, Y.C., Lai, W.H., Au, K.W., Ho, C.Y., Wong, L.Y., Lau, C.P., Tse, H.F., Siu, C.W., 2010. Triiodothyronine promotes cardiac differentiation and maturation of embryonic stem cells via the classical genomic pathway. *Mol. Endocrinol.* 24, 1728–1736.
- Lemkine, G.F., Raj, A., Alfama, G., Turque, N., Hassani, Z., Alegria-Prevot, O., Samarut, J., Levi, G., Demeneix, B.A., 2005. Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *FASEB J. official Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 19, 863–865.
- Li, H., Jasper, H., 2016. Gastrointestinal stem cells in health and disease: from flies to humans. *Dis. Model. Mech.* 9, 487–499.
- Lin, K.H., Zhu, X.G., Hsu, H.C., Chen, S.L., Shieh, H.Y., Chen, S.T., McPhie, P., Cheng, S.Y., 1997. Dominant negative activity of mutant thyroid hormone alpha1 receptors from patients with hepatocellular carcinoma. *Endocrinology* 138, 5308–5315.
- Lin, K.H., Zhu, X.G., Shieh, H.Y., Hsu, H.C., Chen, S.T., McPhie, P., Cheng, S.Y., 1996. Identification of naturally occurring dominant negative mutants of thyroid hormone alpha 1 and beta 1 receptors in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Endocrinology* 137, 4073–4081.
- Liu, Y.Y., Heymann, R.S., Moatamed, F., Schultz, J.J., Sobel, D., Brent, G.A., 2007. A mutant thyroid hormone receptor alpha antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in vivo and impairs fatty acid oxidation. *Endocrinology* 148, 1206–1217.
- Lopez-Juarez, A., Remaud, S., Hassani, Z., Jolivet, P., Pierre Simons, J., Sontag, T., Yoshikawa, K., Price, J., Morvan-Dubois, G., Demeneix, B.A., 2012. Thyroid hormone signaling acts as a neurogenic switch by repressing Sox2 in the adult neural stem cell niche. *Cell stem cell* 10, 531–543.
- Lorenzen, U.S., Hansen, G.H., Danielsen, E.M., 2016. Organ culture as a model system for studies on enterotoxin interactions with the intestinal epithelium. *Methods Mol. Biol.* 1396, 159–166.
- Mahe, M.M., Sundaram, N., Watson, C.L., Shroyer, N.F., Helmrath, M.A., 2015 Mar. Establishment of human epithelial enteroids and colonoids from whole tissue and biopsy. *J. Vis. Exp. JoVE* 6 (97).
- Mansouri, A., Chowdhury, K., Gruss, P., 1998. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat. Genet.* 19, 87–90.
- Matosin-Matekalo, M., Mesonero, J.E., Laroche, T.J., Lacasa, M., Brot-Laroche, E., 1999. Glucose and thyroid hormone co-regulate the expression of the intestinal fructose transporter GLUT5. *Biochem. J.* 339 (Pt 2), 233–239.
- Milanesi, A., Lee, J.W., Kim, N.H., Liu, Y.Y., Yang, A., Sedrakyan, S., Kahng, A., Cervantes, V., Tripuraneni, N., Cheng, S.Y., et al., 2016. Thyroid hormone receptor alpha plays an essential role in male skeletal muscle myoblast proliferation, differentiation, and response to injury. *Endocrinology* 157, 4–15.
- Mimeault, M., Batra, S.K., 2008. Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem cell Rev.* 4, 27–49.
- Modica, S., Gofflot, F., Murzilli, S., D'Orazio, A., Salvatore, L., Pellegrini, F., Nicolucci, A., Tognoni, G., Copetti, M., Valanzano, R., et al., 2010 Feb. The intestinal nuclear receptor signature with epithelial localization patterns and expression modulation in tumors. *Gastroenterology* 138 (2), 636–648.
- Montanelli, L., Tonacchera, M., 2010. Genetics and phenomics of hypothyroidism and thyroid dys- and agenesis due to PAX8 and TTF1 mutations. *Mol. Cell. Endocrinol.* 322, 64–71.
- Montgomery, R.K., Carlone, D.L., Richmond, C.A., Farilla, L., Kranendonk, M.E., Henderson, D.E., Baffour-Awuah, N.Y., Ambruzs, D.M., Fogli, L.K., Algra, S., et al., 2011. Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 179–184.
- Moran, C., Chatterjee, K., 2015. Resistance to thyroid hormone due to defective thyroid receptor alpha. *Best practice & research. Clin. Endocrinol. Metab.* 29, 647–657.
- Mullur, R., Liu, Y.Y., Brent, G.A., 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 94, 355–382.
- Noah, T.K., Donahue, B., Shroyer, N.F., 2011. Intestinal development and differentiation. *Exp. Cell Res.* 317, 2702–2710.
- Ootani, A., Li, X., Sangiorgi, E., Ho, Q.T., Ueno, H., Toda, S., Sugihara, H., Fujimoto, K., Weissman, I.L., Capecchi, M.R., et al., 2009. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat. Med.* 15, 701–706.
- Ord, W.M., 1878. On Myxoedjema, a term proposed to be applied to an essential condition in the “Cretinoid” affection occasionally observed in middle-aged Women. *Medico-chirurgical Trans.* 61, 57–78, 55.
- Ortiga-Carvalho, T.M., Sidhaye, A.R., Wondisford, F.E., 2014. Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nature reviews. Endocrinology* 10, 582–591.
- Park, H.S., Goodlad, R.A., Wright, N.A., 1995. Crypt fission in the small intestine and colon. A mechanism for the emergence of G6PD locus-mutated crypts after treatment with mutagens. *Am. J. Pathol.* 147, 1416–1427.
- Pascual, A., Aranda, A., 2013. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3908–3916.
- Picou, F., Fauquier, T., Chatonnet, F., Richard, S., Flamant, F., 2014. Deciphering direct and indirect influence of thyroid hormone with mouse genetics. *Mol. Endocrinol.* 28, 429–441.
- Pitt-Rivers, R., 1963. Biochemistry and physiology of thyroid hormones. *N. Y. state J. Med.* 63, 43–49.
- Plateroti, M., Chassande, O., Fraichard, A., Gauthier, K., Freund, J.N., Samarut, J., Kedinger, M., 1999. Involvement of TRalpha- and beta-receptor subtypes in mediation of T3 functions during postnatal murine intestinal development. *Gastroenterology* 116, 1367–1378.
- Plateroti, M., Freund, J.N., Leberquier, C., Kedinger, M., 1997. Mesenchyme-mediated effects of retinoic acid during rat intestinal development. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 10), 1227–1238.
- Plateroti, M., Gauthier, K., Domon-Dell, C., Freund, J.N., Samarut, J., Chassande, O., 2001. Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4761–4772.
- Plateroti, M., Kress, E., Mori, J.L., Samarut, J., 2006. Thyroid hormone receptor alpha1 directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3204–3214.
- Potten, C.S., 1977. Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. *Nature* 269, 518–521.
- Puzianowska-Kuznicka, M., Pietrzak, M., Turowska, O., Nauman, A., 2006. Thyroid hormones and their receptors in the regulation of cell proliferation. *Acta biochim. Pol.* 53, 641–650.
- Quignodon, L., Vincent, S., Winter, H., Samarut, J., Flamant, F., 2007. A point mutation in the activation function 2 domain of thyroid hormone receptor alpha1 expressed after CRE-mediated recombination partially recapitulates hypothyroidism. *Mol. Endocrinol.* 21, 2350–2360.
- Randall, D., Burggren, W., French, K., 2002. *Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*. W.H. Freeman and Co, New York.
- Refetoff, S., Weiss, R.E., Wing, J.R., Sarne, D., Chyna, B., Hayashi, Y., 1994. Resistance to thyroid hormone in subjects from two unrelated families is associated with a point mutation in the thyroid hormone receptor beta gene resulting in the replacement of the normal proline 453 with serine. *Thyroid* 4, 249–254.
- Remaud, S., Gothie, J.D., Morvan-Dubois, G., Demeneix, B.A., 2014. Thyroid hormone signaling and adult neurogenesis in mammals. *Front. Endocrinol.* 5, 62.
- Rezza, A., Skah, S., Roche, C., Nadjar, J., Samarut, J., Plateroti, M., 2010. The over-expression of the putative gut stem cell marker Musashi-1 induces tumorigenesis through Wnt and Notch activation. *J. Cell Sci.* 123, 3256–3265.
- Rose, D.P., Davis, T.E., 1981. Plasma thyronine levels in carcinoma of the breast and colon. *Arch. Intern Med.* 141, 1161–1164.
- Ross, D.S., 1994. Hyperthyroidism, thyroid hormone therapy, and bone. *Thyroid* 4, 319–326.
- Sangiorgi, E., Capecchi, M.R., 2008. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat. Genet.* 40, 915–920.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al., 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459,

- 262–265.
- Sayre, N.L., Lechleiter, J.D., 2012. Fatty acid metabolism and thyroid hormones. *Curr. trends Endocrinol.* 6, 65–76.
- Schepers, A.G., Vries, R., van den Born, M., van de Wetering, M., Clevers, H., 2011. Lgr5 intestinal stem cells have high telomerase activity and randomly segregate their chromosomes. *EMBO J.* 30, 1104–1109.
- Shaker, A., Rubin, D.C., 2012. Stem cells: one step closer to gut repair. *Nature* 485, 181–182.
- Shi, Y.B., Hasebe, T., Fu, L., Fujimoto, K., Ishizuya-Oka, A., 2011. The development of the adult intestinal stem cells: insights from studies on thyroid hormone-dependent amphibian metamorphosis. *Cell & Biosci.* 1, 30.
- Shi, Y.B., Ishizuya-Oka, A., 2001. Thyroid hormone regulation of apoptotic tissue remodeling: implications from molecular analysis of amphibian metamorphosis. *Prog. nucleic acid Res. Mol. Biol.* 65, 53–100.
- Sirakov, M., Boussouar, A., Kress, E., Frau, C., Lone, I.N., Nadjar, J., Angelov, D., Plateroti, M., 2015. The thyroid hormone nuclear receptor TRalpha1 controls the Notch signaling pathway and cell fate in murine intestine. *Development* 142, 2764–2774.
- Sirakov, M., Kress, E., Nadjar, J., Plateroti, M., 2014. Thyroid hormones and their nuclear receptors: new players in intestinal epithelium stem cell biology? *Cell. Mol. life Sci. : CMLS* 71, 2897–2907.
- Sirakov, M., Plateroti, M., 2011. The thyroid hormones and their nuclear receptors in the gut: from developmental biology to cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 938–946.
- Sirakov, M., Skah, S., Lone, I.N., Nadjar, J., Angelov, D., Plateroti, M., 2012. Multi-level interactions between the nuclear receptor TRalpha1 and the WNT effectors beta-catenin/Tcf4 in the intestinal epithelium. *PLoS One* 7, e34162.
- Sirakov, M., Skah, S., Nadjar, J., Plateroti, M., 2013 Jul. Thyroid hormone's action on progenitor/stem cell biology: new challenge for a classic hormone? *Biochim Biophys Acta* 1830 (7), 3917–3927.
- Skah, S., Uchuya-Castillo, J., Sirakov, M., Plateroti, M., 2017. The thyroid hormone nuclear receptors and the Wnt/ β -catenin pathway: an intriguing liaison. *Dev. Biol.* 422 (2), 71–82.
- Snippert, H.J., Schepers, A.G., van Es, J.H., Simons, B.D., Clevers, H., 2014. Biased competition between Lgr5 intestinal stem cells driven by oncogenic mutation induces clonal expansion. *EMBO Rep.* 15, 62–69.
- Stappenbeck, T.S., Wong, M.H., Saam, J.R., Mysorekar, I.U., Gordon, J.I., 1998. Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 702–709.
- Su, Y., Damjanovski, S., Shi, Y., Shi, Y.B., 1999. Molecular and cellular basis of tissue remodeling during amphibian metamorphosis. *Histol Histopathol.* 14, 175–183.
- Sun, G., Roediger, J., Shi, Y.-B., 2016. Thyroid Hormone Regulation of Adult Intestinal Stem Cells: Implications on Intestinal Development and Homeostasis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders.*
- Swaroop, A., Kim, D., Forrest, D., 2010. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nature reviews. Neuroscience* 11, 563–576.
- Takeda, N., Jain, R., LeBoeuf, M.R., Wang, Q., Lu, M.M., Epstein, J.A., 2011. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science* 334, 1420–1424.
- Tata, J.R., 2006. Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* 246, 10–20.
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K.G., Rangell, L., Klein, O.D., de Sauvage, F.J., 2011. A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* 478, 255–259.
- Tiede, S., Bohm, K., Meier, N., Funk, W., Paus, R., 2010. Endocrine controls of primary adult human stem cell biology: thyroid hormones stimulate keratin 15 expression, apoptosis, and differentiation in human hair follicle epithelial stem cells in situ and in vitro. *Eur. J. cell Biol.* 89, 769–777.
- Tinnikov, A., Nordström, K., Thorén, P., Kindblom, J.M., Malin, S., Rozell, B., Adams, M., Rajanayagam, O., Pettersson, S., Ohlsson, C., et al., 2002. Retardation of post-natal development caused by a negatively acting thyroid hormone receptor —1. *EMBO J.* 21, 5079–5087.
- van der Flier, L.G., Clevers, H., 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241–260.
- van Mullem, A., van Heerebeek, R., Chrysis, D., Visser, E., Medici, M., Andrikoula, M., Tsatsoulis, A., Peeters, R., Visser, T.J., 2012. Clinical phenotype and mutant TRalpha1. *N. Engl. J. Med.* 366, 1451–1453.
- Vermeulen, L., Todaro, M., de Sousa Mello, F., Sprick, M.R., Kemper, K., Perez Alea, M., Richel, D.J., Stassi, G., Medema, J.P., 2008. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13427–13432.
- Visser, W.E., Friesema, E.C., Visser, T.J., 2011. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol. Endocrinol.* 25, 1–14.
- Wang, C.S., Lin, K.H., Hsu, Y.C., 2002. Alterations of thyroid hormone receptor alpha gene: frequency and association with Nm23 protein expression and metastasis in gastric cancer. *Cancer Lett.* 175, 121–127.
- Wen, L., Hasebe, T., Miller, T.C., Ishizuya-Oka, A., Shi, Y.B., 2015. A requirement for hedgehog signaling in thyroid hormone-induced postembryonic intestinal remodeling. *Cell & Biosci.* 5, 13.
- Wikstrom, L., Johansson, C., Salto, C., Barlow, C., Campos Barros, A., Baas, F., Forrest, D., Thoren, P., Vennstrom, B., 1998. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *EMBO J.* 17, 455–461.
- Williams, A.R., Hare, J.M., 2011. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circulation Res.* 109, 923–940.
- Williams, G.R., 2000. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8329–8342.
- Wondisford, F.E., 2004. Lessons learned from TR- β mutant mice. In: Beck-Peccoz, P. (Ed.), *Syndromes of Hormone Resistance on the Hypothalamic-pituitary-Thyroid Axis.* Springer US, Boston, MA, pp. 109–118.
- Yao, J., Mu, Y., Gage, F.H., 2012. Neural stem cells: mechanisms and modeling. *Protein & cell* 3, 251–261.

DISCUSSION

I. Contexte de la discussion

Dans la première partie de l'introduction j'ai décrit l'organisation des processus biologiques qui contribuent au maintien de l'homéostasie de l'EI. J'ai donc décrit comment est régulé le renouvellement cellulaire de ce tissu, phénomène très rapide orchestré par les cellules souches et progéniteurs. On a vu que les cellules souches à la base des cryptes répondent à de nombreux signaux micro-environnementaux notamment au travers de ligands sécrétés et membranaires fournis par les cellules de Paneth, les cellules progénitrices et les cellules du mésenchyme (myofibroblastes subépithéliaux). On a également vu que la population indifférenciée de la niche est hétéroclite avec des cellules souches activement cycliques, des cellules souches plus faiblement cycliques dites de « réserve » et des progéniteurs hautement prolifératifs, plus ou moins précoces, dont certains possèdent des capacités régénératrices. J'ai par ailleurs décrit qu'elles étaient les grandes voies moléculaires qui sont à la base du maintien de l'équilibre entre prolifération et différenciation et comment elles agissent au niveau de l'EI.

Par la suite, dans la deuxième partie introductive, j'ai décrit la biologie des hormones thyroïdiennes. J'ai expliqué comment sont structurées les HTs, comment elles sont produites et comment elles agissent au niveau des tissus cibles. On a donc pu voir que tout ce processus est finement régulé. En effet, nous avons constaté que des perturbations dans ce système conduisent à des dérèglements biologiques majeurs dont certains impactent largement l'intestin. Au travers de la description de différents modèles animaux, pendant le développement et après la naissance, j'ai expliqué que la voie HTs/TRs module le compartiment prolifératif chez les amphibiens et la souris. Même s'il a été démontré que les HTs modulent la biologie des cellules souches chez l'amphibien, ceci reste à éclaircir chez l'Homme et la souris. Les nombreuses études qui ont été menées ces dernières années, chez ces deux espèces, suggèrent fortement que la voie HTs/TRs est primordiale pour le maintien de l'équilibre des cellules souches intestinales. Mon travail de thèse s'inscrit dans les recherches menées dans ce domaine pour mieux comprendre comment cette voie HTs/TRs intervient dans le compartiment indifférencié chez la souris. Afin de me focaliser sur l'impact des HTs dans la biologie des cellules souches de l'EI, j'ai utilisé une approche de culture cellulaire de pointe qui consiste à purifier l'EI frais de souris transgéniques (modèle *Lgr5*-EGFP permettant de

traquer les cellules souches) et de le cultiver en 3D sous forme d'organoïdes. Ainsi, ce système de culture primaire permet d'étudier un compartiment intestinal enrichi en cellules indifférenciées, puisqu'enrichi en structures de type « crypt-like ». Comme je l'ai décrit en introduction, les organoïdes reconstituent un véritable « mini-organe » de type mini-épithélium dont l'architecture est « semblable » à ce qu'on retrouve *in vivo*. Pour décortiquer les mécanismes d'action de la voie HTs/TRs dans le modèle organoïde, j'ai à la fois modulé l'apport en HTs en cultivant les structures cellulaires 3D en leur présence ou en leur absence. J'ai également modulé la présence et l'activité des TRs en présence ou en absence d'HTs.

II. Impact des HTs sur l'autorenouvellement

A. Organoïdes, T3 et altération de croissance

L'analyse du développement d'organoïdes murins en présence d'une concentration supra-physiologique de T3 a permis de montrer que, dans ce modèle, la voie des HTs intervient dans la régulation du renouvellement des cellules intestinales. En effet, l'analyse phénotypique des structures 3D (issues de cryptes fraîches et d'organoïdes repiqués), pendant plusieurs jours de traitement, a révélé un changement précoce dans leur organisation architecturale, caractérisé par une polarisation plus prononcée de zones prolifératives que dans les organoïdes sauvages (zones plus restreintes), un arrondissement aberrant des structures et un remplissage accéléré de la lumière intestinale par des cellules. Nous avons validé par Western-blot que l'excès de T3 induit une baisse progressive de la prolifération (Phospho-Histone H3) et que cette baisse est inversement corrélée avec le niveau de Caspase3-clivée, reflet de l'induction de la mort cellulaire par apoptose (Chandra & Tang, 2009). Les immunomarquages effectués (Ki67, PCNA, BrdU et Caspase3-clivée) sur les organoïdes ont confirmé cette baisse de prolifération et ont montré une induction de la mort cellulaire, majoritairement au niveau du corps central des organoïdes et dans la lumière, suggérant que le remplissage de cette dernière est dû notamment à la présence de cellules en apoptose.

Du fait de la rapidité avec laquelle l'EI se renouvèle *in vivo* (4-5 jours = renouvellement complet) (van der Flier & Clevers, 2009), l'induction progressive de la mort des cellules épithéliales intestinales par la T3, pourrait s'expliquer par leur différenciation prématurée. L'analyse du transcriptome d'organoïdes récoltés après 17h de traitement à la T3 montre déjà quelques modulations en ce sens. En effet, parmi la liste des gènes retrouvés comme les plus différenciellement induits, certains sont des marqueurs de cellules sécrétoires et d'autres d'entérocytes. Dans cette liste de gènes on trouve par exemple des composants sécrétés par les cellules caliciformes (*Muc2*, *Clca1*) (Pelaseyed et al, 2014) mais également des protéines membranaires retrouvées dans la bordure en brosse des entérocytes (*Muc13*, *Muc3*, *Muc4* (Pelaseyed et al, 2014), *Alpi* (Tetteh et al, 2016)) et dans leur membrane basolatérale (*Slc51a*) (Boyer, 2018).

Même si l'augmentation de l'expression de ces marqueurs ne permet pas d'affirmer une augmentation du nombre de cellules engagées dans la différenciation, la modulation de l'expression de certains gènes, observée par RTqPCR et/ou RNA-seq, renforce cette hypothèse. En effet, lorsqu'on analyse les tableaux de gènes dérégulés (**figures 20 et 21**), on se rend compte que toute la dynamique de renouvellement cellulaire est perturbée. Les mécanismes moléculaires qui orchestrent l'engagement des progéniteurs dans les différents lignages (phénomène d'inhibition latérale de contact décrit en introduction) sont précocement altérés. Lors des traitements à la T3, la plupart des marqueurs qui sont différenciellement augmentés interviennent dans l'engagement des cellules des lignages entérocytaires et caliciformes tandis que certains gènes qui sont réprimés interviennent dans l'induction des lignages Paneth, entéroendocrine et Tuft.

Lorsqu'on analyse plus en détails la liste des gènes modulés par la T3 (**figure 20 et figure 21**) :

1) Après 2 et 4 jours de traitement T3, l'étude quantitative de gènes exprimés dans les différents lignages cellulaires épithéliaux a révélé l'enrichissement de marqueurs de progéniteurs sécrétoires précoces (*Math1*, *Gfi1*) et de progéniteurs engagés dans le lignage des cellules caliciformes (*Elf3*, *Klf4*) (Shroyer et al, 2005). De plus, l'étude des marqueurs terminaux de différenciation par RTqPCR, RNA-seq et immunohistochimie a également permis de montrer un enrichissement en cellules caliciformes PAS+/Muc2+. En condition physiologique, *Notch1* permet d'activer *Hes1* qui, dès lors, réprime *Math1* et permet la différenciation entérocytaire. En présence de T3, l'induction de *Math1* et de ses cibles corrèle avec à la baisse de *Hes1* et de *Notch1* (**figure 21**). Enfin, au niveau messager, dans plusieurs expériences, nous avons également détecté un enrichissement en Dlls (1/4) (données non montrées), connus pour être activés en aval de *Math1* et exprimés à la membrane des cellules sécrétoires telles que les cellules de Paneth et les cellules caliciformes (Demitrack & Samuelson, 2016; Pellegrinet et al, 2011).

2) Des gènes tels qu'*Elf3*, *Tgfbr2*, *Tgfbi*, *Bmpr1a* et *Rb1* sont retrouvés différenciellement augmentés à 17h post traitement T3. Dans l'intestin grêle, *Elf3* agit comme un régulateur majeur de la différenciation terminale en entérocytes et en cellules caliciformes (Ng et al, 2002). Dans 30% des cas, les souris *Elf3* déficientes meurent pendant leur vie embryonnaire et, si elles survivent, beaucoup meurent ensuite durant leur vie post-

natale ce qui souligne l'importance de ce gène (Ng et al, 2002). L'étude de l'EI d'embryons et de nouveaux nés *Elf3* déficients ne révèle aucun phénotype délétère en termes de prolifération mais la maturation en entérocytes et en cellules caliciformes s'avère altérée. Dans cette même étude, il a été démontré qu'*Elf3* régule positivement l'expression de *Tgfb β 2*, connu pour être impliqué dans l'induction de la différenciation entérocytaire (Flentjar et al, 2007). D'ailleurs, il s'avère nécessaire car la restauration de l'expression de *Tgfb β 2* dans les souris *Elf3* déficientes permet de sauver la fonction et l'intégrité de l'EI. Dans notre analyse, les transcrits *Elf3* et *Tgfb β 2* sont tous deux augmentés à des temps précoces. De plus, nous avons détecté une rapide augmentation de l'expression de *Tgfb β 1*, un gène qui code pour une protéine sécrétée de la famille des ligands TGF- β capable d'interagir avec les protéines de la matrice extracellulaire. Dans notre analyse, *Tgfb β 1* fait partie des gènes les plus induits (Log2 Fold change de 5,14). De plus, nous avons également relevé une petite augmentation de *Bmpk2*, gène codant pour une kinase dont l'expression est induite par BMP2 (Kearns et al, 2001; Liu et al, 2009). Toutes ces données suggèrent l'implication de la voie TGF- β /BMP dans l'induction de la différenciation par la T3. L'utilisation d'une bibliothèque de molécules permettant d'inhiber soit l'induction de la voie BMP, au travers de l'inhibition des récepteurs, soit la cascade d'activation en aval en entravant des acteurs clefs comme Smad3/4, pourrait permettre de valider cette hypothèse. Quant à *Rb1*, ce gène est connu pour réguler l'expression de protéines régulatrices du cycle cellulaire, le maintien des cellules villositaires en quiescence et la différenciation terminale des cellules entérocytaires (Guo et al, 2009). En effet, l'absence de *Rb1* induit une prolifération massive au niveau des villosités et empêche la différenciation complète des entérocytes. L'induction de tels gènes par la T3 à des temps précoces renforce notre modèle de différenciation induite.

Gènes (UP)	Informations littérature	shrunkenLog2FC	Références (PMID)
<i>Rb1 (pRb)</i>	Requis pour la différenciation terminale entérocytaire dans l'intestin grêle.	0,71	18981186
<i>Elf3</i>	Impliqué dans la différenciation terminale des cellules entérocytaires et des cellules calciformes.	0,97	19801644 11984530
<i>Tgfbr2</i>	Cible clé en aval d'Elf3 pour la différenciation entérocytaire.	0,27	17408644
<i>Bmpr1a</i>	Impliqué dans la différenciation des cellules sécrétoires	0,37	17678919
<i>Cdx2</i>	Impliqué dans la maturation des cellules épithéliales incluant la maturation des cellules calciformes et Paneth. Requis pour l'identité de l'intestin grêle dans le développement L'expression conditionnelle dans les cellules IEC-6 induit l'apparition d'entérocytes et cellules calciformes.	0,47	21081128 19386267 8552090
<i>Cdh1</i>	Requis pour la localisation/maturation des cellules de Paneth et des cellules calciformes.	0,39	21179475
<i>Tgfbi</i>	Protéine sécrétée induite. En lien avec la voie TGF- β . Gène décrit comme suppresseur de tumeur.	5,14	19117985
<i>PparD</i>	Impliqué dans la régulation des cellules de Paneth.	3,41	16890607

Figure 20 : Liste de gènes observés comme différenciellement augmentés (« UP ») dans les organoïdes récoltés après 17h de traitement à la T3.

Gènes (Down)	Informations littérature	shrunkenLog2FC	Références (PMID)
<i>Notch1</i>	Intervient dans la balance entre cellules absorbantes et cellules sécrétoires	-0,76	15959516 18274550
<i>Hes1</i>	Intervient dans la balance entre cellules absorbantes et cellules sécrétoires ; réprime <i>Math1</i>	-0,31	21238454
<i>Ihh</i>	Intervient dans la différenciation des cellules du colon. Intervient dans la maturation des cellules de Paneth	-0,24	14770182 16890607
<i>Neurog3</i>	Intervient dans l'engagement dans le lignage entéroendocrine	-0,34	17706959 12456641
<i>Ephb3</i>	Localisation des cellules de Paneth à la base des cryptes.	-0,77	12408869
<i>Fgfr3</i>	Réduction significative du nombre de cellules de Paneth dans les souris KO. Impliqué dans le développement et dans l'expansion du compartiment à cellules souches.	-0,65	19407216

Figure 21 : Liste de gènes observés comme différenciellement diminués (« DOWN ») dans les organoïdes récoltés après 17h de traitement à la T3.

3) Parmi la liste des gènes réprimés on retrouve *Neurog3*, connu pour être des inducteurs de la différenciation des cellules entéroendocrines. En revanche, au niveau protéique, le nombre de cellules entéroendocrines (ChgA+) ne semble pas significativement affecté (donnée non montrée).

4) L'implication de la voie Hedgehog peut également être soupçonnée du fait de l'altération d'expression des gènes *Ppard* et *Ihh*. En condition physiologique *Ppard*, gène qui code pour une isoforme de récepteurs nucléaires (*Ppar δ* aussi appelé *Ppar β*) (Peters et al, 2012), est particulièrement exprimé en bas des cryptes où résident les cellules de Paneth. Il est d'ailleurs régulé directement par la voie Wnt/ β -caténine/Tcf4 (He et al, 1999). Le ligand *Ihh*, lui, est sécrété par les cellules de Paneth matures et agit au niveau de leurs précurseurs pour réguler leur différenciation (Varnat et al, 2006). Ce ligand intervient également pour restreindre le compartiment prolifératif dans le colon (van den Brink et al, 2004). D'après la littérature, *Ihh* peut être réprimé en amont par *Ppard*. En effet, une étude a démontré que la perte de *Ppar β / δ* dans des souris KO est suffisante pour induire l'expression d'*Ihh* et bloquer la différenciation terminale des progéniteurs Paneth (Varnat et al, 2006). Dans notre analyse, *Ppard* est très fortement augmenté et *Ihh* est significativement diminué. Même si l'analyse de marqueurs protéiques n'a pas permis de révéler une augmentation du nombre de cellules de Paneth à long terme, la relation entre ces gènes et leur fonction suggère une fois de plus que les mécanismes moléculaires qui régissent l'engagement des cellules dans les différents lignages sont affectés précocement. L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes de *Ppar β / δ* pourrait nous permettre de tester si cette isoforme intervient véritablement dans l'induction de la différenciation par la T3. Enfin, la réévaluation du nombre de cellules de Paneth pourrait être envisagée. L'étude pourrait s'effectuer par cytométrie en flux en marquant les cellules de Paneth avec un anticorps qui reconnaît la protéine membranaire CD24, marqueur spécifique de ces cellules (Sato et al, 2011b).

Tous les différents points que j'ai évoqués nous ont donc suggéré que, même si le phénotype morphologique induit par la T3 ne survient que tardivement, celui-ci est la conséquence de l'engagement très précoce de cellules dans différents lignages (absorbant et sécrétoire). Il se traduit par un enrichissement en progéniteurs précoces, en progéniteurs plus tardifs et en quelques cellules différenciées, préférentiellement engagés dans le lignage des cellules caliciformes. D'ailleurs, nous l'avons confirmé par

l'utilisation d'une molécule capable de bloquer l'induction des cellules dans le lignage sécrétoire, l'acide valproïque (VPA). Dès lors qu'on cultive les structures 3D traitées à la T3 en présence de VPA, l'induction des marqueurs de progéniteurs et des marqueurs de cellules pleinement différenciées est abolie. La structuration des organoïdes est améliorée mais pas pleinement restaurée. La présence de VPA permet d'une part 1) de diminuer l'effet polarisant de la T3 grâce à la restauration modérée du taux de prolifération et 2) de faire persister des bourgeons sur du long terme. Le développement des organoïdes en présence de T3+VPA ressemble à celui des organoïdes en condition VPA. Cela suggère que le VPA est épistatique sur certains effets induits par la T3. Le VPA est connu pour permettre l'inhibition d'histones déacétylases (HDACs) (Gottlicher et al, 2001) mais est également décrit comme un activateur putatif des voies Wnt (Chen et al, 1999) et de la voie Notch (Greenblatt et al, 2008; Stockhausen et al, 2005). Ces données renforcent l'idée que l'induction du lignage sécrétoire par la T3 puisse être médiée en partie par la régulation de grandes voies moléculaires connues pour influencer la dynamique de renouvellement (Wnt, Notch), probablement au travers de modifications épigénétiques.

B. Organoïdes, T3 et pertes des cellules souches

La présence de GFP dans les cellules Lgr5+ nous a permis de suivre directement le compartiment prolifératif de l'EI par différentes approches. Dans un premier temps, nous avons évalué le niveau de GFP dans les structures 3D traitées et avons constaté qu'il était inférieur à celui des organoïdes contrôles quelque soit le temps d'analyse (fluorescence et Western-blot). Dans un second temps, des tests ont permis de confirmer que la baisse de GFP induite par la T3 est corrélée à un appauvrissement en gènes spécifiques de la signature « souche » (*Lgr5*, *Olfm4*, *Ascl2* et *mTert*) (Munoz et al, 2012) ainsi qu'un appauvrissement du nombre de cellules Lgr5+.

De manière intéressante, la comparaison des résultats issus notre analyse transcriptomique avec plusieurs signatures a révélé que :

1) parmi les gènes les plus induits, une portion significative d'entre eux est partagée avec la signature « progéniteur » indiquant un enrichissement en marqueurs de progéniteurs.

2) parmi les gènes les plus réprimés, une portion significative d'entre eux est partagée avec la signature « souche ».

Cependant, nous n'avons pas pu déterminer si l'appauvrissement en cellules Lgr5+ est dû à la perte des cellules souches, à la perte des progéniteurs ou à la perte des deux populations cellulaires. D'ailleurs, il est important de préciser que dans les expériences de cytométrie en flux effectuées à partir d'organoïdes, par notre équipe et par d'autres laboratoires, les analyses ne révèlent qu'une population unique de cellules GFP+ (Yin et al, 2014) contrairement à ce qui est observée dans les cellules triées à partir de cryptes fraîches (2 populations GFPhigh et GFPlow) (Sato et al, 2009). Nous restons donc prudents dans l'interprétation exacte des résultats, ces divergences entre les modèles *ex vivo* et *in vivo* pouvant amener à des interprétations erronées.

À ce jour, nous croyons que l'excès de T3 vient perturber l'équilibre de niche établi dans les organoïdes. L'effet pléiotropique de la T3, qui est ajoutée dans le milieu en excès, suggère qu'aucune des deux populations (souches et progéniteurs) ne puisse être épargnée par l'hormone. Dans notre modèle, d'un côté les cellules souches perdent la capacité d'autorenouvellement pendant que les progéniteurs se différencient progressivement en entérocytes et cellules caliciformes principalement.

Plusieurs arguments confortent cette hypothèse :

1) Même si le développement des organoïdes traités est altéré, ils restent capables de croître et de générer des bourgeons pendant au moins 48h et de façon semblable aux organoïdes contrôles. C'est seulement après deux jours de traitement que les structures stoppent de croître et que les bourgeons qui ont été générés se polarisent et rétrécissent (vidéo « time-lapse », donnée non montrée). Ceci suggère que l'activité souche s'amenuise et/ou s'éteint après deux jours. Les progéniteurs générés se différencient et ne sont dès lors plus renouvelés. En conséquence les structures ne grossissent plus, s'arrondissent et s'enrichissent en cellules qui sont mortes par apoptose.

2) Même si la signature souche est altérée précocement, nous n'avons jamais remarqué l'absence spécifique de marqueurs de prolifération à l'apex des bourgeons dans les organoïdes traités, quel que soit le temps d'analyse, ce qui renforce mon premier

argument. En effet, il semble que les cellules souches gardent leur capacité proliférative mais celles-ci semblent s'épuiser progressivement.

3) Le VPA est une molécule connue pour influencer la croissance d'organoïdes (Yin et al, 2014). L'addition de VPA dans un milieu classique de culture d'organoïdes intestinaux est suffisante pour induire un enrichissement en cellules souches Lgr5+ et le blocage du lignage sécrétoire (Yin et al, 2014). De plus, lorsqu'on trie ces cellules et qu'on les cultive en présence de VPA, on stimule leur capacité d'autorenouvellement ce qui démontre l'action du VPA sur ces cellules. Dès lors, lorsqu'on traite les organoïdes +T3 avec du VPA, on bloque l'induction du lignage sécrétoire. Cependant, dans ce contexte, le VPA ne restaure ni la signature souche ni la réapparition complète de bourgeons ce qui démontre l'impact négatif de la T3 sur le compartiment des cellules souches, en plus de son effet sur les progéniteurs.

4) Lorsqu'on analyse les résultats issus de cytométrie en flux en déterminant une valeur seuil arbitraire qui permet de définir deux populations de cellules GFP+ (GFP^{High} et GFP^{Low}), on observe que les deux types de cellules GFP+ sont affectés par la T3. En effet, la proportion de cellules GFP+ est plus faible dans les deux populations. Cependant, l'introduction d'un biais d'analyse par la détermination de valeurs arbitraires n'est pas convenable lors de l'analyse fine de populations cellulaires dans un tissu complexe comme l'EI. Une étude en « single cell » me paraît plus appropriée. Elle permettrait d'outrepasser cette problématique car, après tri, les données issues des analyses moléculaires sont comparées aux bases de données déjà établies. Ainsi, on pourrait classer chaque cellule dans sa propre catégorie (cellule souche active, cellule souche réserve, progéniteur) avec de la précision et une certaine robustesse statistique. Les seules contraintes sont : 1) le prix de l'expérience pour qu'elle soit statistiquement robuste avec un nombre conséquent d'échantillons et 2) de pouvoir obtenir un nombre élevé de cellules souches à des temps précoces (17h ou avant) alors que le cycle de division de ces cellules est évalué à ±21-24h (Carulli et al, 2014). Néanmoins, l'utilisation de cette technique permettrait de décortiquer l'altération des mécanismes moléculaires induite par la T3 dans chaque cytotype.

C. Organoïdes, un effet paradoxe de la T3

Nous avons voulu tester la capacité d'autorenouvellement des cellules prolifératives d'organoïdes intestinaux traités à la T3. Pour ce faire, nous avons cultivé des organoïdes en présence ou en absence de T3. Après deux jours de traitement, les organoïdes ont été récupérés, dissociés et les cellules qui en résultent ont été directement replacées soit en condition normale, soit en condition +T3.

Il en résulte que :

- 1) Les cellules qui ne sont, de prime abord, pas cultivées en présence de T3 ont une capacité de génération de colonies (organoïdes) fortement altérée dès lors qu'on les traite à la T3.
- 2) Les cellules qui sont en permanence sous l'effet de la T3 présentent également un phénotype d'altération de croissance.
- 3) Les cellules qui ont été prétraitées à la T3 pendant deux jours et qui sont replacées en conditions normale après dissociation possèdent une capacité d'autorenouvellement accrue, bien supérieure aux contrôles. Seules quelques cellules survivent après deux jours de traitement, conformément à ce qui a été observé par cytométrie, et sont capables de faire émerger des organoïdes. Cependant, les organoïdes qui en résultent sont bien plus gros et plus bourgeonnants que les contrôles.
- 4) Lever la pression exercée par la T3 sur des organoïdes après deux jours de traitement, sans les dissocier (changement de milieu), n'est pas suffisant pour sauver le phénotype (donnée non montrée).

Dans un système épithélial autonome, organisé en 3D, la T3 connue pour accélérer le métabolisme général (Mullur et al, 2014) semble stimuler les capacités prolifératives des cellules Lgr5+ mais le contexte environnemental lié à l'organisation architecturale des organoïdes participe au blocage de cet effet. Nous pensons que certaines cellules, sous l'effet de la T3, sont capables d'influencer négativement la niche à cellules souches, à la manière de l'inhibition latérale de contact (Shroyer et al, 2005; VanDussen et al, 2012) et/ou par des effets paracrines. Cependant quelques zones d'ombre restent à éclaircir. En effet, le caractère mosaïque du modèle *Lgr5*-EGFP (Schuijers et al, 2014) est

limitant. Nous n'avons donc pas pu conclure quant à la véritable origine des organoïdes dans le point II-C-2, générés après dissociation cellulaire. S'agit-il d'organoïdes issus de cellules souches ou de cellules progénitrices capables de se dédifférencier ? Nous n'avons pas la réponse. Pour pouvoir conclure quant aux capacités de génération d'organoïdes par les cellules souches, il est nécessaire d'isoler des cellules GFP^{high}, GFP^{low}, GFP^{neg} et d'analyser leur comportement en réponse à la T3. Afin d'évaluer l'implication des cellules souches de réserve l'utilisation d'un modèle murin transgénique tel que le modèle *Msi1-eGFP* est nécessaire (Maria Cambuli et al, 2013). À ce stade de l'étude, nous n'excluons pas la possibilité que la dissociation mécanique effectuée sur les organoïdes, associée à la perte des CBCs, soit un élément déclencheur d'une régénération cellulaire par les cellules souches de réserve et que la T3 puisse stimuler ces cellules. Cependant, la capacité des cellules progénitrices à pouvoir se régénérer a été démontrée uniquement en induisant des dommages à l'ADN par irradiation (Beumer & Clevers, 2016; Kim et al, 2017; Metcalfe et al, 2014).

III. Étude de la voie des HTs/TRs

Afin de mieux comprendre quels sont les mécanismes moléculaires qui sont à l'origine du phénotype induit par la T3, nous nous sommes intéressés à la voie des TRs en elle-même. Une des étapes clefs pour caractériser l'effet des HTs a été l'analyse des transporteurs, des enzymes métaboliques et des TRs. Les analyses opérées par RTqPCR n'ont révélé aucuns changements significatifs concernant l'expression des produits de *Thra* et *Thrb* en présence de T3 à long terme. L'expression des TRs n'est donc pas régulée par la T3. Concernant les enzymes et les transporteurs, dans toutes nos expériences nous avons remarqué une réponse forte à la présence de T3 et de T4 *via* l'augmentation des gènes qui codent pour les transporteurs Mct8/Mct10 et de l'enzyme Dio1, cible directe des HTs/TRs (Grontved et al, 2015). Les organoïdes répondent à l'hormone. Tandis que Dio1 favorise l'inactivation de la T3 en T2 et rT3, les transporteurs actifs modulent à la fois l'influx et l'efflux de T3 à travers la membrane.

L'analyse de la localisation du récepteur TR α 1 est en accord avec les données de la littérature puisque la protéine est bien localisée au fond des cryptes, dans les cellules qui prolifèrent (Sirakov et al, 2014). Malgré la présence d'une proportion non négligeable de cellules différenciées dans les organoïdes (Date & Sato, 2015), aucun signal TR β 1 n'a cependant été détecté ce qui nous fait émettre des doutes quant à la fiabilité de l'anticorps en immunofluorescence. L'analyse des TRs par Western-blot a révélé que la T3 était capable de réguler le niveau de TR α 1, dans les organoïdes, conformément à ce qui a déjà été observé dans des cellules HeLa (Dace et al, 2000) ou pour d'autres récepteurs nucléaires (Nawaz et al, 1999). En présence de T3, TR α 1 est activé, exerce son action de facteur de transcription puis est rapidement dégradé. Le blocage de la voie de dégradation des protéines par le protéasome *via* l'utilisation de lactacystine (Dace et al, 2000) ou de MG132 (Han et al, 2009), combiné à l'analyse semi-quantitative des TRs par Western-blot, permettrait de le confirmer dans ce modèle.

L'utilisation de modèles murins transgéniques a permis de valider que l'effet délétère de la T3 implique à la fois TR α et TR β :

- 1) L'isoforme fonctionnelle majeure de *Thra* est TR α 1 (Frau et al, 2017). En présence de T3, dans les organoïdes contrôles, l'activation de TR α 1 conduit à

l'activation/répression de ses cibles puis à sa dégradation précoce. Dès lors, la dégradation induite de TR α 1 par la T3 participe à l'effet antiprolifératif observé. TR α 1 est connu pour réguler positivement la voie Wnt ainsi que pour stimuler la voie Notch (Plateroti et al, 2006; Sirakov et al, 2015). Dès 17h de traitement T3, il semblerait que ces voies soient déjà réprimées, ce qui est en accord avec l'inhibition de l'expression des gènes de la signature souche. En effet, des cibles/composants de la voie Wnt sont différenciellement réprimés (*Axin*, *Myc*, *Tcf4*) tandis que *Ctnnbip1*, répresseur de la voie Wnt (Kress et al, 2009a; Qi et al, 2015; Sirakov et al, 2015) est augmenté. Des composants de la voie Notch sont inhibés, comme le reflète *Hes1*, cible directe et régulée positivement par NICD. Ceci suggère que, du fait de l'activation de ces voies par TR α 1 avant 17h, un mécanisme de réponse s'est mis en place pour réguler Wnt et Notch. Du fait de l'engagement des progéniteurs dans le lignage sécrétoire, de la relation entre les voies Wnt et Notch (Tian et al, 2015) et de l'augmentation de l'expression de gènes tels que *Ccnd1* (cycline D1, cible positivement régulée par Wnt, voir article) (Shtutman et al, 1999), la balance entre la voie Wnt et Notch pèse en faveur de Wnt. D'ailleurs, nos expériences de traitements d'organoïdes avec des agonistes de Wnt (ChiR, Wnt3, VPA) et Notch (VPA) (Yin et al, 2014) renforcent cet argument car seul le VPA permet d'améliorer partiellement le phénotype T3.

- 2) L'ablation de *Thra* (TR $\alpha^{0/0}$) induit l'apparition de marqueurs de cellules sécrétoires *in vivo* (Sirakov et al, 2015). De plus, le développement physiologique des organoïdes TR $\alpha^{0/0}$ est retardé, conformément au raccourcissement des cryptes et à la diminution des cellules prolifératives observés *in vivo* (Plateroti et al, 2006). En présence de la T3, l'ablation de *Thra* dans les organoïdes permet à long terme d'atténuer le phénotype de déstructuration des organoïdes, de réduire l'impact de la T3 sur la signature souche et de supprimer l'induction de marqueurs du lignage sécrétoire. L'engagement dans les lignages sécrétoires par la T3 est donc bien un mécanisme dépendant de TR α 1 au travers de la régulation des voies Wnt et Notch. La diminution modeste de l'expression des gènes de la signature souche dans les organoïdes TR $\alpha^{0/0}$ indique que la régulation de cette signature est en partie dépendante de TR α mais que d'autres mécanismes influencent la niche en présence de T3.

3) La culture d'organoïdes TR α 1-LOF (dominant négatif) inductibles (Quignodon et al, 2007) dans les cellules Lgr5+ renforce le caractère majeur de TR α 1 dans la régulation de l'homéostasie intestinale. Le dominant négatif de TR α 1 agit comme un répresseur transcriptionnel fort au niveau des TRE, par exemple situés dans les promoteurs de gènes impliqués dans les voies Wnt et Notch. L'architecture des organoïdes TR α 1-LOF induits, cultivés en présence ou en absence d'hormones, est très similaire aux sauvages traités par la T3. Ainsi, les gènes régulés par les TRs notamment TR α 1, lorsqu'ils sont fortement réprimés, contribuent à la diminution de l'autorenouvellement des cellules souches.

2) En présence d'hormone, l'ablation de *Thra* protège seulement partiellement du phénotype T3 ce qui a suggéré l'implication d'autre(s) mécanisme(s) dans l'induction du phénotype T3. *Thrb* code pour deux isoformes TR β 1 et TR β 2 et s'exprime uniquement dans les villosités (Sirakov et al, 2014). Dans les organoïdes, nous avons constaté que l'ablation de *Thrb* participe à l'amélioration du phénotype T3. Le blocage de l'effet de la T3 par la perte de *Thrb* suggère que la T3 impacte les cellules différenciées qui, en retour, influencent la niche à cellules souches. Peut-être s'agit-il d'un effet paracrine comme le suggère, par exemple, l'augmentation différentielle *Tgfb1*, décrit comme un suppresseur de tumeur (Zhang et al, 2009; Zhao et al, 2004; Zhao et al, 2002).

Thra et *Thrb* sont donc tous deux impliqués dans l'induction du phénotype T3 dans un système épithélial autonome en 3D. D'une part, *Thra* agit *via* TR α 1 au niveau des cryptes en modulant les voies Wnt et Notch, d'autre part, *Thrb*, exprimé dans les cellules des villosités, influence à distance le comportement des cellules de la niche, probablement *via* TR β 1. Le rôle de la voie non génomique des TRs impliquant l'activation intégrines $\alpha\beta$ 3 a été écarté en les inhibant *via* l'utilisation d'un agoniste de la T3 inhibiteur d'intégrines (Tetrac) (Mousa et al, 2006). Cependant, à ce jour, nous ne pouvons conclure quant à l'implication d'autres mécanismes non génomiques qui ont été également décrits et qui ne dépendent pas de ces intégrines (Hammes & Davis, 2015; Irrcher et al, 2008).

IV. Hypothèses & Perspectives

A. Organoïdes, T3 et voies métaboliques

La génération d'énergie dans la cellule s'exerce au travers de grandes voies métaboliques telles que la glycolyse, le cycle de Krebs, la dégradation des lipides et des acides aminés (Shi & Tu, 2015). Le glucose absorbé est métabolisé en pyruvate qui lui est décarboxylé en acétyl-coenzymeA (acétyl-CoA) au niveau de la mitochondrie. C'est une molécule « clef de voûte » située au cœur des grandes voies métaboliques. L'acétyl-CoA, qui dérive, par exemple, de l'oxydation du pyruvate mais également de la β -oxydation des acides gras, est définitivement consommé pour générer de l'oxaloacétate dans la matrice mitochondriale, tandis que le résidu acétyle de l'acétyl-CoA est entièrement oxydé en CO_2 et en H_2O à travers la chaîne respiratoire, permettant d'en récupérer l'énergie métabolique sous forme d'ATP par phosphorylation oxydative (OXPHOS) (**figure 22**).

De manière générale, la glycolyse est décrite comme fonctionnellement importante pour maintenir les cellules souches à l'état de pluripotence. En effet, l'arrêt de la glycolyse dans certaines cellules souches comme les cellules ES est suffisante pour induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Zhang et al, 2011; Zhou et al, 2012). Souvent, on associe cellules souches rapidement cycliques à une demande en glucose exacerbée (Burgess et al, 2014). Or, dans l'EI adulte, l'analyse du profil d'expression de protéines métaboliques montre que les enzymes clefs de la glycolyse sont moins présentes au fond des cryptes que dans les villosités, malgré la présence de sucres apportés par les capillaires du stroma sous-jacent (Yang et al, 2016).

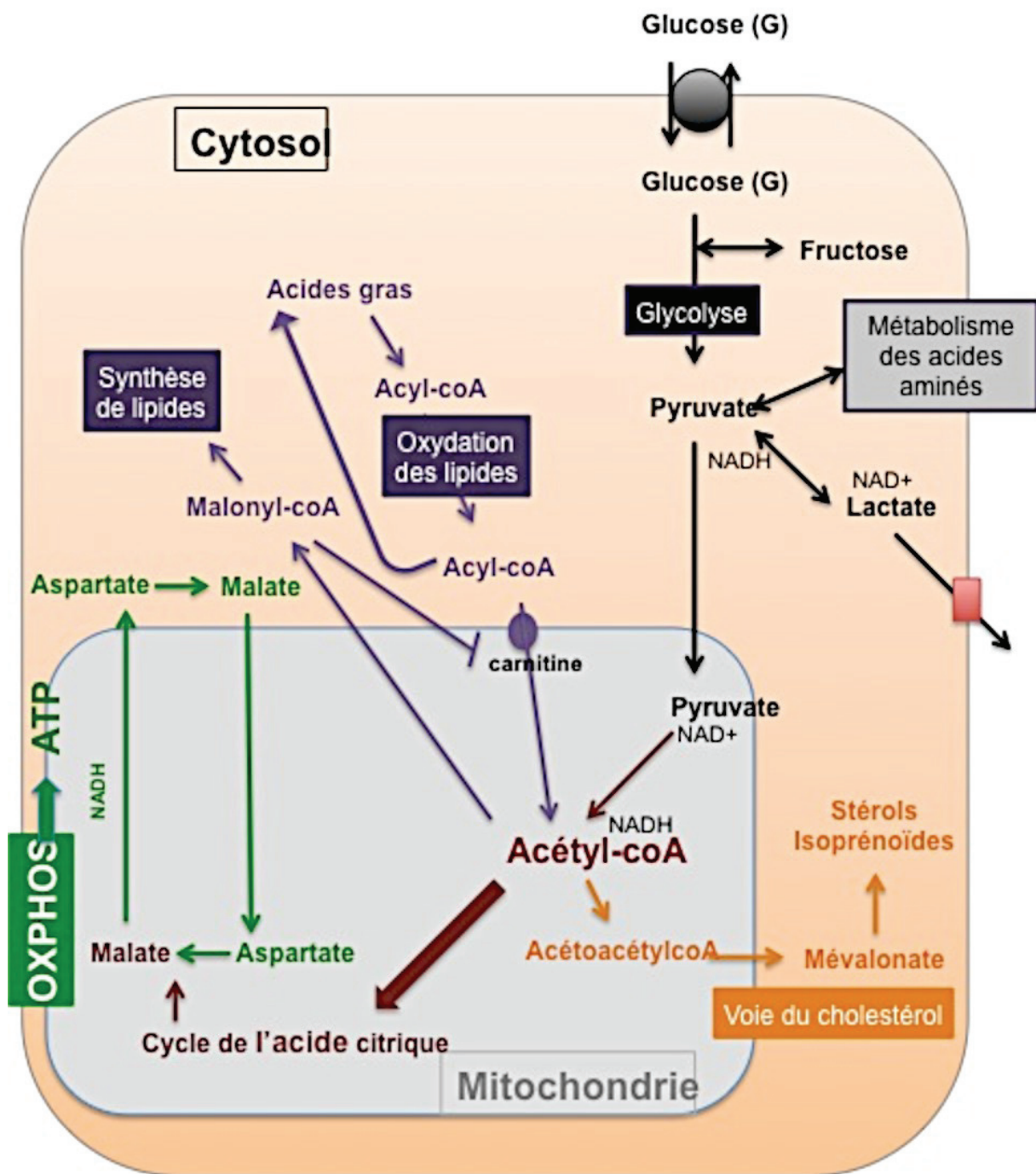


Figure 22 : Voies moléculaires rencontrées dans la discussion. Le glucose est métabolisé au travers de la glycolyse. Le pyruvate peut être métabolisé en lactate ou entrer dans la mitochondrie pour être métabolisé en acétyl-CoA et servir de substrat au cycle de Krebs qui alimente le système OXPHOS et la synthèse d'ATP. L'actéyl-coA est au carrefour d'autres voies métaboliques comme celles de la synthèse et à l'oxydation des lipides mais également de la voie du mévalonate. La liste des voies métaboliques n'est pas exhaustive. Tous les intermédiaires métaboliques et co-facteurs ne sont pas montrés.

L'analyse des mécanismes métaboliques impliqués dans la muqueuse intestinale est complexe du fait de l'hétérogénéité environnementale du tissu. En effet, d'un point de vue métabolique, les sources d'énergies proviennent à la fois des nutriments présents dans la lumière et de la circulation sanguine qui perfuse le stroma. D'ailleurs, même le microbiote influence le comportement métabolique des cellules de l'EI (Lee et al, 2018). Il est dorénavant admis que l'activité glycolytique corrèle positivement avec la maturation cellulaire de la crypte vers la villosité et il en est de même concernant le métabolisme des lipides et des protéines (Yang et al, 2016).

Au fond des cryptes sont localisées à la fois les cellules souches et les cellules de Paneth. Ces cellules réagissent différemment en présence de nutriments (Roper & Yilmaz, 2017). Par exemple, en réponse à une restriction calorique, l'activité de mTorc1 est inhibée dans les cellules de Paneth ce qui favorise l'augmentation du nombre de cellules souches (Yilmaz et al, 2012). De manière intéressante, un régime enrichi en graisses (HFD, High Fat Diet) contribue également à l'augmentation de l'activité souche et à rendre ces cellules moins dépendantes des cellules de Paneth (Beyaz et al, 2016). Les cellules du fond des cryptes se distinguent entre elles du fait de différences majeures concernant la respiration mitochondriale. En effet, les cellules souches possèdent un ratio pyruvate/lactate plus élevé que celui des cellules de Paneth indiquant que l'activité respiratoire est supérieure dans les cellules souches (Rodriguez-Colman et al, 2017). D'ailleurs, l'activation du système OXPHOS (phosphorylation oxydative, respiration mitochondriale), grâce aux dérivés métaboliques du cycle de Krebs, favorise la formation des bourgeons dans les organoïdes alors que la répression du système OXPHOS réprime leur apparition. En tant que support de la niche, les cellules de Paneth qui « respirent » moins que les cellules souches produisent et fournissent du lactate aux cellules souches qui, dès lors, le convertissent en pyruvate (pyruvate → lactate = réversible). Le pyruvate sert de carburant pour le système OXPHOS des cellules souches, *via* son entrée dans le cycle de Krebs (Rodriguez-Colman et al, 2017; Roper & Yilmaz, 2017).

De manière intéressante, les HTs/TRs sont des déterminants clefs du métabolisme cellulaire et régulent une variété de voies moléculaires impliquées par exemple dans le métabolisme des carbohydrates, des lipides et des protéines (Cicatiello et al, 2018). Intervenant dans le métabolisme énergétique de la cellule, il a par exemple déjà été

décrit que les HTs participent activement à l'augmentation du nombre de mitochondries et de protéines mitochondriales codées à la fois par des gènes nucléaires et mitochondriaux. Les HTs contribuent également à l'augmentation de la consommation d'O₂ par ces mitochondries (Saelim et al, 2004; Soboll, 1993).

En analysant notre transcriptome, nous nous sommes rendus compte que le métabolisme cellulaire était fortement perturbé après seulement 17h de traitement à la T3. Nous avons par exemple retrouvé des gènes, qui codent pour des enzymes de la glycolyse, dont l'expression est différenciellement augmentée (**figure 23**). On a également mis en évidence l'induction de gènes impliqués dans la synthèse du pyruvate et intervenant dans le cycle de Krebs (**figure 23**). Dans les organoïdes, après 17h de traitement, la T3 semble donc induire l'activation de la glycolyse et l'engagement dans le cycle de Krebs, dont les carburants limitants sont le glucose et l'oxygène. L'analyse métabolique de la consommation de glucose, de la synthèse de lactate ainsi que de la consommation en oxygène est nécessaire pour valider confirmer cette hypothèse. À ce stade, nous ne pouvons pas déterminer si cette perturbation métabolique s'effectue spécifiquement dans les cellules souches et/ou dans les cellules de Paneth ou si elle reflète l'augmentation du nombre de progéniteurs hautement prolifératifs et demandeurs en énergie

L'analyse comparative du métabolome et/ou du transcriptome entre les différents cytotypes pourrait nous aider à répondre à cette interrogation.

L'analyse de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras (FAO : Fatty acid oxidation ; acyl-CoA → acétyl-CoA) et des gènes inducteurs de la synthèse des stérols/isoprénoïdes sont pour leur part significativement diminués (**figure 23**). Effectivement, si les HTs sont décrites comme régulant négativement la synthèse du cholestérol, elles stimulent de manière générale la FAO (Louzada & Carvalho, 2018; Sayre & Lechleiter, 2012; Sifuentes & Lechleiter, 2018). Ceci suggère que la FAO ait pu être induite dès l'addition de T3 et que notre constat, concernant les enzymes de la FAO, est le résultat d'une boucle de régulation négative. D'ailleurs, parmi la liste des gènes différenciellement augmentés certains sont décrits pour être impliqués dans les premières étapes de l'oxydation des acides gras en acyl-CoA (*Acs11*, *Acs14*, *Acls15*) ce qui suggère que la FAO ait pu être activée antérieurement. De plus, le gène *Cpt1a* est

également fortement induit. Il code pour la carnitine O-palmitoyltransférase (Cpt1) qui est une enzyme membranaire mitochondriale. Grâce à Cpt1, les acyl-CoA sont d'abord métabolisés en acyl-CoA-carnitine puis sont transférés dans la mitochondrie pour former de l'acétyl-CoA. Cette enzyme est décrite comme limitante génération d'acétyl-CoA, molécule clef située au carrefour du métabolisme (Vishwanath, 2016).

En excès d'acétyl-CoA dans la matrice mitochondriale, la carnitine participe à la réduction de cet excès en exportant de l'acétyl-CoA-carnitine vers le cytoplasme (Lindeboom et al, 2014). De manière intéressante, un TRE est situé dans le promoteur de ce gène (Jackson-Hayes et al, 2003), ce qui renforce l'idée de l'implication des TRs (α et/ou β) dans l'induction d'une FAO précoce, alors que le milieu de culture des organoïdes n'est pas enrichi en acides gras. Enfin, à l'inverse, les gènes *Acaca* et *Mlycd* qui interviennent dans les premières étapes de synthèse des lipides, *via* la synthèse de malonylcoA (acétyl-CoA->malonylcoA->lipides), ne sont pas retrouvés dérégulés. À noter que le malonylcoA est un inhibiteur de Cpt1 et donc de la FAO (Smith et al, 2012).

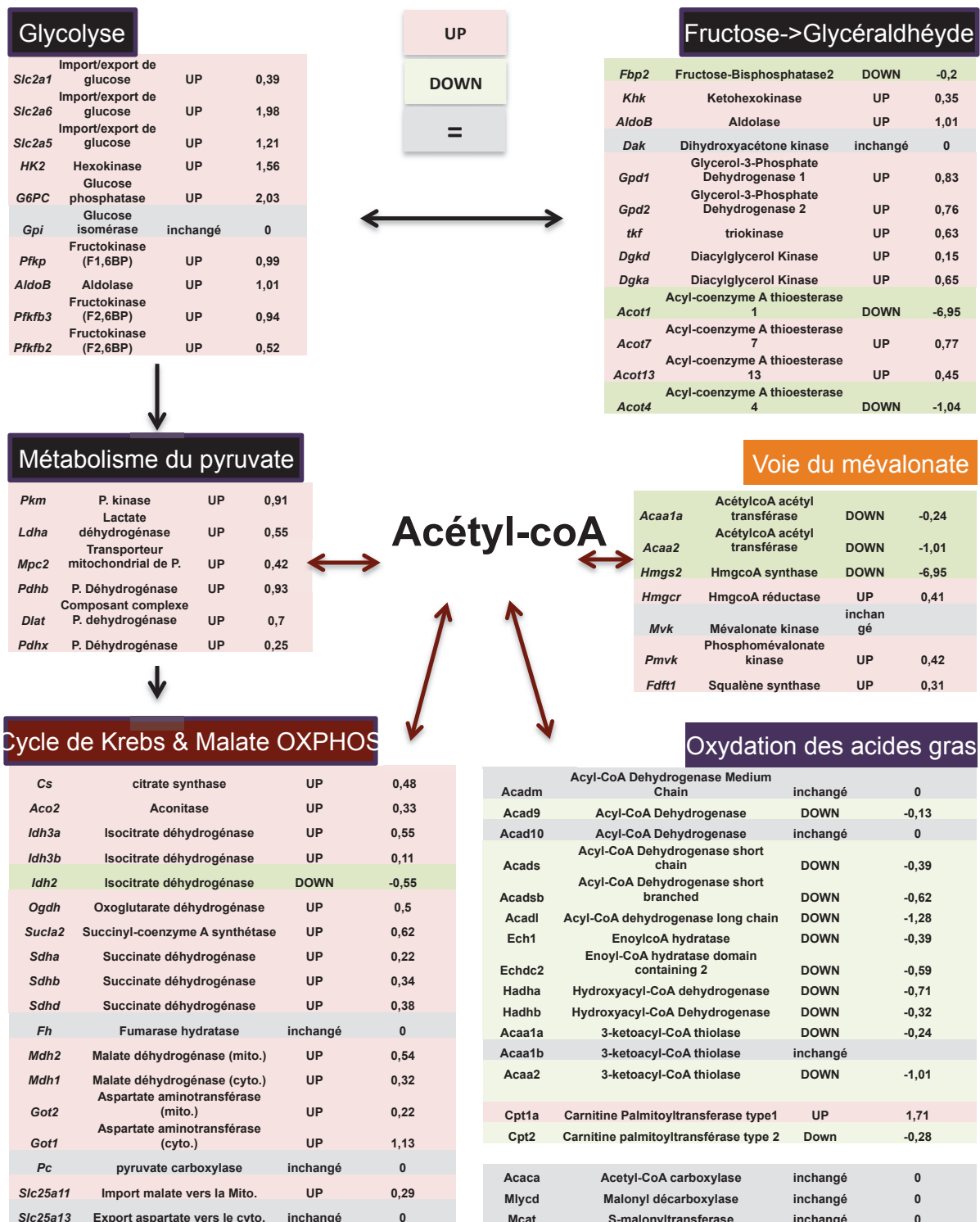


Figure 23 : Listes de gènes différenciellement exprimés en fonction de leur voie métabolique. Le lien entre les voies métaboliques est représenté par des flèches. Rouge=différenciellement augmenté, vert=différenciellement diminué, gris=expression inchangée. Les chiffres indiqués représentent les valeurs de « Fold Change » exprimés en log₂ réduits (ShrunkenLog₂FC).

B. Hypothèse de l'implication d'AMPK, Pgc-1 α et Ppar

L'activation de la FAO survient lors de besoins énergétiques. En effet, les graisses stockées sont dégradées pour produire de l'énergie. L'activation de la FAO est souvent associée à l'augmentation de l'activité de Cpt1, elle-même associée à l'augmentation de l'activité de l'enzyme AMPc activated protein kinase (AMPK), codée par le gène *Prkaa* (Harmel et al, 2014; Roepstorff et al, 2005). D'ailleurs, l'expression de *Prkaa2*, codant pour la sous-unité catalytique $\alpha 2$ d'AMPK, est retrouvée significativement augmentée après 17h de traitements à la T3. Ceci renforcerait l'idée d'une stimulation précoce de la FAO par la T3. De plus, il a déjà été décrit que la T3 induit la phosphorylation et l'activation d'AMPK au travers de l'activation des TRs (TR $\alpha 1$ et TR $\beta 1$) (Yamauchi et al, 2008), ainsi que la phosphorylation de Erk1/2 dans le muscle squelettique (Irrcher et al, 2008) et le cœur (Takano et al, 2013). D'ailleurs je retrouve Erk1/2 phosphorylées en Western-blot (données non montrées) lors de mes analyses après 2 jours et 4 jours de traitement à la T3. La stimulation d'AMPK est connue pour promouvoir l'activation de processus cataboliques (glycolyse, FAO) pour réprimer des processus anaboliques (synthèse d'acides gras, synthèse de cholestérol) (Jager et al, 2007). D'ailleurs, comme dit précédemment, les gènes *Acaa1a*, *Acaa2* et *Hmgcs2*, qui codent pour des enzymes essentielles dans l'induction du métabolisme du mévalonate (synthèse des stérols/isoprénoïdes) (**figure 22**), sont retrouvés fortement réprimés dans notre transcriptome (**figure 23**). AMPK intervient également dans la régulation de l'entrée de glucose dans la cellule en modulant positivement des transporteurs de glucose tels que Glut1 (gène *Slc2a1*). La stimulation d'AMPK survient généralement alors que la production d'ATP est inhibée (poisons, hypoxie, manque de glucose) ou lors d'un besoin accru nécessitant la consommation excessive d'ATP (Carling, 2004; Fryer & Carling, 2005; Hardie et al, 2006; Kahn et al, 2005). De cette manière, AMPK permet le maintien des stocks d'ATP et prévient de l'apoptose. AMPK permet par exemple la phosphorylation d'une enzyme appelée Acaca qui est responsable la génération de malonylcoA à partir d'acétyl-CoA. En phosphorylant cette enzyme, AMPK inhibe la génération de malonyl-coA (inhibiteur de Cpt1), ce qui favorise l'entrée d'acyl-CoA dans la mitochondrie et donc la génération d'acétyl-coA (Merrill et al, 1997; Vavvas et al, 1997). AMPK intervient également dans l'induction prématurée de la sénescence. En effet, en présence de T3, l'activation du complexe AMPK/ATM participe au recrutement de TR β au niveau de promoteurs impliqués dans la respiration mitochondriale. Ainsi,

l'augmentation de la production et de l'accumulation de ROS (espèce réactives de l'oxygène) contribue à favoriser des dommages à l'ADN et d'induire une sénescence prématurée *in vitro* et *in vivo* (Zambrano et al, 2014). Enfin, il a également été décrit un lien mécanistique entre l'activation d'AMPK et *Cdx2*. En effet, l'utilisation d'agonistes spécifiques a démontré qu'AMPK permet de réguler positivement la transcription de *Cdx2* et d'induire la différenciation épithéliale au niveau de l'intestin (Sun et al, 2017). Or, *Cdx2* est retrouvé significativement augmenté dans notre transcriptome après 17h de traitement à la T3. Toutes ces données suggèrent l'implication probable d'AMPK dans l'induction du phénotype moléculaire observé à 17h et dans l'induction progressive de la différenciation dans les organoïdes.

AMPK a également été décrite pour activer la voie p38-MAPK (Li et al, 2005). La génération de ROS, *via* l'utilisation excessive de la machinerie OXPHOS participe également à l'activation de p38 (Cuenda & Rousseau, 2007; Liemburg-Apers et al, 2015). Or, p38 permet l'expression de gènes dont certains tels que *Ppargc1a* (aussi appelé Pgc-1 α) sont retrouvés augmentés dans notre transcriptome (Fernandez-Marcos & Auwerx, 2011). Il est intéressant de noter que *Ppargc1a* est également une cible directe des TRs puisque la présence d'un TRE a été décrite dans le promoteur de ce gène. En présence de T3, les TRs activent la transcription de ce gène qui, dès lors, peut servir de cofacteur pour activer en retour les TRs, suggérant une boucle d'autorégulation entre les gènes codants ces protéines (Wulf et al, 2008). En effet, Pgc-1 α est un co-activateur de nombreux facteurs de transcription, dont les TRs (Scarpulla, 2011) et d'autres protéines régulatrices telles que les Ppars (Song et al, 2010a). Il permet par exemple aux TRs d'accroître leur effet d'induction sur l'expression de *Cpt1a* (Zhang et al, 2004). *Ppargc1a* est également un médiateur clef de la régulation du métabolisme. Alors que l'expression de ce co-activateur peut être induite par des hormones, il a été montré qu'elle peut être aussi activée par des stimuli énergétiques tels que lors d'une restriction calorique (Duncan, 2011). Dans le cœur par exemple, dès lors que Ppara α interagit avec Pgc-1 α , le complexe module positivement l'expression d'enzymes impliquées dans la FAO et pourrait être impliqué dans la biogénèse des mitochondries (Duncan et al, 2007; Kelly & Scarpulla, 2004). Dans l'intestin, Pgc-1 α est exprimé tout le long de l'axe crypte villosité mais il est plus redondant dans les villosités que dans les cryptes. Dans des cellules hautement glycolytiques telles que des cellules cancéreuses, la surexpression de Pgc-1 α dans l'EI permet de stimuler la machinerie mitochondriale, d'accumuler des ROS et

d'induire l'apoptose alors que l'effet est opposé dans les souris *Ppargc1a*^{-/-} (D'Errico et al, 2011). Dans les cryptes *Pparβ/δ* pourrait interagir avec les produits de du gène *Thra*. En effet, d'une part, il a été démontré chez le rat que l'excès de T3 induit l'expression de *Ppard* dans muscle (de Lange et al, 2007). De plus, dans le contexte d'une surexpression de p43 dans le muscle squelettique, l'isoforme mitochondriale de TRα codée dans le noyau mais transférée dans la mitochondrie, les chercheurs ont observé l'augmentation de l'expression de *Ppard* (Casas et al, 2008), gène qu'on retrouve très fortement augmenté dans notre transcriptome après 17h de traitement à la T3 (**figure 20**).

Les Ppars sont des récepteurs nucléaires d'hormones dont les ligands sont des lipides. Dès lors qu'un ligand se fixe, les récepteurs migrent dans le noyau, se fixent à des éléments de réponse appelés « Peroxisome Proliferator Response Element » (PPRE), pour activer ou réprimer la transcription de gènes cibles (Grygiel-Gorniak, 2014). Les récepteurs Ppars, comme les TRs, agissent en hétérodimères avec les RXRs pour réguler la transcription de leur cible. Il existe trois isoformes de Ppars : *Pparaα*, *Pparβ/δ* et *Pparγ*. Tandis que *Pparaα* et *Pparβ/δ* ont un rôle de combustion d'énergie, *Pparγ* contribue au stockage de l'énergie (Poulsen et al, 2012; Wang et al, 2003). Ces récepteurs agissent comme des senseurs de lipides. En effet en présence de lipides dans le cytoplasme, les Ppars activent la FAO alors que l'absence de lipides conduit à la synthèse de graisses. Dans la muqueuse intestinale, sont concernés *Pparaα* et *Pparβ*. *Pparaα* est localisé principalement dans les villosités tandis que *Pparβ/δ* est localisé dans les cryptes de Lieberkhün (Varnat et al, 2006). Si on devait soupçonner un lien entre les TRs et les Ppars dans notre système, il semblerait que du fait du profil d'expression de leurs gènes (*Thra*, *Thrb*, *Ppara*, *Ppard*) nous pourrions faire l'hypothèse d'un « crosstalk » entre TRα1 voire p43 avec *Pgc-1α* et *Pparβ/δ* ainsi qu'un « crosstalk » entre *Pparaα*, *Pgc-1α* et les produits de *Thrb*. Dans les organoïdes, l'induction de l'activation des TRs pourrait participer à l'augmentation de l'expression de *Pppargc1a* et de *PparD*. Or, ces gènes sont eux-mêmes impliqués dans l'inhibition de la synthèse et de l'absorption du cholestérol (van der Veen et al, 2005), ainsi que dans l'induction de la FAO. La résultante serait l'induction probable d'un stimulus énergétique dans les cellules intestinales, stimulus qui s'avèrerait prolifique ou néfaste selon nos conditions de culture. Finalement, si tout ce processus d'activation métabolique implique l'activation de voies métabolique par les TRs *via* l'activation d'enzymes clefs telles qu'AMPK et les

récepteurs Ppars, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces protéines pourrait probablement permettre de sauver le phénotype T3 ou de le retarder.

C. Hypothèse d'un déficit en substrats

Lors d'un traitement à la T3, en condition supra-physiologique, la sur-activation générale d'enzymes impliquées dans les grandes voies du métabolisme énergétique pourrait être la cause de la perte de l'autorenouvellement cellulaire dans le modèle organoïde. En effet, la stimulation de la glycolyse et la probable stimulation précoce de la FAO pourraient engendrer une forte consommation en glucose et en oxygène, tous deux facteurs limitants pour ces réactions enzymatiques. Pendant le développement des organoïdes, la demande énergétique est croissante du fait de l'apparition de cellules plus différenciées dont l'activité catabolique est plus élevée que celle des cellules souches. De manière intéressante, j'ai décrit une expérience dans laquelle j'ai réussi à sauver en partie l'effet de la T3 avec l'utilisation de VPA (valproate). En effet, le valproate étant un acide gras simple qui sert de substrat pour les enzymes impliquées dans l'oxydation des lipides (Silva et al, 2008). L'ajout de valproate, dès le début de la culture, pourrait donc servir de carburant lors de l'induction précoce de la FAO par la T3 et donc limiter l'épuisement des ressources énergétiques dans les cellules. Si le sauvetage n'est pas total, c'est probablement parce que l'oxygène est également un réactif limitant.

Durant les deux premiers jours de traitements à la T3, la demande énergétique est très forte puisque tout le système enzymatique semble fortement stimulé. Le besoin en substrats « carburant » et en oxygène est donc d'autant plus important. Lors d'une culture à long terme en présence de T3, je soupçonne les cellules d'être limitées en substrats, soit en glucose soit en oxygène par exemple ; d'autant plus que le milieu de culture est ajouté à J0 mais n'est pas changé jusqu'à la fin de la culture (4-5 jours). Cependant, j'avais testé l'effet d'un renouvellement de milieu de culture deux jours après traitement ; le phénotype T3 n'a pas été sauvé suggérant que le glucose n'est peut-être pas le réactif limitant. Néanmoins, les gouttes de Matrigel dans lesquelles sont immergés les organoïdes peuvent freiner la diffusion d'oxygène et de nutriments. De plus, après quatre jours de traitement à la T3, nous avons constaté que le milieu de culture avait jauni, traduisant une acidification, probablement due à un excès de production de lactate. La production de lactate permet de fournir le NAD nécessaire à l'entrée dans le

cycle de Krebs. De plus, à 17h on a constaté l'augmentation de l'expression du gène *Ldha* codant pour la lactate déshydrogénase. Cette réaction étant favorisée en condition d'anaérobiose, ceci renforce l'idée d'un épuisement en substrat oxygéné et/ou d'un besoin accru d'énergie. Le manque d'oxygène pourrait être évalué également en étudiant l'expression de gènes senseurs de l'hypoxie tels que le gène *Hif1* par RTqPCR (Kumar & Choi, 2015). Lors de l'expérience de dissociation d'organoïdes dont j'ai parlé dans la partie « Organoïdes, effet paradoxal de la T3 », le Matrigel a été remplacé par une matrice neuve. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure que la ré-oxygénation de la matrice extracellulaire dans laquelle baignent les organoïdes soit impliquée dans la reprise de croissance et le développement exacerbé des structures 3D. Le développement accéléré d'organoïdes par rapport aux contrôles pourrait s'expliquer par l'effet de « stimulation métabolique » de la T3. Pour tester cette hypothèse, il faudrait s'assurer de l'apport en excès de glucose, de glutamine et s'assurer que les cellules soient correctement perfusées par de l'oxygène alors qu'on les traite à la T3. Le simple repiquage d'organoïdes, en évitant de casser les structures et en changeant simplement le Matrigel, pourrait également permettre de répondre à cette question. À l'avenir, l'utilisation d'un système de microfluidique (Halldorsson et al, 2015) où les organoïdes seraient en permanence perfusés par du milieu frais dans un environnement enrichi en oxygène pourrait être envisagé.

Nous avons démontré l'implication des deux gènes qui codent pour les TRs (*Thra* et *Thrb*) dans la modulation de grandes voies moléculaires impliquées dans le maintien de l'identité souche et de voies métaboliques impliquées dans le contrôle de l'énergie cellulaire. La modulation induite de ces systèmes moléculaires est très complexe à analyser du fait de l'implication de plusieurs types cellulaires (non clonal) et de la grande variété d'isoformes de récepteurs dans ces cellules, cultivées en 3D dans un milieu artificiel et où les autres acteurs de la niche sont absents (myofibroblastes, circulation sanguine, nerfs, microbiote, autre). Du fait des effets précoces sur les enzymes métaboliques observés lors des traitements T3, le phénotype observé est probablement la conséquence de l'activation combinée de la voie génomique et de la voie non génomique des HTs/TRs. Les cellules souches semblent être impactées par ces bouleversements de manière indirecte au travers de TR α 1 mais aussi probablement de manière indirecte au travers de l'effet de TR β 1 et des cellules différenciées sur la niche à cellules souches.

D. Recul sur le modèle expérimental

Dès lors que les cryptes intestinales ont été fraîchement purifiées et cultivées, j'ai additionné le milieu de culture d'HTs. Le milieu qui a été utilisé pour les cultures est un milieu commercialisé, artificiel, qui ne contient pas de sérum. D'ailleurs, les publications (articles, brevets) qui décrivent le milieu n'indiquent pas la présence d'HTs (Sato et al, 2009; Yin et al, 2014).

Contrairement au milieu de culture, la matrice extracellulaire qui a été utilisée (Matrigel) est un produit biologique qui contient des facteurs de croissance et dont la présence en HTs n'a pas été testée. De ce fait, c'est en partie pour cette raison que nous avons décidé de tester nos hypothèses en excès d'HTs ; afin de couvrir la présence putative d'HTs endogènes. L'utilisation de cette matrice et la variabilité de son contenu constituent donc un biais de culture cellulaire. L'utilisation de matrices alternatives artificielles est à envisager.

Les cryptes proviennent du modèle de souris *Lgr5*-EGFP-IRES-CREERT2 qui permet de suivre en direct les cellules *Lgr5*+ (Barker et al, 2007). De ce fait j'ai pu suivre en direct le développement des cryptes fraîches en lumière blanche et en épifluorescence. Cependant, même si le système rapporteur *Lgr5*-EGFP a bien été décrit et est majoritairement utilisé par la communauté scientifique, le caractère « mosaïque » de ce modèle constitue un biais d'analyse.

Une partie de mes analyses moléculaires a été effectuée à partir de cryptes fraîchement cultivées et une autre à partir d'organoïdes repiqués, c'est à dire cultivés à différents passages (P) (de P1 à P10). Durant nos expériences, il n'a jamais été observé de contamination par des fibroblastes. Enfin, les organoïdes ont été cultivés de cinq à sept jours consécutifs suivant s'il s'agit d'organoïdes repiqués ou de cultures de cryptes fraîches respectivement. Cependant, du fait de quelques variations moléculaires (ARNs) et morphologiques qu'on a pu observer entre des organoïdes issus de cryptes fraîches et des organoïdes repiqués sur plusieurs passages, nous préconisons l'utilisation d'organoïdes frais pour être au plus proche des conditions physiologiques *in vivo*. D'ailleurs, dans ce but, il serait également intéressant de pouvoir co-cultiver des organoïdes en présence de myofibroblastes et de tester l'effet de la T3 sur ces cultures.

Nous l'avons testé, mais nos conditions de culture n'étant pas optimales nous n'avons pu conclure quant aux résultats obtenus.

Concernant les TRs, nous prévoyons de rapidement trier les cellules Lgr5+ à partir de fragments intestinaux obtenus à partir d'intestin frais. De cette manière, nous pourrions confirmer/réfuter la présence effective de TR α 1 dans les cellules du fond des cryptes (cellules souches et cellules de Paneth). Nous prévoyons également une analyse transcriptomique en « single cell » à partir de cellules Lgr5+ pour comprendre comment chaque cytotype de la crypte répond à l'hormone. Concernant *Thrb*, les données obtenues sur le profil d'expression de ce gène ont été uniquement générées à partir de souris pourvues d'un système rapporteur de type LacZ (Sirakov et al, 2014). *Thrb* n'est-il vraiment pas exprimé dans les cellules progénitrices en cours de différenciation ? Mon avis personnel est que la meilleure manière de pouvoir répondre à cette question est d'utiliser un système de souris pourvues d'un rapporteur fluorescent construit à la façon des souris *Lgr5*-EGFP (Barker et al, 2007). On pourrait par exemple introduire une cassette RFP en aval du promoteur *Thrb*. De cette manière, on pourrait directement visionner les cellules RFP+ avec une meilleure précision par rapport au système LacZ dont la révélation du signal s'effectue par histochimie. De plus, ce système permettrait de visualiser en direct l'apparition de cellules RFP+ dans le système organoïde et de vérifier si le profil d'expression de *Thrb* reste conforme à ce qui a été décrit *in vivo*. Ainsi, on pourrait confirmer la présence des cellules RFP+ uniquement dans le corps central où siègent les cellules différenciées. La possibilité de pouvoir trier les cellules RFP+ permettrait de les analyser en « single cell » car nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que *Thrb* soit plus exprimé dans certaines populations de cellules différenciées que d'autres, voire exprimé dans des progéniteurs tardifs. Enfin, la génération d'un tel modèle, s'il est croisé au modèle *Thra*-EGFP existant (Wallis et al, 2010), pourrait permettre d'établir de nouvelles signatures moléculaires. Dans l'hypothèse où *Thrb* pourrait être exprimé dans les cellules progénitrices tardives, nous pourrions isoler des cellules TR α -GFPhigh, des cellules TR α -GFPlow/TR β RFPlow et des cellules TR β -RFPhigh. L'analyse transcriptomique de ces trois populations favoriserait l'émergence d'une nouvelle signature moléculaire favorable à la compréhension des mécanismes impliqués dans la voie des TRs, en présence ou en absence d'HTs mais également en condition physiologique comme physiopathologique (ex : cancers colorectaux).

Concernant les différences de résultats entre notre modèle *ex vivo* et nos expériences *in vivo* (voir article), je pense que ces différences peuvent s'expliquer. Premièrement, même si nous n'avons pas mis en évidence une augmentation du nombre de cellules sécrétoires *in vivo*, nous avons constaté une augmentation de la taille de la zone TA indiquant que la T3 favorise l'apparition de progéniteurs prolifératifs. Des analyses moléculaires additives sont en cours. Deuxièmement, afin de pouvoir étudier l'effet des hormones injectées, il faudrait pouvoir mesurer la concentration effective en T3 dans le tissu épithélial, au niveau des cryptes, et faire en sorte que cette concentration soit presque constante sans qu'elle n'altère trop la physiologie de l'organisme. Troisièmement, par définition, l'organisme est un ensemble complexe de tissus connectés les uns aux autres. En l'occurrence, les cryptes intestinales possèdent tous les facteurs essentiels (physiques et moléculaires) pour la croissance des cellules souches. Ces facteurs sont notamment apportés par les cellules environnantes et la circulation sanguine qui perfuse les cellules de l'EI depuis le stroma. De ce fait, cet environnement pourrait servir de tampon cellulaire et moléculaire lors de traitements T3. Enfin, même si les besoins énergétiques sont accrus en présence d'une forte concentration en HTs, la circulation sanguine et le système digestif permettent aux cellules de pouvoir adapter leur consommation en oxygène et en nutriments (sucres, lipides, protéines, autres).

L'ensemble des résultats obtenus durant ce doctorat pourra probablement contribuer à l'amélioration de la compréhension des mécanismes moléculaires modulés par l'axe HTs/TRs dans les cellules souches et les progéniteurs de l'EI. Ainsi, l'exploitation de ces résultats pourrait probablement permettre d'établir de nouveaux axes de recherche, par exemple, en établissant des collaborations avec des chercheurs spécialistes de la relation entre métabolisme et cellules souches. Ces travaux pourront également être transposés dans d'autres contextes. Je pense notamment au contexte tumoral pour déterminer comment les HTs interviennent dans l'accélération/frein du développement de tumeurs intestinales dont les cellules souches sont l'origine (Barker et al, 2009). Enfin, je pense que ces données acquises dans un système de culture innovant pourront être également exploitées par des spécialistes de la régulation de la synthèse/dégradation des sucres et des lipides, par exemple dans un contexte de compréhension des mécanismes moléculaires liant hormones thyroïdiennes, intestin et métabolisme.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe S, Katagiri T, Saito-Hisaminato A, Usami S, Inoue Y, Tsunoda T, Nakamura Y (2003) Identification of CRYM as a candidate responsible for nonsyndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues. *American journal of human genetics* **72**: 73-82
- Abel ED, Ahima RS, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE (2001) Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *The Journal of clinical investigation* **107**: 1017-1023
- Akazawa C, Ishibashi M, Shimizu C, Nakanishi S, Kageyama R (1995) A mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of Drosophila proneural gene atonal is a positive transcriptional regulator expressed in the developing nervous system. *The Journal of biological chemistry* **270**: 8730-8738
- Akiyama J, Okamoto R, Iwasaki M, Zheng X, Yui S, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M (2010) Delta-like 1 expression promotes goblet cell differentiation in Notch-inactivated human colonic epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* **393**: 662-667
- Anbalagan M, Huderson B, Murphy L, Rowan BG (2012) Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nuclear receptor signaling* **10**: e001
- Andrew A (1976) An experimental investigation into the possible neural crest origin of pancreatic APUD (islet) cells. *Journal of embryology and experimental morphology* **35**: 577-593
- Andrew A, Kramer B, Rawdon BB (1998) The origin of gut and pancreatic neuroendocrine (APUD) cells--the last word? *The Journal of pathology* **186**: 117-118
- Apriletti JW, Eberhardt NL, Latham KR, Baxter JD (1981) Affinity chromatography of thyroid hormone receptors. Biospecific elution from support matrices, characterization of the partially purified receptor. *The Journal of biological chemistry* **256**: 12094-12101
- Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML (2006) Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* **25**: 7492-7504
- Ares S, Quero J, Morreale de Escobar G (2005) Neonatal iodine deficiency: clinical aspects. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* **18 Suppl 1**: 1257-1264
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**: 770-776
- Astapova I (2016) Role of co-regulators in metabolic and transcriptional actions of thyroid hormone. *Journal of molecular endocrinology* **56**: 73-97
- Astapova I, Vella KR, Ramadoss P, Holtz KA, Rodwin BA, Liao XH, Weiss RE, Rosenberg MA, Rosenzweig A, Hollenberg AN (2011) The nuclear receptor corepressor (NCoR) controls thyroid hormone sensitivity and the set point of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Molecular endocrinology* **25**: 212-224
- Barker N (2014) Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature reviews Molecular cell biology* **15**: 19-33
- Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, Sato T, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, van den Brink S, Korving J, Abo A, Peters PJ, Wright N, Poulsom R, Clevers H (2010) Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell stem cell* **6**: 25-36
- Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ, Clevers H (2009) Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* **457**: 608-611
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**: 1003-1007

- Barry ER, Morikawa T, Butler BL, Shrestha K, de la Rosa R, Yan KS, Fuchs CS, Magness ST, Smits R, Ogino S, Kuo CJ, Camargo FD (2013) Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. *Nature* **493**: 106-110
- Bartalena L, Robbins J (1993) Thyroid hormone transport proteins. *Clinics in laboratory medicine* **13**: 583-598
- Bartfeld S, Bayram T, van de Wetering M, Huch M, Begthel H, Kujala P, Vries R, Peters PJ, Clevers H (2015) In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection. *Gastroenterology* **148**: 126-136 e126
- Basak O, Beumer J, Wiebrands K, Seno H, van Oudenaarden A, Clevers H (2017) Induced Quiescence of Lgr5+ Stem Cells in Intestinal Organoids Enables Differentiation of Hormone-Producing Enteroendocrine Cells. *Cell stem cell* **20**: 177-190 e174
- Basak O, van de Born M, Korving J, Beumer J, van der Elst S, van Es JH, Clevers H (2014) Mapping early fate determination in Lgr5+ crypt stem cells using a novel Ki67-RFP allele. *EMBO J* **33**: 2057-2068
- Bastide P, Darido C, Pannequin J, Kist R, Robine S, Marty-Double C, Bibeau F, Scherer G, Joubert D, Hollande F, Blache P, Jay P (2007) Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *The Journal of cell biology* **178**: 635-648
- Belforte FS, Targovnik AM, Gonzalez-Lebrero RM, Osorio Larroche C, Citterio CE, Gonzalez-Sarmiento R, Miranda MV, Targovnik HM, Rivolta CM (2015) Kinetic characterization of human thyroperoxidase. Normal and pathological enzyme expression in Baculovirus system: a molecular model of functional expression. *Molecular and cellular endocrinology* **404**: 9-15
- Benhamouche S, Curto M, Saotome I, Gladden AB, Liu CH, Giovannini M, McClatchey AI (2010) Nf2/Merlin controls progenitor homeostasis and tumorigenesis in the liver. *Genes & development* **24**: 1718-1730
- Benvenga S, Guarneri F (2018) Homology of pendrin, sodium-iodide symporter and apical iodide transporter. *Frontiers in bioscience* **23**: 1864-1873
- Benvenga S, Tuccari G, Ieni A, Vita R (2018) Thyroid Gland: Anatomy and Physiology. 382-390
- Berbel P, Mestre JL, Santamaria A, Palazon I, Franco A, Graells M, Gonzalez-Torga A, de Escobar GM (2009) Delayed neurobehavioral development in children born to pregnant women with mild hypothyroxinemia during the first month of gestation: the importance of early iodine supplementation. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* **19**: 511-519
- Berghagen H, Ragnhildstveit E, Krogsrud K, Thuestad G, Apriletti J, Saatcioglu F (2002) Corepressor SMRT functions as a coactivator for thyroid hormone receptor T3Ralpha from a negative hormone response element. *The Journal of biological chemistry* **277**: 49517-49522
- Beumer J, Clevers H (2016) Regulation and plasticity of intestinal stem cells during homeostasis and regeneration. *Development* **143**: 3639-3649
- Beyaz S, Mana MD, Roper J, Kedrin D, Saadatpour A, Hong SJ, Bauer-Rowe KE, Xifaras ME, Akkad A, Arias E, Pinello L, Katz Y, Shinagare S, Abu-Remaileh M, Mihaylova MM, Lamming DW, Dogum R, Guo G, Bell GW, Selig M, Nielsen GP, Gupta N, Ferrone CR, Deshpande V, Yuan GC, Orkin SH, Sabatini DM, Yilmaz OH (2016) High-fat diet enhances stemness and tumorigenicity of intestinal progenitors. *Nature* **531**: 53-58
- Bhatia SN, Ingber DE (2014) Microfluidic organs-on-chips. *Nature biotechnology* **32**: 760-772
- Bianco AC (2013) Cracking the code for thyroid hormone signaling. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* **124**: 26-35
- Bianco AC, Kim BW (2006) Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *The Journal of clinical investigation* **116**: 2571-2579
- Bianco AC, Larsen PR (2005) Cellular and structural biology of the deiodinases. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* **15**: 777-786

- Bitgood MJ, McMahon AP (1995) Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Developmental biology* **172**: 126-138
- Bjerknes M, Cheng H (2010) Cell Lineage metastability in Gfi1-deficient mouse intestinal epithelium. *Developmental biology* **345**: 49-63
- Blondel D, Lutolf MP (2019) Bioinspired Hydrogels for 3D Organoid Culture. *Chimia* **73**: 81-85
- Bohorquez DV, Shahid RA, Erdmann A, Kreger AM, Wang Y, Calakos N, Wang F, Liddle RA (2015) Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells. *The Journal of clinical investigation* **125**: 782-786
- Bossuyt W, Chen CL, Chen Q, Sudol M, McNeill H, Pan D, Kopp A, Halder G (2014) An evolutionary shift in the regulation of the Hippo pathway between mice and flies. *Oncogene* **33**: 1218-1228
- Boyer JL (2018) OSTalpha-OSTbeta Guards the Ileal Enterocyte From the Accumulation of Toxic Levels of Bile Acids. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* **5**: 649-650
- Brent GA (2012) Mechanisms of thyroid hormone action. *The Journal of clinical investigation* **122**: 3035-3043
- Briscoe J, Therond PP (2013) The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* **14**: 416-429
- Brix K, Lemansky P, Herzog V (1996) Evidence for extracellularly acting cathepsins mediating thyroid hormone liberation in thyroid epithelial cells. *Endocrinology* **137**: 1963-1974
- Broguiere N, Isenmann L, Hirt C, Ringel T, Placzek S, Cavalli E, Ringnalda F, Villiger L, Zullig R, Lehmann R, Rogler G, Heim MH, Schuler J, Zenobi-Wong M, Schwank G (2018) Growth of Epithelial Organoids in a Defined Hydrogel. *Advanced materials* **30**: e1801621
- Buchholz DR, Paul BD, Fu L, Shi YB (2006) Molecular and developmental analyses of thyroid hormone receptor function in *Xenopus laevis*, the African clawed frog. *General and comparative endocrinology* **145**: 1-19
- Buchholz DR, Shi YB (2018) Dual function model revised by thyroid hormone receptor alpha knockout frogs. *General and comparative endocrinology* **265**: 214-218
- Buczacki SJ, Zecchini HI, Nicholson AM, Russell R, Vermeulen L, Kemp R, Winton DJ (2013) Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature* **495**: 65-69
- Burgess RJ, Agathocleous M, Morrison SJ (2014) Metabolic regulation of stem cell function. *Journal of internal medicine* **276**: 12-24
- Burnside J, Darling DS, Carr FE, Chin WW (1989) Thyroid hormone regulation of the rat glycoprotein hormone alpha-subunit gene promoter activity. *The Journal of biological chemistry* **264**: 6886-6891
- Butler-Browne GS, Barbet JP, Thornell LE (1990) Myosin heavy and light chain expression during human skeletal muscle development and precocious muscle maturation induced by thyroid hormone. *Anatomy and embryology* **181**: 513-522
- Butler-Browne GS, Herlicoviez D, Whalen RG (1984) Effects of hypothyroidism on myosin isozyme transitions in developing rat muscle. *FEBS letters* **166**: 71-75
- Cai J, Zhang N, Zheng Y, de Wilde RF, Maitra A, Pan D (2010) The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes & development* **24**: 2383-2388
- Cai L, Brown DD (2004) Expression of type II iodothyronine deiodinase marks the time that a tissue responds to thyroid hormone-induced metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Developmental biology* **266**: 87-95

- Cairnie AB, Lamerton LF, Steel GG (1965) Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. I. Determination of the kinetic parameters. *Experimental cell research* **39**: 528-538
- Camargo FD, Gokhale S, Johnnidis JB, Fu D, Bell GW, Jaenisch R, Brummelkamp TR (2007) YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Current biology : CB* **17**: 2054-2060
- Capeling MM, Czerwinski M, Huang S, Tsai YH, Wu A, Nagy MS, Juliar B, Sundaram N, Song Y, Han WM, Takayama S, Alsborg E, Garcia AJ, Helmrath M, Putnam AJ, Spence JR (2019) Nonadhesive Alginate Hydrogels Support Growth of Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Organoids. *Stem cell reports* **12**: 381-394
- Carling D (2004) The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends in biochemical sciences* **29**: 18-24
- Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q (2011) R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 11452-11457
- Carmon KS, Gong X, Yi J, Wu L, Thomas A, Moore CM, Masuho I, Timson DJ, Martemyanov KA, Liu QJ (2017) LGR5 receptor promotes cell-cell adhesion in stem cells and colon cancer cells via the IQGAP1-Rac1 pathway. *The Journal of biological chemistry* **292**: 14989-15001
- Carulli AJ, Keeley TM, Demitrack ES, Chung J, Maillard I, Samuelson LC (2015) Notch receptor regulation of intestinal stem cell homeostasis and crypt regeneration. *Developmental biology* **402**: 98-108
- Carulli AJ, Samuelson LC, Schnell S (2014) Unraveling intestinal stem cell behavior with models of crypt dynamics. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* **6**: 243-257
- Casas F, Pesseme L, Grandemange S, Seyer P, Gueguen N, Baris O, Lepourry L, Cabello G, Wrutniak-Cabello C (2008) Overexpression of the mitochondrial T3 receptor p43 induces a shift in skeletal muscle fiber types. *PloS one* **3**: e2501
- Caussinus E, Gonzalez C (2005) Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. *Nature genetics* **37**: 1125-1129
- Caussinus E, Hirth F (2007) Asymmetric stem cell division in development and cancer. *Progress in molecular and subcellular biology* **45**: 205-225
- Chaker L, Bianco AC, Jonklaas J, Peeters RP (2017) Hypothyroidism. *Lancet* **390**: 1550-1562
- Chan S, Kachilele S, McCabe CJ, Tannahill LA, Boelaert K, Gittoes NJ, Visser TJ, Franklyn JA, Kilby MD (2002) Early expression of thyroid hormone deiodinases and receptors in human fetal cerebral cortex. *Brain research Developmental brain research* **138**: 109-116
- Chan SY, Franklyn JA, Pemberton HN, Bulmer JN, Visser TJ, McCabe CJ, Kilby MD (2006) Monocarboxylate transporter 8 expression in the human placenta: the effects of severe intrauterine growth restriction. *The Journal of endocrinology* **189**: 465-471
- Chandra D, Tang DG (2009) Detection of apoptosis in cell-free systems. *Methods in molecular biology* **559**: 65-75
- Chang WW, Leblond CP (1971a) Renewal of the epithelium in the descending colon of the mouse. I. Presence of three cell populations: vacuolated-columnar, mucous and argentaffin. *Am J Anat* **131**: 73-99
- Chang WW, Leblond CP (1971b) Renewal of the epithelium in the descending colon of the mouse. II. Renewal of argentaffin cells. *Am J Anat* **131**: 101-109
- Chanoine JP, Braverman LE, Farwell AP, Safran M, Alex S, Dubord S, Leonard JL (1993) The thyroid gland is a major source of circulating T3 in the rat. *The Journal of clinical investigation* **91**: 2709-2713
- Chappell VL, Thompson MD, Jeschke MG, Chung DH, Thompson JC, Wolf SE (2003) Effects of incremental starvation on gut mucosa. *Digestive diseases and sciences* **48**: 765-769

- Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Flamant F, Legrand C, Savatier P, Laudet V, Samarut J (1997) Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Molecular endocrinology* **11**: 1278-1290
- Chatonnet F, Guyot R, Benoit G, Flamant F (2013) Genome-wide analysis of thyroid hormone receptors shared and specific functions in neural cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: E766-775
- Chatonnet F, Guyot R, Picou F, Bondesson M, Flamant F (2012) Genome-wide search reveals the existence of a limited number of thyroid hormone receptor alpha target genes in cerebellar neurons. *PLoS one* **7**: e30703
- Chen G, Huang LD, Jiang YM, Manji HK (1999) The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. *Journal of neurochemistry* **72**: 1327-1330
- Chen JD, Evans RM (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**: 454-457
- Chen Y, Lin Y, Davis KM, Wang Q, Rnjak-Kovacina J, Li C, Isberg RR, Kumamoto CA, Mecsas J, Kaplan DL (2015) Robust bioengineered 3D functional human intestinal epithelium. *Scientific reports* **5**: 13708
- Cheng H, Bjercknes M (1985) Whole population cell kinetics and postnatal development of the mouse intestinal epithelium. *The Anatomical record* **211**: 420-426
- Cheng H, Leblond CP (1974a) Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am J Anat* **141**: 461-479
- Cheng H, Leblond CP (1974b) Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* **141**: 537-561
- Cheng SY (2000) Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* **1**: 9-18
- Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL (1999) In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 3120-3125
- Choi J, Ishizuya-Oka A, Buchholz DR (2017) Growth, Development, and Intestinal Remodeling Occurs in the Absence of Thyroid Hormone Receptor alpha in Tadpoles of *Xenopus tropicalis*. *Endocrinology* **158**: 1623-1633
- Choi J, Suzuki KT, Sakuma T, Shewade L, Yamamoto T, Buchholz DR (2015) Unliganded thyroid hormone receptor alpha regulates developmental timing via gene repression in *Xenopus tropicalis*. *Endocrinology* **156**: 735-744
- Choi NH, Lucchetta E, Ohlstein B (2011) Nonautonomous regulation of *Drosophila* midgut stem cell proliferation by the insulin-signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 18702-18707
- Cicatiello AG, Di Girolamo D, Dentice M (2018) Metabolic Effects of the Intracellular Regulation of Thyroid Hormone: Old Players, New Concepts. *Frontiers in endocrinology* **9**: 474
- Citterio CE, Targovnik HM, Arvan P (2019) The role of thyroglobulin in thyroid hormonogenesis. *Nature reviews Endocrinology* **15**: 323-338
- Clevers H (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**: 469-480
- Clevers H (2013) The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* **154**: 274-284

- Clevers H, Batlle E (2013) SnapShot: the intestinal crypt. *Cell* **152**: 1198-1198 e1192
- Clevers H, Nusse R (2012) Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* **149**: 1192-1205
- Cowan CR, Hyman AA (2004) Asymmetric cell division in *C. elegans*: cortical polarity and spindle positioning. *Annual review of cell and developmental biology* **20**: 427-453
- Cuenda A, Rousseau S (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et biophysica acta* **1773**: 1358-1375
- Cummins AG, Catto-Smith AG, Cameron DJ, Couper RT, Davidson GP, Day AS, Hammond PD, Moore DJ, Thompson FM (2008) Crypt fission peaks early during infancy and crypt hyperplasia broadly peaks during infancy and childhood in the small intestine of humans. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **47**: 153-157
- Cummins AG, Thompson FM (2002) Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small intestine in humans. *Gut* **51**: 748-754
- D'Errico I, Salvatore L, Murzilli S, Lo Sasso G, Latorre D, Martelli N, Egorova AV, Polishuck R, Madeyski-Bengtson K, Lelliott C, Vidal-Puig AJ, Seibel P, Villani G, Moschetta A (2011) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha (PGC1alpha) is a metabolic regulator of intestinal epithelial cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 6603-6608
- D'Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G (2008) The many facets of Notch ligands. *Oncogene* **27**: 5148-5167
- Dace A, Zhao L, Park KS, Furuno T, Takamura N, Nakanishi M, West BL, Hanover JA, Cheng S (2000) Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 8985-8990
- Danielsen M (2001) Bioinformatics of nuclear receptors. *Methods in molecular biology* **176**: 3-22
- Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, Fletterick RJ, Yamamoto KR (1998) Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes & development* **12**: 3343-3356
- Darling DS, Burnside J, Chin WW (1989) Binding of thyroid hormone receptors to the rat thyrotropin-beta gene. *Molecular endocrinology* **3**: 1359-1368
- Date S, Sato T (2015) Mini-gut organoids: reconstitution of the stem cell niche. *Annual review of cell and developmental biology* **31**: 269-289
- de Celis JF, Bray SJ (2000) The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe. *Development* **127**: 1291-1302
- de Escobar GM, Obregon MJ, del Rey FE (2004) Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* **18**: 225-248
- de Lange P, Feola A, Ragni M, Senese R, Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, Amat R, Villarroja F, Goglia F, Lanni A (2007) Differential 3,5,3'-triiodothyronine-mediated regulation of uncoupling protein 3 transcription: role of Fatty acids. *Endocrinology* **148**: 4064-4072
- de Lau W, Barker N, Low TY, Koo BK, Li VS, Teunissen H, Kujala P, Haegebarth A, Peters PJ, van de Wetering M, Stange DE, van Es JE, Guardavaccaro D, Schasfoort RB, Mohri Y, Nishimori K, Mohammed S, Heck AJ, Clevers H (2011) Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* **476**: 293-297
- de Zegher F, Pernasetti F, Vanhole C, Devlieger H, Van den Berghe G, Martial JA (1995) The prenatal role of thyroid hormone evidenced by fetomaternal Pit-1 deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **80**: 3127-3130
- Demitrack ES, Samuelson LC (2016) Notch regulation of gastrointestinal stem cells. *The Journal of physiology* **594**: 4791-4803

- Dhobale M (2017) Neurotrophic Factors and Maternal Nutrition During Pregnancy. *Vitamins and hormones* **104**: 343-366
- Di Jeso B, Arvan P (2016) Thyroglobulin From Molecular and Cellular Biology to Clinical Endocrinology. *Endocrine reviews* **37**: 2-36
- Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, Gayyed MF, Anders RA, Maitra A, Pan D (2007) Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell* **130**: 1120-1133
- Downes M, Griggs R, Atkins A, Olson EN, Muscat GE (1993) Identification of a thyroid hormone response element in the mouse myogenin gene: characterization of the thyroid hormone and retinoid X receptor heterodimeric binding site. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **4**: 901-909
- Dumitrescu AM, Liao XH, Weiss RE, Millen K, Refetoff S (2006) Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice. *Endocrinology* **147**: 4036-4043
- Duncan JG (2011) Peroxisome proliferator activated receptor-alpha (PPARalpha) and PPAR gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) regulation of cardiac metabolism in diabetes. *Pediatric cardiology* **32**: 323-328
- Duncan JG, Fong JL, Medeiros DM, Finck BN, Kelly DP (2007) Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/PGC-1alpha gene regulatory pathway. *Circulation* **115**: 909-917
- Dunn AD, Crutchfield HE, Dunn JT (1991) Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L. *The Journal of biological chemistry* **266**: 20198-20204
- Dunn JT, Dunn AD (2001) Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* **11**: 407-414
- Dupre SM, Guissouma H, Flamant F, Seugnet I, Scanlan TS, Baxter JD, Samarut J, Demeneix BA, Becker N (2004) Both thyroid hormone receptor (TR)beta 1 and TR beta 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology* **145**: 2337-2345
- Durand A, Donahue B, Peignon G, Letourneur F, Cagnard N, Slomianny C, Perret C, Shroyer NF, Romagnolo B (2012) Functional intestinal stem cells after Paneth cell ablation induced by the loss of transcription factor Math1 (Atoh1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 8965-8970
- Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**: 1417-1430
- Eliceiri BP, Brown DD (1994) Quantitation of endogenous thyroid hormone receptors alpha and beta during embryogenesis and metamorphosis in *Xenopus laevis*. *The Journal of biological chemistry* **269**: 24459-24465
- Enderle L, McNeill H (2013) Hippo gains weight: added insights and complexity to pathway control. *Science signaling* **6**: re7
- Eskandari S, Loo DD, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N (1997) Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *The Journal of biological chemistry* **272**: 27230-27238
- Evans GS, Flint N, Somers AS, Eyden B, Potten CS (1992) The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *Journal of cell science* **101 (Pt 1)**: 219-231
- Fafilek B, Krausova M, Vojtechova M, Pospichalova V, Tumova L, Sloncova E, Huranova M, Stancikova J, Hlavata A, Svec J, Sedlacek R, Luksan O, Oliverius M, Voska L, Jirsa M, Paces J, Kolar M, Krivjanska M, Klimesova K, Tlaskalova-Hogenova H, Korinek V (2013) Troy, a tumor necrosis factor receptor family

- member, interacts with lgr5 to inhibit wnt signaling in intestinal stem cells. *Gastroenterology* **144**: 381-391
- Fairclough L, Tata JR (1997) An immunocytochemical analysis of the expression of thyroid hormone receptor alpha and beta proteins during natural and thyroid hormone-induced metamorphosis in *Xenopus*. *Development, growth & differentiation* **39**: 273-283
- Farin HF, Jordens I, Mosa MH, Basak O, Korving J, Tauriello DV, de Punder K, Angers S, Peters PJ, Maurice MM, Clevers H (2016) Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature* **530**: 340-343
- Farin HF, Van Es JH, Clevers H (2012) Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology* **143**: 1518-1529 e1517
- Feng Y, Bommer GT, Zhao J, Green M, Sands E, Zhai Y, Brown K, Burberry A, Cho KR, Fearon ER (2011) Mutant KRAS promotes hyperplasia and alters differentiation in the colon epithelium but does not expand the presumptive stem cell pool. *Gastroenterology* **141**: 1003-1013 e1001-1010
- Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J (2011) Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *The American journal of clinical nutrition* **93**: 884S-890
- Ferraro F, Celso CL, Scadden D (2010) Adult stem cells and their niches. *Advances in experimental medicine and biology* **695**: 155-168
- Flamant F, Cheng SY, Hollenberg AN, Moeller LC, Samarut J, Wondisford FE, Yen PM, Refetoff S (2017) Thyroid Hormone Signaling Pathways: Time for a More Precise Nomenclature. *Endocrinology* **158**: 2052-2057
- Flamant F, Poguet AL, Plateroti M, Chassande O, Gauthier K, Streichenberger N, Mansouri A, Samarut J (2002) Congenital hypothyroid Pax8(-/-) mutant mice can be rescued by inactivating the TRalpha gene. *Molecular endocrinology* **16**: 24-32
- Flamant F, Samarut J (2003) Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **14**: 85-90
- Flentjar N, Chu PY, Ng AY, Johnstone CN, Heath JK, Ernst M, Hertzog PJ, Pritchard MA (2007) TGF-betaRII rescues development of small intestinal epithelial cells in Elf3-deficient mice. *Gastroenterology* **132**: 1410-1419
- Fontaine J, Le Lievre C, Le Douarin NM (1977) What is the developmental fate of the neural crest cells which migrate into the pancreas in the avian embryo? *General and comparative endocrinology* **33**: 394-404
- Forhead AJ, Fowden AL (2014) Thyroid hormones in fetal growth and parturition maturation. *The Journal of endocrinology* **221**: R87-R103
- Formeister EJ, Sionas AL, Lorange DK, Barkley CL, Lee GH, Magness ST (2009) Distinct SOX9 levels differentially mark stem/progenitor populations and enteroendocrine cells of the small intestine epithelium. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* **296**: G1108-1118
- Fowden AL, Forhead AJ (2013) Endocrine interactions in the control of fetal growth. *Nestle Nutrition Institute workshop series* **74**: 91-102
- Fraichard A, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Trouillas J, Dehay C, Legrand C, Gauthier K, Kedinger M, Malaval L, Rousset B, Samarut J (1997) The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *The EMBO journal* **16**: 4412-4420
- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM (2010) The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science* **123**: 4195-4200
- Frau C, Godart M, Plateroti M (2017) Thyroid hormone regulation of intestinal epithelial stem cell biology. *Molecular and cellular endocrinology* **459**: 90-97

- Fre S, Hannezo E, Sale S, Huyghe M, Lafkas D, Kissel H, Louvi A, Greve J, Louvard D, Artavanis-Tsakonas S (2011) Notch lineages and activity in intestinal stem cells determined by a new set of knock-in mice. *PLoS one* **6**: e25785
- Fre S, Huyghe M, Mourikis P, Robine S, Louvard D, Artavanis-Tsakonas S (2005) Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* **435**: 964-968
- Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ (2003) Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *The Journal of biological chemistry* **278**: 40128-40135
- Fryer LG, Carling D (2005) AMP-activated protein kinase and the metabolic syndrome. *Biochemical Society transactions* **33**: 362-366
- Fuchs E (2009) The tortoise and the hare: slow-cycling cells in the stem cell race. *Cell* **137**: 811-819
- Fukamachi H (1992) Proliferation and differentiation of fetal rat intestinal epithelial cells in primary serum-free culture. *Journal of cell science* **103 (Pt 2)**: 511-519
- Fuller MT, Spradling AC (2007) Male and female Drosophila germline stem cells: two versions of immortality. *Science* **316**: 402-404
- Fullwood MJ, Wei CL, Liu ET, Ruan Y (2009) Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses. *Genome research* **19**: 521-532
- Furlow JD, Neff ES (2006) A developmental switch induced by thyroid hormone: *Xenopus laevis* metamorphosis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **17**: 40-47
- Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho HJ (2014) The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Advances in experimental medicine and biology* **817**: 39-71
- Furuya S, Furuya K (2007) Subepithelial fibroblasts in intestinal villi: roles in intercellular communication. *International review of cytology* **264**: 165-223
- Gassler N (2017) Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. *World journal of gastrointestinal pathophysiology* **8**: 150-160
- Gauthier K, Plateroti M, Harvey CB, Williams GR, Weiss RE, Refetoff S, Willott JF, Sundin V, Roux JP, Malaval L, Hara M, Samarut J, Chassande O (2001) Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus. *Molecular and cellular biology* **21**: 4748-4760
- Gayer CP, Basson MD (2009) The effects of mechanical forces on intestinal physiology and pathology. *Cellular signalling* **21**: 1237-1244
- Gehart H, Clevers H (2019) Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* **16**: 19-34
- Gerbe F, Jay P (2016) Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal immunology* **9**: 1353-1359
- Gerbe F, Sidot E, Smyth DJ, Ohmoto M, Matsumoto I, Dardalhon V, Cesses P, Garnier L, Pouzolles M, Brulin B, Bruschi M, Harcus Y, Zimmermann VS, Taylor N, Maizels RM, Jay P (2016) Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* **529**: 226-230
- Gerbe F, van Es JH, Makrini L, Brulin B, Mellitzer G, Robine S, Romagnolo B, Shroyer NF, Bourgaux JF, Pignodel C, Clevers H, Jay P (2011) Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *The Journal of cell biology* **192**: 767-780
- Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological reviews* **58**: 685-704

- Gilbert ME, Rovet J, Chen Z, Koibuchi N (2012) Developmental thyroid hormone disruption: prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. *Neurotoxicology* **33**: 842-852
- Glass CK, Rosenfeld MG (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes & development* **14**: 121-141
- Glinka A, Dolde C, Kirsch N, Huang YL, Kazanskaya O, Ingelfinger D, Boutros M, Cruciat CM, Niehrs C (2011) LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO reports* **12**: 1055-1061
- Gnidehou S, Caillou B, Talbot M, Ohayon R, Kaniewski J, Noel-Hudson MS, Morand S, Agnangji D, Sezan A, Courtin F, Virion A, Dupuy C (2004) Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**: 1574-1576
- Goodrich LV, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP (1996) Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes & development* **10**: 301-312
- Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO journal* **20**: 6969-6978
- Goulas S, Conder R, Knoblich JA (2012) The Par complex and integrins direct asymmetric cell division in adult intestinal stem cells. *Cell stem cell* **11**: 529-540
- Graves CL, Harden SW, LaPato M, Nelson M, Amador B, Sorenson H, Frazier CJ, Wallet SM (2014) A method for high purity intestinal epithelial cell culture from adult human and murine tissues for the investigation of innate immune function. *Journal of immunological methods* **414**: 20-31
- Greenblatt DY, Cayo MA, Adler JT, Ning L, Haymart MR, Kunnimalaiyaan M, Chen H (2008) Valproic acid activates Notch1 signaling and induces apoptosis in medullary thyroid cancer cells. *Annals of surgery* **247**: 1036-1040
- Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destree O, Kielman M, Clevers H (2005) Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* **129**: 626-638
- Gribble FM, Reimann F (2016) Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annual review of physiology* **78**: 277-299
- Grijota-Martinez C, Diez D, Morreale de Escobar G, Bernal J, Morte B (2011) Lack of action of exogenously administered T3 on the fetal rat brain despite expression of the monocarboxylate transporter 8. *Endocrinology* **152**: 1713-1721
- Grimaldi AG, Buisine N, Bilesimo P, Sachs LM (2013) High-throughput sequencing will metamorphose the analysis of thyroid hormone receptor function during amphibian development. *Current topics in developmental biology* **103**: 277-303
- Grontved L, Waterfall JJ, Kim DW, Baek S, Sung MH, Zhao L, Park JW, Nielsen R, Walker RL, Zhu YJ, Meltzer PS, Hager GL, Cheng SY (2015) Transcriptional activation by the thyroid hormone receptor through ligand-dependent receptor recruitment and chromatin remodelling. *Nature communications* **6**: 7048
- Grygiel-Gorniak B (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutrition journal* **13**: 17
- Guilmeau S, Flandez M, Mariadason JM, Augenlicht LH (2010) Heterogeneity of Jagged1 expression in human and mouse intestinal tumors: implications for targeting Notch signaling. *Oncogene* **29**: 992-1002
- Gulbinowicz M, Berdel B, Wojcik S, Dziewiatkowski J, Oikarinen S, Mutanen M, Kosma VM, Mykkanen H, Morys J (2004) Morphometric analysis of the small intestine in wild type mice C57BL/6L -- a developmental study. *Folia morphologica* **63**: 423-430

- Guo J, Longshore S, Nair R, Warner BW (2009) Retinoblastoma protein (pRb), but not p107 or p130, is required for maintenance of enterocyte quiescence and differentiation in small intestine. *The Journal of biological chemistry* **284**: 134-140
- Guo X, Wang XF (2009) Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell research* **19**: 71-88
- Hadj-Sahraoui N, Seugnet I, Ghorbel MT, Demeneix B (2000) Hypothyroidism prolongs mitotic activity in the post-natal mouse brain. *Neuroscience letters* **280**: 79-82
- Haelens A, Tanner T, Denayer S, Callewaert L, Claessens F (2007) The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer research* **67**: 4514-4523
- Halldorsson S, Lucumi E, Gomez-Sjoberg R, Fleming RMT (2015) Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosensors & bioelectronics* **63**: 218-231
- Hammes SR, Davis PJ (2015) Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* **29**: 581-593
- Han YH, Moon HJ, You BR, Park WH (2009) The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncology reports* **22**: 215-221
- Hao HX, Xie Y, Zhang Y, Charlat O, Oster E, Avello M, Lei H, Mickanin C, Liu D, Ruffner H, Mao X, Ma Q, Zamponi R, Bouwmeester T, Finan PM, Kirschner MW, Porter JA, Serluca FC, Cong F (2012) ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* **485**: 195-200
- Haramis AP, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJ, Clevers H (2004) De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* **303**: 1684-1686
- Hardie DG, Hawley SA, Scott JW (2006) AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *The Journal of physiology* **574**: 7-15
- Harmel E, Grenier E, Bendjoudi Ouadda A, El Chebly M, Ziv E, Beaulieu JF, Sane A, Spahis S, Laville M, Levy E (2014) AMPK in the small intestine in normal and pathophysiological conditions. *Endocrinology* **155**: 873-888
- Hashimoto K, Cohen RN, Yamada M, Markan KR, Monden T, Satoh T, Mori M, Wondisford FE (2006) Cross-talk between thyroid hormone receptor and liver X receptor regulatory pathways is revealed in a thyroid hormone resistance mouse model. *The Journal of biological chemistry* **281**: 295-302
- He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW (1999) PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* **99**: 335-345
- He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X (2004a) LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* **131**: 1663-1677
- He XC, Yin T, Grindley JC, Tian Q, Sato T, Tao WA, Dirisina R, Porter-Westpfahl KS, Hembree M, Johnson T, Wiedemann LM, Barrett TA, Hood L, Wu H, Li L (2007) PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nature genetics* **39**: 189-198
- He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng X, He X, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L (2004b) BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nature genetics* **36**: 1117-1121
- Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ (2001) Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocrine reviews* **22**: 451-476
- Henning SJ (1979) Biochemistry of intestinal development. *Environmental health perspectives* **33**: 9-16
- Henning SJ (1994) Ontogeny of the intestinal mucosa. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*: 571-611

- Hinz KM, Meyer K, Kinne A, Schulein R, Kohrle J, Krause G (2015) Structural insights into thyroid hormone transport mechanisms of the L-type amino acid transporter 2. *Molecular endocrinology* **29**: 933-942
- Hirata H, Yoshiura S, Ohtsuka T, Bessho Y, Harada T, Yoshikawa K, Kageyama R (2002) Oscillatory expression of the bHLH factor Hes1 regulated by a negative feedback loop. *Science* **298**: 840-843
- Hoermann R, Midgley JE, Larisch R, Dietrich JW (2015) Homeostatic Control of the Thyroid-Pituitary Axis: Perspectives for Diagnosis and Treatment. *Frontiers in endocrinology* **6**: 177
- Hollenberg AN, Monden T, Flynn TR, Boers ME, Cohen O, Wondisford FE (1995a) The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Molecular endocrinology* **9**: 540-550
- Hollenberg AN, Monden T, Wondisford FE (1995b) Ligand-independent and -dependent functions of thyroid hormone receptor isoforms depend upon their distinct amino termini. *The Journal of biological chemistry* **270**: 14274-14280
- Hong AW, Meng Z, Guan KL (2016) The Hippo pathway in intestinal regeneration and disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* **13**: 324-337
- Horiguchi H, Endo M, Kawane K, Kadomatsu T, Terada K, Morinaga J, Araki K, Miyata K, Oike Y (2017) ANGPTL2 expression in the intestinal stem cell niche controls epithelial regeneration and homeostasis. *EMBO J* **36**: 409-424
- Horn S, Heuer H (2010) Thyroid hormone action during brain development: more questions than answers. *Molecular and cellular endocrinology* **315**: 19-26
- Horvay K, Abud HE (2013) Regulation of intestinal stem cells by Wnt and Notch signalling. *Advances in experimental medicine and biology* **786**: 175-186
- Hu X, Lazar MA (1999) The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* **402**: 93-96
- Ingham PW (1998) Transducing Hedgehog: the story so far. *The EMBO journal* **17**: 3505-3511
- Irrcher I, Walkinshaw DR, Sheehan TE, Hood DA (2008) Thyroid hormone (T3) rapidly activates p38 and AMPK in skeletal muscle in vivo. *Journal of applied physiology* **104**: 178-185
- Ishizuya-Oka A (2017) How thyroid hormone regulates transformation of larval epithelial cells into adult stem cells in the amphibian intestine. *Molecular and cellular endocrinology* **459**: 98-103
- Ishizuya-Oka A, Hasebe T, Buchholz DR, Kajita M, Fu L, Shi YB (2009) Origin of the adult intestinal stem cells induced by thyroid hormone in *Xenopus laevis*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**: 2568-2575
- Ishizuya-Oka A, Hasebe T, Shimizu K, Suzuki K, Ueda S (2006) Shh/BMP-4 signaling pathway is essential for intestinal epithelial development during *Xenopus* larval-to-adult remodeling. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **235**: 3240-3249
- Ishizuya-Oka A, Shi YB (2005) Molecular mechanisms for thyroid hormone-induced remodeling in the amphibian digestive tract: a model for studying organ regeneration. *Development, growth & differentiation* **47**: 601-607
- Ishizuya-Oka A, Shimizu K, Sakakibara S, Okano H, Ueda S (2003) Thyroid hormone-upregulated expression of Musashi-1 is specific for progenitor cells of the adult epithelium during amphibian gastrointestinal remodeling. *Journal of cell science* **116**: 3157-3164
- Ishizuya-Oka A, Shimozawa A (1992) Connective tissue is involved in adult epithelial development of the small intestine during anuran metamorphosis in vitro. *Roux's archives of developmental biology : the official organ of the EDBO* **201**: 322-329

- Ishizuya-Oka A, Ueda S (1996) Apoptosis and cell proliferation in the *Xenopus* small intestine during metamorphosis. *Cell and tissue research* **286**: 467-476
- Itzkovitz S, Lyubimova A, Blat IC, Maynard M, van Es J, Lees J, Jacks T, Clevers H, van Oudenaarden A (2011) Single-molecule transcript counting of stem-cell markers in the mouse intestine. *Nature cell biology* **14**: 106-114
- Jabaji Z, Sears CM, Brinkley GJ, Lei NY, Joshi VS, Wang J, Lewis M, Stelzner M, Martin MG, Dunn JC (2013) Use of collagen gel as an alternative extracellular matrix for the in vitro and in vivo growth of murine small intestinal epithelium. *Tissue engineering Part C, Methods* **19**: 961-969
- Jackson-Hayes L, Song S, Lavrentyev EN, Jansen MS, Hillgartner FB, Tian L, Wood PA, Cook GA, Park EA (2003) A thyroid hormone response unit formed between the promoter and first intron of the carnitine palmitoyltransferase-1alpha gene mediates the liver-specific induction by thyroid hormone. *The Journal of biological chemistry* **278**: 7964-7972
- Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 12017-12022
- Jarvi O, Keyrilainen O (1956) On the cellular structures of the epithelial invasions in the glandular stomach of mice caused by intramural application of 20-methylcholantren. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica Supplement* **39**: 72-73
- Johansson ME, Hansson GC (2011) Microbiology. Keeping bacteria at a distance. *Science* **334**: 182-183
- Kabiri Z, Greicius G, Madan B, Biechele S, Zhong Z, Zaribafzadeh H, Edison, Aliyev J, Wu Y, Bunte R, Williams BO, Rossant J, Virshup DM (2014) Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts. *Development* **141**: 2206-2215
- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell metabolism* **1**: 15-25
- Kanamori A, Brown DD (1992) The regulation of thyroid hormone receptor beta genes by thyroid hormone in *Xenopus laevis*. *The Journal of biological chemistry* **267**: 739-745
- Kang HS, Kumar D, Liao G, Lichti-Kaiser K, Gerrish K, Liao XH, Refetoff S, Jothi R, Jetten AM (2017) GLIS3 is indispensable for TSH/TSHR-dependent thyroid hormone biosynthesis and follicular cell proliferation. *The Journal of clinical investigation* **127**: 4326-4337
- Karam SM (1999) Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **4**: D286-298
- Kazanjan A, Noah T, Brown D, Burkart J, Shroyer NF (2010) Atonal homolog 1 is required for growth and differentiation effects of notch/gamma-secretase inhibitors on normal and cancerous intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **139**: 918-928, 928 e911-916
- Kearns AE, Donohue MM, Sanyal B, Demay MB (2001) Cloning and characterization of a novel protein kinase that impairs osteoblast differentiation in vitro. *The Journal of biological chemistry* **276**: 42213-42218
- Kelly DP, Scarpulla RC (2004) Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & development* **18**: 357-368
- Kester MH, Martinez de Mena R, Obregon MJ, Marinkovic D, Howatson A, Visser TJ, Hume R, Morreale de Escobar G (2004) Iodothyronine levels in the human developing brain: major regulatory roles of iodothyronine deiodinases in different areas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **89**: 3117-3128
- Kiela PR, Ghishan FK (2016) Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best practice & research Clinical gastroenterology* **30**: 145-159

- Kim CK, Yang VW, Bialkowska AB (2017) The Role of Intestinal Stem Cells in Epithelial Regeneration Following Radiation-Induced Gut Injury. *Current stem cell reports* **3**: 320-332
- Kim KA, Kakitani M, Zhao J, Oshima T, Tang T, Binnerts M, Liu Y, Boyle B, Park E, Emtage P, Funk WD, Tomizuka K (2005) Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* **309**: 1256-1259
- Kim TH, Escudero S, Shivdasani RA (2012) Intact function of Lgr5 receptor-expressing intestinal stem cells in the absence of Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 3932-3937
- Kim TH, Shivdasani RA (2011) Genetic evidence that intestinal Notch functions vary regionally and operate through a common mechanism of Math1 repression. *The Journal of biological chemistry* **286**: 11427-11433
- Kimelman D, Xu W (2006) beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* **25**: 7482-7491
- Kininis M, Kraus WL (2008) A global view of transcriptional regulation by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis. *Nuclear receptor signaling* **6**: e005
- Klein AM, Simons BD (2011) Universal patterns of stem cell fate in cycling adult tissues. *Development* **138**: 3103-3111
- Kokrashvili Z, Rodriguez D, Yevshayeva V, Zhou H, Margolskee RF, Mosinger B (2009) Release of endogenous opioids from duodenal enteroendocrine cells requires Trpm5. *Gastroenterology* **137**: 598-606, 606 e591-592
- Kong JH, Siebold C, Rohatgi R (2019) Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Development* **146**
- Konsavage WM, Jr., Kyler SL, Rennoll SA, Jin G, Yochum GS (2012) Wnt/beta-catenin signaling regulates Yes-associated protein (YAP) gene expression in colorectal carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* **287**: 11730-11739
- Koo BK, Spit M, Jordens I, Low TY, Stange DE, van de Wetering M, van Es JH, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, Clevers H (2012) Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* **488**: 665-669
- Kopan R, Ilagan MX (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* **137**: 216-233
- Kosinski C, Li VS, Chan AS, Zhang J, Ho C, Tsui WY, Chan TL, Mifflin RC, Powell DW, Yuen ST, Leung SY, Chen X (2007) Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 15418-15423
- Kovall RA (2007) Structures of CSL, Notch and Mastermind proteins: piecing together an active transcription complex. *Current opinion in structural biology* **17**: 117-127
- Krause G, Hinz KM (2017) Thyroid hormone transport across L-type amino acid transporters: What can molecular modelling tell us? *Molecular and cellular endocrinology* **458**: 68-75
- Krausova M, Korinek V (2012) Signal transduction pathways participating in homeostasis and malignant transformation of the intestinal tissue. *Neoplasma* **59**: 708-718
- Kress E, Rezza A, Nadjar J, Samarut J, Plateroti M (2009a) The frizzled-related sFRP2 gene is a target of thyroid hormone receptor alpha1 and activates beta-catenin signaling in mouse intestine. *The Journal of biological chemistry* **284**: 1234-1241
- Kress E, Samarut J, Plateroti M (2009b) Thyroid hormones and the control of cell proliferation or cell differentiation: paradox or duality? *Molecular and cellular endocrinology* **313**: 36-49

- Kress E, Skah S, Sirakov M, Nadjar J, Gadot N, Scoazec JY, Samarut J, Plateroti M (2010) Cooperation between the thyroid hormone receptor TR α 1 and the WNT pathway in the induction of intestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* **138**: 1863-1874
- Kretzschmar K, Clevers H (2017) Wnt/beta-catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells. *Developmental biology* **428**: 273-282
- Kumar H, Choi DK (2015) Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway? *Mediators of inflammation* **2015**: 584758
- Kumar R, Thompson EB (2003) Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Molecular endocrinology* **17**: 1-10
- Kurokawa R, Yu VC, Naar A, Kyakumoto S, Han Z, Silverman S, Rosenfeld MG, Glass CK (1993) Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes & development* **7**: 1423-1435
- Kurtoglu S, Ozdemir A (2017) Fetal neonatal hyperthyroidism: diagnostic and therapeutic approachment. *Turk pediatri arsivi* **52**: 1-9
- Kusek ME, Pazos MA, Pirzai W, Hurley BP (2014) In vitro coculture assay to assess pathogen induced neutrophil trans-epithelial migration. *Journal of visualized experiments : JoVE*: e50823
- Lander AD, Kimble J, Clevers H, Fuchs E, Montarras D, Buckingham M, Calof AL, Trumpp A, Oskarsson T (2012) What does the concept of the stem cell niche really mean today? *BMC biology* **10**: 19
- Larsen PR (1975) Thyroidal triiodothyronine and thyroxine in Graves' disease: correlation with presurgical treatment, thyroid status, and iodine content. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **41**: 1098-1104
- Larsen PR, Zavacki AM (2012) The role of the iodothyronine deiodinases in the physiology and pathophysiology of thyroid hormone action. *European thyroid journal* **1**: 232-242
- Le Douarin NM, Teillet MA (1973) The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *Journal of embryology and experimental morphology* **30**: 31-48
- Lee JJ, Ekker SC, von Kessler DP, Porter JA, Sun BI, Beachy PA (1994) Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* **266**: 1528-1537
- Lee JW, Choi HS, Gyuris J, Brent R, Moore DD (1995) Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Molecular endocrinology* **9**: 243-254
- Lee JW, Kim NH, Milanesi A (2014) Thyroid Hormone Signaling in Muscle Development, Repair and Metabolism. *Journal of endocrinology, diabetes & obesity* **2**: 1046
- Lee S, Privalsky ML (2005) Heterodimers of retinoic acid receptors and thyroid hormone receptors display unique combinatorial regulatory properties. *Molecular endocrinology* **19**: 863-878
- Lee YS, Kim TY, Kim Y, Lee SH, Kim S, Kang SW, Yang JY, Baek IJ, Sung YH, Park YY, Hwang SW, O E, Kim KS, Liu S, Kamada N, Gao N, Kweon MN (2018) Microbiota-Derived Lactate Accelerates Intestinal Stem-Cell-Mediated Epithelial Development. *Cell host & microbe* **24**: 833-846 e836
- Lem AJ, de Rijke YB, van Toor H, de Ridder MA, Visser TJ, Hokken-Koelega AC (2012) Serum thyroid hormone levels in healthy children from birth to adulthood and in short children born small for gestational age. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **97**: 3170-3178
- Li J, Miller EJ, Ninomiya-Tsuji J, Russell RR, 3rd, Young LH (2005) AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart. *Circulation research* **97**: 872-879

- Li N, Nakauka-Ddamba A, Tobias J, Jensen ST, Lengner CJ (2016) Mouse Label-Retaining Cells Are Molecularly and Functionally Distinct From Reserve Intestinal Stem Cells. *Gastroenterology* **151**: 298-310 e297
- Li VS, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, Mahmoudi T, Clevers H (2012) Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* **149**: 1245-1256
- Li W, Zimmerman SE, Peregrina K, Houston M, Mayoral J, Zhang J, Maqbool S, Zhang Z, Cai Y, Ye K, Augenlicht LH (2019) The nutritional environment determines which and how intestinal stem cells contribute to homeostasis and tumorigenesis. *Carcinogenesis*
- Liemburg-Apers DC, Willems PH, Koopman WJ, Grefte S (2015) Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. *Archives of toxicology* **89**: 1209-1226
- Lin H (2008) Cell biology of stem cells: an enigma of asymmetry and self-renewal. *The Journal of cell biology* **180**: 257-260
- Lindeboom L, Nabuurs CI, Hoeks J, Brouwers B, Phielix E, Kooi ME, Hesselink MK, Wildberger JE, Stevens RD, Koves T, Muoio DM, Schrauwen P, Schrauwen-Hinderling VB (2014) Long-echo time MR spectroscopy for skeletal muscle acetylcarnitine detection. *The Journal of clinical investigation* **124**: 4915-4925
- Liu HP, Lin YJ, Lin WY, Wan L, Sheu JJ, Lin HJ, Tsai Y, Tsai CH, Tsai FJ (2009) A novel genetic variant of BMP2K contributes to high myopia. *Journal of clinical laboratory analysis* **23**: 362-367
- Liu YY, Heymann RS, Moatamed F, Schultz JJ, Sobel D, Brent GA (2007) A mutant thyroid hormone receptor alpha antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in vivo and impairs fatty acid oxidation. *Endocrinology* **148**: 1206-1217
- Lo YH, Chung E, Li Z, Wan YW, Mahe MM, Chen MS, Noah TK, Bell KN, Yalamanchili HK, Klisch TJ, Liu Z, Park JS, Shroyer NF (2017) Transcriptional Regulation by ATOH1 and its Target SPDEF in the Intestine. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* **3**: 51-71
- Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* **20**: 781-810
- Lopez-Garcia C, Klein AM, Simons BD, Winton DJ (2010) Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift. *Science* **330**: 822-825
- Loubiere LS, Vasilopoulou E, Glazier JD, Taylor PM, Franklyn JA, Kilby MD, Chan SY (2012) Expression and function of thyroid hormone transporters in the microvillous plasma membrane of human term placental syncytiotrophoblast. *Endocrinology* **153**: 6126-6135
- Louzada RA, Carvalho DP (2018) Similarities and Differences in the Peripheral Actions of Thyroid Hormones and Their Metabolites. *Frontiers in endocrinology* **9**: 394
- Lozoya-Agullo I, Araujo F, Gonzalez-Alvarez I, Merino-Sanjuan M, Gonzalez-Alvarez M, Bermejo M, Sarmiento B (2017) Usefulness of Caco-2/HT29-MTX and Caco-2/HT29-MTX/Raji B Coculture Models To Predict Intestinal and Colonic Permeability Compared to Caco-2 Monoculture. *Molecular pharmaceutics* **14**: 1264-1270
- MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell* **17**: 9-26
- Machuca I, Esslemont G, Fairclough L, Tata JR (1995) Analysis of structure and expression of the Xenopus thyroid hormone receptor-beta gene to explain its autoinduction. *Molecular endocrinology* **9**: 96-107
- Madison BB, Braunstein K, Kuizon E, Portman K, Qiao XT, Gumucio DL (2005) Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* **132**: 279-289
- Maenhaut C, Christophe D, Vassart G, Dumont J, Roger PP, Opitz R (2000) Ontogeny, Anatomy, Metabolism and Physiology of the Thyroid. In *Endotext*, Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K,

- Grossman A, Hershman JM, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Perreault L, Purnell J, Rebar R, Singer F, Trence DL, Vinik A, Wilson DP (eds). South Dartmouth (MA)
- Maldonado-Contreras AL, McCormick BA (2011) Intestinal epithelial cells and their role in innate mucosal immunity. *Cell and tissue research* **343**: 5-12
- Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P (1998) Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nature genetics* **19**: 87-90
- Mao J, Kim BM, Rajurkar M, Shivdasani RA, McMahon AP (2010) Hedgehog signaling controls mesenchymal growth in the developing mammalian digestive tract. *Development* **137**: 1721-1729
- Maria Cambuli F, Rezza A, Nadjar J, Plateroti M (2013) Brief report: musashi1-eGFP mice, a new tool for differential isolation of the intestinal stem cell populations. *Stem cells* **31**: 2273-2278
- Marigo V, Roberts DJ, Lee SM, Tsukurov O, Levi T, Gastier JM, Epstein DJ, Gilbert DJ, Copeland NG, Seidman CE, et al. (1995) Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the *Drosophila* segment polarity gene hedgehog. *Genomics* **28**: 44-51
- Marino M, McCluskey RT (2000) Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *American journal of physiology Cell physiology* **279**: C1295-1306
- Marshman E, Booth C, Potten CS (2002) The intestinal epithelial stem cell. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **24**: 91-98
- Marvin ML, Mazzoni SM, Herron CM, Edwards S, Gruber SB, Petty EM (2011) AXIN2-associated autosomal dominant ectodermal dysplasia and neoplastic syndrome. *American journal of medical genetics Part A* **155A**: 898-902
- Massague J (2008) TGFbeta in Cancer. *Cell* **134**: 215-230
- Massague J (2012) TGFbeta signalling in context. *Nature reviews Molecular cell biology* **13**: 616-630
- Matos LPL, Penha RCC, Cardoso-Weide LC, Freitas ML, Silva D, Ferreira ACF (2018) Regulation of thyroid sodium-iodide symporter in different stages of goiter: Possible involvement of reactive oxygen species. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **45**: 326-334
- Maury J, Nicoletti C, Guzzo-Chambraud L, Maroux S (1995) The filamentous brush border glycocalyx, a mucin-like marker of enterocyte hyper-polarization. *European journal of biochemistry* **228**: 323-331
- Mayerl S, Schmidt M, Doycheva D, Darras VM, Huttner SS, Boelen A, Visser TJ, Kaether C, Heuer H, von Maltzahn J (2018) Thyroid Hormone Transporters MCT8 and OATP1C1 Control Skeletal Muscle Regeneration. *Stem cell reports* **10**: 1959-1974
- Medema JP, Vermeulen L (2011) Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* **474**: 318-326
- Meng Z, Moroishi T, Guan KL (2016) Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & development* **30**: 1-17
- Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, Winder WW (1997) AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *The American journal of physiology* **273**: E1107-1112
- Metcalfe C, Kljavin NM, Ybarra R, de Sauvage FJ (2014) Lgr5+ stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration. *Cell stem cell* **14**: 149-159
- Mishra L, Shetty K, Tang Y, Stuart A, Byers SW (2005) The role of TGF-beta and Wnt signaling in gastrointestinal stem cells and cancer. *Oncogene* **24**: 5775-5789

- Mitsuhashi T, Tennyson GE, Nikodem VM (1988) Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 5804-5808
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T (2005) BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine & growth factor reviews* **16**: 251-263
- Moleti M, Lo Presti VP, Campolo MC, Mattina F, Galletti M, Mandolino M, Violi MA, Giorgianni G, De Domenico D, Trimarchi F, Vermiglio F (2008) Iodine prophylaxis using iodized salt and risk of maternal thyroid failure in conditions of mild iodine deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **93**: 2616-2621
- Moleti M, Lo Presti VP, Mattina F, Mancuso A, De Vivo A, Giorgianni G, Di Bella B, Trimarchi F, Vermiglio F (2009) Gestational thyroid function abnormalities in conditions of mild iodine deficiency: early screening versus continuous monitoring of maternal thyroid status. *European journal of endocrinology* **160**: 611-617
- Montgomery RK, Carlone DL, Richmond CA, Farilla L, Kranendonk ME, Henderson DE, Baffour-Awuah NY, Ambruzs DM, Fogli LK, Algra S, Breault DT (2011) Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 179-184
- Moog NK, Entringer S, Heim C, Wadhwa PD, Kathmann N, Buss C (2017) Influence of maternal thyroid hormones during gestation on fetal brain development. *Neuroscience* **342**: 68-100
- Mori-Akiyama Y, van den Born M, van Es JH, Hamilton SR, Adams HP, Zhang J, Clevers H, de Crombrughe B (2007) SOX9 is required for the differentiation of paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* **133**: 539-546
- Morikawa M, Derynck R, Miyazono K (2016) TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **8**
- Mosimann C, Hausmann G, Basler K (2009) Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**: 276-286
- Motoyama J, Takabatake T, Takeshima K, Hui C (1998) Ptch2, a second mouse Patched gene is co-expressed with Sonic hedgehog. *Nature genetics* **18**: 104-106
- Mousa SA, Davis FB, Mohamed S, Davis PJ, Feng X (2006) Pro-angiogenesis action of thyroid hormone and analogs in a three-dimensional in vitro microvascular endothelial sprouting model. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology* **25**: 407-413
- Mullur R, Liu YY, Brent GA (2014) Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological reviews* **94**: 355-382
- Munoz J, Stange DE, Schepers AG, van de Wetering M, Koo BK, Itzkovitz S, Volckmann R, Kung KS, Koster J, Radulescu S, Myant K, Versteeg R, Sansom OJ, van Es JH, Barker N, van Oudenaarden A, Mohammed S, Heck AJ, Clevers H (2012) The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent '+4' cell markers. *The EMBO journal* **31**: 3079-3091
- Muscat GE, Downes M, Dowhan DH (1995) Regulation of vertebrate muscle differentiation by thyroid hormone: the role of the myoD gene family. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **17**: 211-218
- Muscat GE, Mynett-Johnson L, Dowhan D, Downes M, Griggs R (1994) Activation of myoD gene transcription by 3,5,3'-triiodo-L-thyronine: a direct role for the thyroid hormone and retinoid X receptors. *Nucleic acids research* **22**: 583-591
- Muzza M, Fugazzola L (2017) Disorders of H2O2 generation. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* **31**: 225-240

- Naar AM, Boutin JM, Lipkin SM, Yu VC, Holloway JM, Glass CK, Rosenfeld MG (1991) The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* **65**: 1267-1279
- Nagayama Y, Yamashita S, Hirayu H, Izumi M, Uga T, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S (1989) Regulation of thyroid peroxidase and thyroglobulin gene expression by thyrotropin in cultured human thyroid cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **68**: 1155-1159
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P (1997) Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* **389**: 631-635
- Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP, Smith CL, O'Malley BW (1999) Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 1858-1862
- Ng AY, Waring P, Ristevski S, Wang C, Wilson T, Pritchard M, Hertzog P, Kola I (2002) Inactivation of the transcription factor Elf3 in mice results in dysmorphogenesis and altered differentiation of intestinal epithelium. *Gastroenterology* **122**: 1455-1466
- Nguyen CT, Sasso EB, Barton L, Mestman JH (2018) Graves' hyperthyroidism in pregnancy: a clinical review. *Clinical diabetes and endocrinology* **4**: 4
- Ni L, Llewellyn R, Kesler CT, Kelley JB, Spencer A, Snow CJ, Shank L, Paschal BM (2013) Androgen induces a switch from cytoplasmic retention to nuclear import of the androgen receptor. *Molecular and cellular biology* **33**: 4766-4778
- Nilsson M, Fagman H (2017) Development of the thyroid gland. *Development* **144**: 2123-2140
- Noah TK, Kazanjian A, Whitsett J, Shroyer NF (2010) SAM pointed domain ETS factor (SPDEF) regulates terminal differentiation and maturation of intestinal goblet cells. *Experimental cell research* **316**: 452-465
- Oberoi J, Fairall L, Watson PJ, Yang JC, Czimmerer Z, Kampmann T, Gault BT, Greenwood JA, Gooch JT, Kallenberger BC, Nagy L, Neuhaus D, Schwabe JW (2011) Structural basis for the assembly of the SMRT/NCoR core transcriptional repression machinery. *Nature structural & molecular biology* **18**: 177-184
- Obregon MJ, Calvo RM, Del Rey FE, de Escobar GM (2007) Ontogenesis of thyroid function and interactions with maternal function. *Endocrine development* **10**: 86-98
- Olsauskas-Kuprys R, Zlobin A, Osipo C (2013) Gamma secretase inhibitors of Notch signaling. *OncoTargets and therapy* **6**: 943-955
- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**: 1354-1357
- Ootani A, Li X, Sangiorgi E, Ho QT, Ueno H, Toda S, Sugihara H, Fujimoto K, Weissman IL, Capecchi MR, Kuo CJ (2009) Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nature medicine* **15**: 701-706
- Owen GI, Zelent A (2000) Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **57**: 809-827
- Pan D (2007) Hippo signaling in organ size control. *Genes & development* **21**: 886-897
- Pantalacci S, Tapon N, Leopold P (2003) The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in Drosophila. *Nature cell biology* **5**: 921-927
- Pascual A, Aranda A (2013) Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochimica et biophysica acta* **1830**: 3908-3916

- Pastula A, Marcinkiewicz J (2019) Cellular Interactions in the Intestinal Stem Cell Niche. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* **67**: 19-26
- Pawlak M, Lefebvre P, Staels B (2012) General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Current topics in medicinal chemistry* **12**: 486-504
- Peignon G, Durand A, Cacheux W, Ayrault O, Terris B, Laurent-Puig P, Shroyer NF, Van Seuning I, Honjo T, Perret C, Romagnolo B (2011) Complex interplay between beta-catenin signalling and Notch effectors in intestinal tumorigenesis. *Gut* **60**: 166-176
- Pelaseyed T, Bergstrom JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schutte A, van der Post S, Svensson F, Rodriguez-Pineiro AM, Nystrom EE, Wising C, Johansson ME, Hansson GC (2014) The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological reviews* **260**: 8-20
- Pellegrinet L, Rodilla V, Liu Z, Chen S, Koch U, Espinosa L, Kaestner KH, Kopan R, Lewis J, Radtke F (2011) Dll1- and dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. *Gastroenterology* **140**: 1230-1240 e1231-1237
- Perreault N, Beaulieu JF (1998) Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Experimental cell research* **245**: 34-42
- Perrimon N (1995) Hedgehog and beyond. *Cell* **80**: 517-520
- Peters JM, Shah YM, Gonzalez FJ (2012) The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nature reviews Cancer* **12**: 181-195
- Plateroti M, Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Freund JN, Samarut J, Kedinger M (1999) Involvement of T3Ralpha- and beta-receptor subtypes in mediation of T3 functions during postnatal murine intestinal development. *Gastroenterology* **116**: 1367-1378
- Plateroti M, de Araujo PR, da Silva AE, Penalva LO (2012) The RNA-Binding Protein Musashi1: A Major Player in Intestinal Epithelium Renewal and Colon Cancer Development. *Current colorectal cancer reports* **8**: 290-297
- Plateroti M, Gauthier K, Domon-Dell C, Freund JN, Samarut J, Chassande O (2001) Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development. *Molecular and cellular biology* **21**: 4761-4772
- Plateroti M, Kress E, Mori JI, Samarut J (2006) Thyroid hormone receptor alpha1 directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells. *Molecular and cellular biology* **26**: 3204-3214
- Porter JA, Young KE, Beachy PA (1996) Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* **274**: 255-259
- Portulano C, Paroder-Belenitsky M, Carrasco N (2014) The Na⁺/I⁻ symporter (NIS): mechanism and medical impact. *Endocrine reviews* **35**: 106-149
- Potten CS (1977) Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. *Nature* **269**: 518-521
- Potten CS (1998) Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **353**: 821-830
- Potten CS, Booth C, Pritchard DM (1997) The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *International journal of experimental pathology* **78**: 219-243
- Potten CS, Kovacs L, Hamilton E (1974) Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. *Cell and tissue kinetics* **7**: 271-283

- Potten CS, Loeffler M (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**: 1001-1020
- Potten CS, Owen G, Booth D (2002) Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *Journal of cell science* **115**: 2381-2388
- Poulsen L, Siersbaek M, Mandrup S (2012) PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in cell & developmental biology* **23**: 631-639
- Powell AE, Wang Y, Li Y, Poulin EJ, Means AL, Washington MK, Higginbotham JN, Juchheim A, Prasad N, Levy SE, Guo Y, Shyr Y, Aronow BJ, Haigis KM, Franklin JL, Coffey RJ (2012) The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell* **149**: 146-158
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB (1999) Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *The American journal of physiology* **277**: C183-201
- Prummel MF, Brokken LJ, Wiersinga WM (2004) Ultra short-loop feedback control of thyrotropin secretion. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* **14**: 825-829
- Puschhof J, Clevers H (2018) The Myofibroblasts' War on Drugs. *Developmental cell* **46**: 669-670
- Qi W, Chen J, Cheng X, Huang J, Xiang T, Li Q, Long H, Zhu B (2015) Targeting the Wnt-Regulatory Protein CTNNBIP1 by microRNA-214 Enhances the Stemness and Self-Renewal of Cancer Stem-Like Cells in Lung Adenocarcinomas. *Stem cells* **33**: 3423-3436
- Qi Z, Li Y, Zhao B, Xu C, Liu Y, Li H, Zhang B, Wang X, Yang X, Xie W, Li B, Han JJ, Chen YG (2017) BMP restricts stemness of intestinal Lgr5(+) stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nature communications* **8**: 13824
- Quignodon L, Vincent S, Winter H, Samarut J, Flamant F (2007) A point mutation in the activation function 2 domain of thyroid hormone receptor alpha1 expressed after CRE-mediated recombination partially recapitulates hypothyroidism. *Molecular endocrinology* **21**: 2350-2360
- Radtke F, Clevers H (2005) Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* **307**: 1904-1909
- Ramadoss P, Abraham BJ, Tsai L, Zhou Y, Costa-e-Sousa RH, Ye F, Bilban M, Zhao K, Hollenberg AN (2014) Novel mechanism of positive versus negative regulation by thyroid hormone receptor beta1 (TRbeta1) identified by genome-wide profiling of binding sites in mouse liver. *The Journal of biological chemistry* **289**: 1313-1328
- Rastogi MV, LaFranchi SH (2010) Congenital hypothyroidism. *Orphanet journal of rare diseases* **5**: 17
- Refetoff S (2000) Thyroid Hormone Serum Transport Proteins. In *Endotext*, Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Perreault L, Purnell J, Rebar R, Singer F, Trencle DL, Vinik A, Wilson DP (eds). South Dartmouth (MA)
- Refetoff S, Dumitrescu AM (2007) Syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone: genetic defects in hormone receptors, cell transporters and deiodination. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* **21**: 277-305
- Rezza A, Skah S, Roche C, Nadjar J, Samarut J, Plateroti M (2010) The overexpression of the putative gut stem cell marker Musashi-1 induces tumorigenesis through Wnt and Notch activation. *Journal of cell science* **123**: 3256-3265
- Rhoden KJ, Cianchetta S, Duchi S, Romeo G (2008) Fluorescence quantitation of thyrocyte iodide accumulation with the yellow fluorescent protein variant YFP-H148Q/I152L. *Analytical biochemistry* **373**: 239-246
- Rhodin J, Dalhamn T (1956) Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie* **44**: 345-412

- Riccio O, van Gijn ME, Bezdek AC, Pellegrinet L, van Es JH, Zimmer-Strobl U, Strobl LJ, Honjo T, Clevers H, Radtke F (2008) Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO reports* **9**: 377-383
- Richmond CA, Shah MS, Deary LT, Trotter DC, Thomas H, Ambruzs DM, Jiang L, Whiles BB, Rickner HD, Montgomery RK, Tovaglieri A, Carlone DL, Breault DT (2015) Dormant Intestinal Stem Cells Are Regulated by PTEN and Nutritional Status. *Cell reports* **13**: 2403-2411
- Ritsma L, Ellenbroek SIJ, Zomer A, Snippert HJ, de Sauvage FJ, Simons BD, Clevers H, van Rheenen J (2014) Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging. *Nature* **507**: 362-365
- Rodilla V, Villanueva A, Obrador-Hevia A, Robert-Moreno A, Fernandez-Majada V, Grilli A, Lopez-Bigas N, Bellora N, Alba MM, Torres F, Dunach M, Sanjuan X, Gonzalez S, Gridley T, Capella G, Bigas A, Espinosa L (2009) Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 6315-6320
- Rodriguez-Colman MJ, Schewe M, Meerlo M, Stigter E, Gerrits J, Pras-Raves M, Sacchetti A, Hornsveld M, Oost KC, Snippert HJ, Verhoeven-Duif N, Fodde R, Burgering BM (2017) Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function. *Nature* **543**: 424-427
- Roepstorff C, Halberg N, Hillig T, Saha AK, Ruderman NB, Wojtaszewski JF, Richter EA, Kiens B (2005) Malonyl-CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **288**: E133-142
- Roper J, Yilmaz OH (2017) Metabolic Teamwork in the Stem Cell Niche. *Cell metabolism* **25**: 993-994
- Roulis M, Flavell RA (2016) Fibroblasts and myofibroblasts of the intestinal lamina propria in physiology and disease. *Differentiation; research in biological diversity* **92**: 116-131
- Rousset B, Dupuy C, Miot F, Dumont J (2000) Chapter 2 Thyroid Hormone Synthesis And Secretion. In *Endotext*, Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Perreault L, Purnell J, Rebar R, Singer F, Trencle DL, Vinik A, Wilson DP (eds). South Dartmouth (MA)
- Sacchetti B, Fatica A, Sorci M, Sorrentino A, Signore M, Cerio A, Felicetti F, Feo A, Pelosi E, Care A, Pescarmona E, Gordeladze JO, Valtieri M (2017) Effect of miR-204&211 and RUNX2 control on the fate of human mesenchymal stromal cells. *Regenerative medicine research* **5**: 2
- Sachs LM, Buchholz DR (2017) Frogs model man: In vivo thyroid hormone signaling during development. *Genesis* **55**
- Sachs LM, Buchholz DR (2019) Insufficiency of Thyroid Hormone in Frog Metamorphosis and the Role of Glucocorticoids. *Frontiers in endocrinology* **10**: 287
- Saelim N, John LM, Wu J, Park JS, Bai Y, Camacho P, Lechleiter JD (2004) Nontranscriptional modulation of intracellular Ca²⁺ signaling by ligand stimulated thyroid hormone receptor. *The Journal of cell biology* **167**: 915-924
- Safer JD, Cohen RN, Hollenberg AN, Wondisford FE (1998) Defective release of corepressor by hinge mutants of the thyroid hormone receptor found in patients with resistance to thyroid hormone. *The Journal of biological chemistry* **273**: 30175-30182
- Salisbury S (2003) Cretinism: The past, present and future of diagnosis and cure. *Paediatrics & child health* **8**: 105-106
- Salvatore D, Simonides WS, Dentice M, Zavacki AM, Larsen PR (2014) Thyroid hormones and skeletal muscle--new insights and potential implications. *Nature reviews Endocrinology* **10**: 206-214
- Samuels HH, Tsai JS, Casanova J, Stanley F (1974) Thyroid hormone action: in vitro characterization of solubilized nuclear receptors from rat liver and cultured GH1 cells. *The Journal of clinical investigation* **54**: 853-865

- Sande S, Privalsky ML (1996) Identification of TRACs (T3 receptor-associating cofactors), a family of cofactors that associate with, and modulate the activity of, nuclear hormone receptors. *Molecular endocrinology* **10**: 813-825
- Sander GR, Powell BC (2004) Expression of notch receptors and ligands in the adult gut. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **52**: 509-516
- Sangiorgi E, Capecchi MR (2008) Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature genetics* **40**: 915-920
- Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, Batlle E, Simon-Assmann P, Clevers H, Nathke IS, Clarke AR, Winton DJ (2004) Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes & development* **18**: 1385-1390
- Santiago L, Daniels G, Wang D, Deng FM, Lee P (2017) Wnt signaling pathway protein LEF1 in cancer, as a biomarker for prognosis and a target for treatment. *American journal of cancer research* **7**: 1389-1406
- Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H (2011a) Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* **141**: 1762-1772
- Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, Barker N, Shroyer NF, van de Wetering M, Clevers H (2011b) Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**: 415-418
- Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**: 262-265
- Sayre NL, Lechleiter JD (2012) Fatty acid metabolism and thyroid hormones. *Current trends in endocrinology* **6**: 65-76
- Scarpulla RC (2011) Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et biophysica acta* **1813**: 1269-1278
- Schneider H, Pelaseyed T, Svensson F, Johansson MEV (2018) Study of mucin turnover in the small intestine by in vivo labeling. *Scientific reports* **8**: 5760
- Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells* **4**: 7-25
- Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB (2004) Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* **145**: 2639-2644
- Schreiber AM (2017) Unliganded TRalpha: A "Safety Lock" to Metamorphosis. *Endocrinology* **158**: 1577-1580
- Schreiber AM, Cai L, Brown DD (2005) Remodeling of the intestine during metamorphosis of *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3720-3725
- Schroder N, Gossler A (2002) Expression of Notch pathway components in fetal and adult mouse small intestine. *Gene expression patterns : GEP* **2**: 247-250
- Schroeder A, Jimenez R, Young B, Privalsky ML (2014) The ability of thyroid hormone receptors to sense t4 as an agonist depends on receptor isoform and on cellular cofactors. *Molecular endocrinology* **28**: 745-757
- Schuijers J, Clevers H (2012) Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *The EMBO journal* **31**: 2685-2696

- Schuijers J, van der Flier LG, van Es J, Clevers H (2014) Robust cre-mediated recombination in small intestinal stem cells utilizing the *olm4* locus. *Stem cell reports* **3**: 234-241
- Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, Nebelsiek T, Goktuna SI, Ziegler PK, Canli O, Heijmans J, Huels DJ, Moreaux G, Rupec RA, Gerhard M, Schmid R, Barker N, Clevers H, Lang R, Neumann J, Kirchner T, Taketo MM, van den Brink GR, Sansom OJ, Arkan MC, Greten FR (2013) Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* **152**: 25-38
- Scoville DH, Sato T, He XC, Li L (2008) Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* **134**: 849-864
- Segni M, Leonardi E, Mazzoncini B, Pucarelli I, Pasquino AM (1999) Special features of Graves' disease in early childhood. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* **9**: 871-877
- Seifert JR, Mlodzik M (2007) Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nature reviews Genetics* **8**: 126-138
- Sellitti DF, Suzuki K (2014) Intrinsic regulation of thyroid function by thyroglobulin. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* **24**: 625-638
- Shi L, Tu BP (2015) Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Current opinion in cell biology* **33**: 125-131
- Shi YB (1994) Molecular biology of amphibian metamorphosis A new approach to an old problem. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **5**: 14-20
- Shi YB, Ishizuya-Oka A (1996) Biphasic intestinal development in amphibians: embryogenesis and remodeling during metamorphosis. *Current topics in developmental biology* **32**: 205-235
- Shi YB, Ishizuya-Oka A (2001) Thyroid hormone regulation of apoptotic tissue remodeling: implications from molecular analysis of amphibian metamorphosis. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **65**: 53-100
- Shimizu H, Okamoto R, Ito G, Fujii S, Nakata T, Suzuki K, Murano T, Mizutani T, Tsuchiya K, Nakamura T, Hozumi K, Watanabe M (2014) Distinct expression patterns of Notch ligands, Dll1 and Dll4, in normal and inflamed mice intestine. *PeerJ* **2**: e370
- Shroyer NF, Helmrath MA, Wang VY, Antalffy B, Henning SJ, Zoghbi HY (2007) Intestine-specific ablation of mouse atonal homolog 1 (*Math1*) reveals a role in cellular homeostasis. *Gastroenterology* **132**: 2478-2488
- Shroyer NF, Wallis D, Venken KJ, Bellen HJ, Zoghbi HY (2005) Gfi1 functions downstream of *Math1* to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes & development* **19**: 2412-2417
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 5522-5527
- Sifuentes MM, Lechleiter JD (2018) Thyroid Hormone Stimulation of Adult Brain Fatty Acid Oxidation. *Vitamins and hormones* **106**: 163-193
- Sigal M, Logan CY, Kapalczynska M, Mollenkopf HJ, Berger H, Wiedenmann B, Nusse R, Amieva MR, Meyer TF (2017) Stromal R-spondin orchestrates gastric epithelial stem cells and gland homeostasis. *Nature* **548**: 451-455
- Silva MF, Aires CC, Luis PB, Ruiter JP, L IJ, Duran M, Wanders RJ, Tavares de Almeida I (2008) Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *Journal of inherited metabolic disease* **31**: 205-216

- Sirakov M, Boussouar A, Kress E, Frau C, Lone IN, Nadjar J, Angelov D, Plateroti M (2015) The thyroid hormone nuclear receptor TRalpha1 controls the Notch signaling pathway and cell fate in murine intestine. *Development* **142**: 2764-2774
- Sirakov M, Kress E, Nadjar J, Plateroti M (2014) Thyroid hormones and their nuclear receptors: new players in intestinal epithelium stem cell biology? *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **71**: 2897-2907
- Sirakov M, Skah S, Lone IN, Nadjar J, Angelov D, Plateroti M (2012) Multi-level interactions between the nuclear receptor TRalpha1 and the WNT effectors beta-catenin/Tcf4 in the intestinal epithelium. *PLoS one* **7**: e34162
- Skah S, Uchuya-Castillo J, Sirakov M, Plateroti M (2017) The thyroid hormone nuclear receptors and the Wnt/beta-catenin pathway: An intriguing liaison. *Developmental biology* **422**: 71-82
- Smith BK, Perry CG, Koves TR, Wright DC, Smith JC, Neuffer PD, Muoio DM, Holloway GP (2012) Identification of a novel malonyl-CoA IC(50) for CPT-I: implications for predicting in vivo fatty acid oxidation rates. *The Biochemical journal* **448**: 13-20
- Snippert HJ, van der Flier LG, Sato T, van Es JH, van den Born M, Kroon-Veenboer C, Barker N, Klein AM, van Rheenen J, Simons BD, Clevers H (2010) Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* **143**: 134-144
- Soboll S (1993) Thyroid hormone action on mitochondrial energy transfer. *Biochimica et biophysica acta* **1144**: 1-16
- Song S, Attia RR, Connaughton S, Niesen MI, Ness GC, Elam MB, Hori RT, Cook GA, Park EA (2010a) Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) and PPAR gamma coactivator (PGC-1alpha) induce carnitine palmitoyltransferase IA (CPT-1A) via independent gene elements. *Molecular and cellular endocrinology* **325**: 54-63
- Song Y, Massart C, Chico-Galdo V, Jin L, De Maertelaer V, Decoster C, Dumont JE, Van Sande J (2010b) Species specific thyroid signal transduction: conserved physiology, divergent mechanisms. *Molecular and cellular endocrinology* **319**: 56-62
- Souza PC, Puhl AC, Martinez L, Aparicio R, Nascimento AS, Figueira AC, Nguyen P, Webb P, Skaf MS, Polikarpov I (2014) Identification of a new hormone-binding site on the surface of thyroid hormone receptor. *Molecular endocrinology* **28**: 534-545
- Spit M, Koo BK, Maurice MM (2018) Tales from the crypt: intestinal niche signals in tissue renewal, plasticity and cancer. *Open biology* **8**
- Steinbuck MP, Arakcheeva K, Winandy S (2018) Novel TCR-Mediated Mechanisms of Notch Activation and Signaling. *Journal of immunology* **200**: 997-1007
- Steinbuck MP, Winandy S (2018) A Review of Notch Processing With New Insights Into Ligand-Independent Notch Signaling in T-Cells. *Frontiers in immunology* **9**: 1230
- Steinhardt AA, Gayyed MF, Klein AP, Dong J, Maitra A, Pan D, Montgomery EA, Anders RA (2008) Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Human pathology* **39**: 1582-1589
- Steinhauser ML, Bailey AP, Senyo SE, Guillermier C, Perlstein TS, Gould AP, Lee RT, Lechene CP (2012) Multi-isotope imaging mass spectrometry quantifies stem cell division and metabolism. *Nature* **481**: 516-519
- Stenzel D, Huttner WB (2013) Role of maternal thyroid hormones in the developing neocortex and during human evolution. *Frontiers in neuroanatomy* **7**: 19
- Stockhausen MT, Sjolund J, Manetopoulos C, Axelson H (2005) Effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on Notch signalling in human neuroblastoma cells. *British journal of cancer* **92**: 751-759

- Stolow MA, Shi YB (1995) Xenopus sonic hedgehog as a potential morphogen during embryogenesis and thyroid hormone-dependent metamorphosis. *Nucleic acids research* **23**: 2555-2562
- Struhl K (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes & development* **12**: 599-606
- Sugie H, Verity MA (1985) Postnatal histochemical fiber type differentiation in normal and hypothyroid rat soleus muscle. *Muscle & nerve* **8**: 654-660
- Sun G, Hasebe T, Fujimoto K, Lu R, Fu L, Matsuda H, Kajita M, Ishizuya-Oka A, Shi YB (2010) Spatio-temporal expression profile of stem cell-associated gene LGR5 in the intestine during thyroid hormone-dependent metamorphosis in *Xenopus laevis*. *PLoS one* **5**: e13605
- Sun X, Yang Q, Rogers CJ, Du M, Zhu MJ (2017) AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression. *Cell death and differentiation* **24**: 819-831
- Takano AP, Diniz GP, Barreto-Chaves ML (2013) AMPK signaling pathway is rapidly activated by T3 and regulates the cardiomyocyte growth. *Molecular and cellular endocrinology* **376**: 43-50
- Takebayashi K, Sasai Y, Sakai Y, Watanabe T, Nakanishi S, Kageyama R (1994) Structure, chromosomal locus, and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-1. Negative autoregulation through the multiple N box elements. *The Journal of biological chemistry* **269**: 5150-5156
- Takeda N, Jain R, LeBoeuf MR, Wang Q, Lu MM, Epstein JA (2011) Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science* **334**: 1420-1424
- Tan DW, Barker N (2014) Intestinal stem cells and their defining niche. *Current topics in developmental biology* **107**: 77-107
- Tata JR (1993) Gene expression during metamorphosis: an ideal model for post-embryonic development. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **15**: 239-248
- Tetteh PW, Basak O, Farin HF, Wiebrands K, Kretzschmar K, Begthel H, van den Born M, Korving J, de Sauvage F, van Es JH, van Oudenaarden A, Clevers H (2016) Replacement of Lost Lgr5-Positive Stem Cells through Plasticity of Their Enterocyte-Lineage Daughters. *Cell stem cell* **18**: 203-213
- Tian H, Biehs B, Chiu C, Siebel CW, Wu Y, Costa M, de Sauvage FJ, Klein OD (2015) Opposing activities of Notch and Wnt signaling regulate intestinal stem cells and gut homeostasis. *Cell reports* **11**: 33-42
- Tian H, Biehs B, Warming S, Leong KG, Rangell L, Klein OD, de Sauvage FJ (2011) A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* **478**: 255-259
- Tran IT, Sandy AR, Carulli AJ, Ebens C, Chung J, Shan GT, Radojic V, Friedman A, Gridley T, Shelton A, Reddy P, Samuelson LC, Yan M, Siebel CW, Maillard I (2013) Blockade of individual Notch ligands and receptors controls graft-versus-host disease. *The Journal of clinical investigation* **123**: 1590-1604
- Tsai YH, VanDussen KL, Sawey ET, Wade AW, Kasper C, Rakshit S, Bhatt RG, Stoeck A, Maillard I, Crawford HC, Samuelson LC, Dempsey PJ (2014) ADAM10 regulates Notch function in intestinal stem cells of mice. *Gastroenterology* **147**: 822-834 e813
- Uchuya-Castillo J, Aznar N, Frau C, Martinez P, Le Neve C, Marisa L, Penalva LOF, Laurent-Puig P, Puisieux A, Scoazec JY, Samarut J, Ansieau S, Plateroti M (2018) Increased expression of the thyroid hormone nuclear receptor TRalpha1 characterizes intestinal tumors with high Wnt activity. *Oncotarget* **9**: 30979-30996
- Ueo T, Imayoshi I, Kobayashi T, Ohtsuka T, Seno H, Nakase H, Chiba T, Kageyama R (2012) The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation. *Development* **139**: 1071-1082
- Valenta T, Degirmenci B, Moor AE, Herr P, Zimmerli D, Moor MB, Hausmann G, Cantu C, Aguet M, Basler K (2016) Wnt Ligands Secreted by Subepithelial Mesenchymal Cells Are Essential for the Survival of Intestinal Stem Cells and Gut Homeostasis. *Cell reports* **15**: 911-918

- van den Brink GR, Bleuming SA, Hardwick JC, Schepman BL, Offerhaus GJ, Keller JJ, Nielsen C, Gaffield W, van Deventer SJ, Roberts DJ, Peppelenbosch MP (2004) Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nature genetics* **36**: 277-282
- van der Flier LG, Clevers H (2009) Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual review of physiology* **71**: 241-260
- van der Flier LG, Haegebarth A, Stange DE, van de Wetering M, Clevers H (2009) OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology* **137**: 15-17
- Van der Flier LG, Sabates-Bellver J, Oving I, Haegebarth A, De Palo M, Anti M, Van Gijn ME, Suijkerbuijk S, Van de Wetering M, Marra G, Clevers H (2007) The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology* **132**: 628-632
- van der Veen JN, Kruit JK, Havinga R, Baller JF, Chimini G, Lestavel S, Staels B, Groot PH, Groen AK, Kuipers F (2005) Reduced cholesterol absorption upon PPARdelta activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1. *Journal of lipid research* **46**: 526-534
- van Dop WA, Uhmann A, Wijgerde M, Sleddens-Linkels E, Heijmans J, Offerhaus GJ, van den Bergh Weerman MA, Boeckxstaens GE, Hommes DW, Hardwick JC, Hahn H, van den Brink GR (2009) Depletion of the colonic epithelial precursor cell compartment upon conditional activation of the hedgehog pathway. *Gastroenterology* **136**: 2195-2203 e2191-2197
- van Es JH, de Geest N, van de Born M, Clevers H, Hassan BA (2010) Intestinal stem cells lacking the Math1 tumour suppressor are refractory to Notch inhibitors. *Nature communications* **1**: 18
- van Es JH, Sato T, van de Wetering M, Lyubimova A, Yee Nee AN, Gregorieff A, Sasaki N, Zeinstra L, van den Born M, Korving J, Martens ACM, Barker N, van Oudenaarden A, Clevers H (2012) Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nature cell biology* **14**: 1099-1104
- van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, Cozijnsen M, Robine S, Winton DJ, Radtke F, Clevers H (2005) Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**: 959-963
- VanDussen KL, Carulli AJ, Keeley TM, Patel SR, Puthoff BJ, Magness ST, Tran IT, Maillard I, Siebel C, Kolterud A, Grosse AS, Gumucio DL, Ernst SA, Tsai YH, Dempsey PJ, Samuelson LC (2012) Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development* **139**: 488-497
- VanDussen KL, Samuelson LC (2010) Mouse atonal homolog 1 directs intestinal progenitors to secretory cell rather than absorptive cell fate. *Developmental biology* **346**: 215-223
- Varnat F, Heggeler BB, Grisel P, Boucard N, Corthesy-Theulaz I, Wahli W, Desvergne B (2006) PPARbeta/delta regulates paneth cell differentiation via controlling the hedgehog signaling pathway. *Gastroenterology* **131**: 538-553
- Vavvas D, Apazidis A, Saha AK, Gamble J, Patel A, Kemp BE, Witters LA, Ruderman NB (1997) Contraction-induced changes in acetyl-CoA carboxylase and 5'-AMP-activated kinase in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry* **272**: 13255-13261
- Vella KR, Hollenberg AN (2017) The actions of thyroid hormone signaling in the nucleus. *Molecular and cellular endocrinology* **458**: 127-135
- Vickers AE, Heale J, Sinclair JR, Morris S, Rowe JM, Fisher RL (2012) Thyroid organotypic rat and human cultures used to investigate drug effects on thyroid function, hormone synthesis and release pathways. *Toxicology and applied pharmacology* **260**: 81-88
- Vishwanath VA (2016) Fatty Acid Beta-Oxidation Disorders: A Brief Review. *Annals of neurosciences* **23**: 51-55

- Voog J, D'Alterio C, Jones DL (2008) Multipotent somatic stem cells contribute to the stem cell niche in the *Drosophila* testis. *Nature* **454**: 1132-1136
- Walker-Smith JA (1969) Small bowel morphology in childhood. *The Medical journal of Australia* **1**: 382-387
- Wallis K, Dudazy S, van Hogerlinden M, Nordstrom K, Mittag J, Vennstrom B (2010) The thyroid hormone receptor alpha1 protein is expressed in embryonic postmitotic neurons and persists in most adult neurons. *Molecular endocrinology* **24**: 1904-1916
- Wang X, Matsuda H, Shi YB (2008) Developmental regulation and function of thyroid hormone receptors and 9-cis retinoic acid receptors during *Xenopus tropicalis* metamorphosis. *Endocrinology* **149**: 5610-5618
- Wang Y, Nathans J (2007) Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development* **134**: 647-658
- Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM (2003) Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* **113**: 159-170
- Weikum ER, Liu X, Ortlund EA (2018) The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein science : a publication of the Protein Society* **27**: 1876-1892
- Wen L, Shi YB (2015) Unliganded thyroid hormone receptor alpha controls developmental timing in *Xenopus tropicalis*. *Endocrinology* **156**: 721-734
- Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis-Tsakonas S (1985) Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* **43**: 567-581
- Whitehead RH, Demmler K, Rockman SP, Watson NK (1999) Clonogenic growth of epithelial cells from normal colonic mucosa from both mice and humans. *Gastroenterology* **117**: 858-865
- Willert K, Jones KA (2006) Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes & development* **20**: 1394-1404
- Williams GR (2000) Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Molecular and cellular biology* **20**: 8329-8342
- Williams GR (2008) Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *Journal of neuroendocrinology* **20**: 784-794
- Wolff J, Chaikoff IL (1948) Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *The Journal of biological chemistry* **174**: 555-564
- Wondisford FE, Farr EA, Radovick S, Steinfeld HJ, Moates JM, McClaskey JH, Weintraub BD (1989) Thyroid hormone inhibition of human thyrotropin beta-subunit gene expression is mediated by a cis-acting element located in the first exon. *The Journal of biological chemistry* **264**: 14601-14604
- Wong VW, Stange DE, Page ME, Buczacki S, Wabik A, Itami S, van de Wetering M, Poulsom R, Wright NA, Trotter MW, Watt FM, Winton DJ, Clevers H, Jensen KB (2012) Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nature cell biology* **14**: 401-408
- Wu S, Liu Y, Zheng Y, Dong J, Pan D (2008a) The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Developmental cell* **14**: 388-398
- Wu X, Tu X, Joeng KS, Hilton MJ, Williams DA, Long F (2008b) Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* **133**: 340-353
- Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, Hagenbeek TJ, de Leon GP, Chen Y, Finkle D, Venook R, Wu X, Ridgway J, Schahin-Reed D, Dow GJ, Shelton A, Stawicki S, Watts RJ, Zhang J, Choy R, Howard P, Kadyk L, Yan M, Zha J, Callahan CA, Hymowitz SG, Siebel CW (2010) Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* **464**: 1052-1057

- Wulf A, Harneit A, Kroger M, Kebenko M, Wetzel MG, Weitzel JM (2008) T3-mediated expression of PGC-1alpha via a far upstream located thyroid hormone response element. *Molecular and cellular endocrinology* **287**: 90-95
- Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H (1996) A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature structural biology* **3**: 87-94
- Yamanaka N, Rewitz KF, O'Connor MB (2013) Ecdysone control of developmental transitions: lessons from Drosophila research. *Annual review of entomology* **58**: 497-516
- Yamauchi M, Kambe F, Cao X, Lu X, Kozaki Y, Oiso Y, Seo H (2008) Thyroid hormone activates adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta. *Molecular endocrinology* **22**: 893-903
- Yan KS, Chia LA, Li X, Ootani A, Su J, Lee JY, Su N, Luo Y, Heilshorn SC, Amieva MR, Sangiorgi E, Capecchi MR, Kuo CJ (2012) The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 466-471
- Yan KS, Gevaert O, Zheng GXY, Anchang B, Probert CS, Larkin KA, Davies PS, Cheng ZF, Kaddis JS, Han A, Roelf K, Calderon RI, Cynn E, Hu X, Mandleywala K, Wilhelmy J, Grimes SM, Corney DC, Boutet SC, Terry JM, Belgrader P, Ziraldo SB, Mikkelsen TS, Wang F, von Furstenberg RJ, Smith NR, Chandrakesan P, May R, Chrissy MAS, Jain R, Cartwright CA, Niland JC, Hong YK, Carrington J, Breault DT, Epstein J, Houchen CW, Lynch JP, Martin MG, Plevritis SK, Curtis C, Ji HP, Li L, Henning SJ, Wong MH, Kuo CJ (2017a) Intestinal Enteroendocrine Lineage Cells Possess Homeostatic and Injury-Inducible Stem Cell Activity. *Cell stem cell* **21**: 78-90 e76
- Yan KS, Janda CY, Chang J, Zheng GXY, Larkin KA, Luca VC, Chia LA, Mah AT, Han A, Terry JM, Ootani A, Roelf K, Lee M, Yuan J, Li X, Bolen CR, Wilhelmy J, Davies PS, Ueno H, von Furstenberg RJ, Belgrader P, Ziraldo SB, Ordonez H, Henning SJ, Wong MH, Snyder MP, Weissman IL, Hsueh AJ, Mikkelsen TS, Garcia KC, Kuo CJ (2017b) Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5(+) intestinal stem-cell self-renewal. *Nature* **545**: 238-242
- Yang H, Wang X, Xiong X, Yin Y (2016) Energy metabolism in intestinal epithelial cells during maturation along the crypt-villus axis. *Scientific reports* **6**: 31917
- Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ, Zoghbi HY (2001) Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* **294**: 2155-2158
- Yaoita Y, Brown DD (1990) A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. *Genes & development* **4**: 1917-1924
- Yaoita Y, Shi YB, Brown DD (1990) Xenopus laevis alpha and beta thyroid hormone receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7090-7094
- Yasuda T, Ohnishi H, Wataki K, Minagawa M, Minamitani K, Niimi H (1999) Outcome of a baby born from a mother with acquired juvenile hypothyroidism having undetectable thyroid hormone concentrations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **84**: 2630-2632
- Yen PM (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological reviews* **81**: 1097-1142
- Yen PM, Ando S, Feng X, Liu Y, Maruvada P, Xia X (2006) Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Molecular and cellular endocrinology* **246**: 121-127
- Yen PM, Sugawara A, Chin WW (1992) Triiodothyronine (T3) differentially affects T3-receptor/retinoic acid receptor and T3-receptor/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. *The Journal of biological chemistry* **267**: 23248-23252
- Yilmaz OH, Katajisto P, Lamming DW, Gultekin Y, Bauer-Rowe KE, Sengupta S, Birsoy K, Dursun A, Yilmaz VO, Selig M, Nielsen GP, Mino-Kenudson M, Zukerberg LR, Bhan AK, Deshpande V, Sabatini DM (2012)

- mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature* **486**: 490-495
- Yin X, Farin HF, van Es JH, Clevers H, Langer R, Karp JM (2014) Niche-independent high-purity cultures of Lgr5+ intestinal stem cells and their progeny. *Nature methods* **11**: 106-112
- Yu FX, Guan KL (2013) The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & development* **27**: 355-371
- Zambrano A, Garcia-Carpizo V, Gallardo ME, Villamuera R, Gomez-Ferreria MA, Pascual A, Buisine N, Sachs LM, Garesse R, Aranda A (2014) The thyroid hormone receptor beta induces DNA damage and premature senescence. *The Journal of cell biology* **204**: 129-146
- Zhan T, Rindtorff N, Boutros M (2017) Wnt signaling in cancer. *Oncogene* **36**: 1461-1473
- Zhang J, Khvorostov I, Hong JS, Oktay Y, Vergnes L, Nuebel E, Wahjudi PN, Setoguchi K, Wang G, Do A, Jung HJ, McCaffery JM, Kurland IJ, Reue K, Lee WN, Koehler CM, Teitell MA (2011) UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells. *The EMBO journal* **30**: 4860-4873
- Zhang XK, Wills KN, Graupner G, Tzukerman M, Hermann T, Pfahl M (1991) Ligand-binding domain of thyroid hormone receptors modulates DNA binding and determines their bifunctional roles. *The New biologist* **3**: 169-181
- Zhang Y, Ma K, Song S, Elam MB, Cook GA, Park EA (2004) Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 alpha) enhances the thyroid hormone induction of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I alpha). *The Journal of biological chemistry* **279**: 53963-53971
- Zhang Y, Wen G, Shao G, Wang C, Lin C, Fang H, Balajee AS, Bhagat G, Hei TK, Zhao Y (2009) TGFBI deficiency predisposes mice to spontaneous tumor development. *Cancer research* **69**: 37-44
- Zhao B, Li L, Lei Q, Guan KL (2010) The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes & development* **24**: 862-874
- Zhao Y, Shao G, Piao CQ, Berenguer J, Hei TK (2004) Down-regulation of Betaig-h3 gene is involved in the tumorigenesis in human bronchial epithelial cells induced by heavy-ion radiation. *Radiation research* **162**: 655-659
- Zhao YL, Piao CQ, Hei TK (2002) Downregulation of Betaig-h3 gene is causally linked to tumorigenic phenotype in asbestos treated immortalized human bronchial epithelial cells. *Oncogene* **21**: 7471-7477
- Zheng H, Pritchard DM, Yang X, Bennett E, Liu G, Liu C, Ai W (2009) KLF4 gene expression is inhibited by the notch signaling pathway that controls goblet cell differentiation in mouse gastrointestinal tract. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* **296**: G490-498
- Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Iwasaki M, Kano Y, Sakamoto N, Nakamura T, Watanabe M (2011) Suppression of hath1 gene expression directly regulated by hes1 via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases* **17**: 2251-2260
- Zhou D, Zhang Y, Wu H, Barry E, Yin Y, Lawrence E, Dawson D, Willis JE, Markowitz SD, Camargo FD, Avruch J (2011) Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: E1312-1320
- Zhou W, Choi M, Margineantu D, Margaretha L, Hesson J, Cavanaugh C, Blau CA, Horwitz MS, Hockenbery D, Ware C, Ruohola-Baker H (2012) HIF1alpha induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition. *The EMBO journal* **31**: 2103-2116
- Zoeller RT, Rovet J (2004) Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. *Journal of neuroendocrinology* **16**: 809-818