



HAL
open science

Le rôle de la rigidité du substrat et des contraintes géométriques dans l'auto-organisation des cellules de l'épithélium intestinal

Barbara Mercier

► To cite this version:

Barbara Mercier. Le rôle de la rigidité du substrat et des contraintes géométriques dans l'auto-organisation des cellules de l'épithélium intestinal. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris Cité, 2022. Français. ⟨NNT : 2022UNIP5048⟩. ⟨tel-04264251⟩

HAL Id: tel-04264251

<https://theses.hal.science/tel-04264251v1>

Submitted on 30 Oct 2023

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.



HAL Authorization

Université Paris Cité
Ecole doctorale Bio SPC – ED 562

Institut Jacques Monod, équipe Adhésion cellulaire et mécanique

Le rôle de la rigidité du substrat et des contraintes géométriques dans l'auto- organisation des cellules de l'épithélium intestinal

Par Barbara Mercier

Thèse de doctorat de physiologie et physiopathologie

Dirigée par René-Marc Mège

Présentée et soutenue publiquement le 24 juin 2022

Devant un jury composé de :

Corinne Albiges-Rizo	DR, Université de Grenoble	Rapportrice et présidente du jury
Mathieu Hautefeuille	Professeur (HDR), Sorbonne université	Rapporteur
Elsa Bazellières	CR, Aix-Marseille université	Examinatrice
Benoît Sorre	CR, Sorbonne université	Examineur
Delphine Delacour	DR, Université Paris Cité	Invitée
Benoît Ladoux	DR, Université Paris Cité	Invité
René-Marc Mège	DR, Université Paris Cité (CNRS)	Directeur de thèse

Le rôle de la rigidité du substrat et des contraintes géométriques dans l'auto-organisation des cellules de l'épithélium intestinal

Résumé

La morphogenèse et le renouvellement des tissus résultent d'une interaction complexe entre les programmes de régulation génétique et les processus d'auto-organisation cellulaire. Ces processus sont en partie contrôlés par des paramètres physiques tels que la mécanique cellulaire et tissulaire. Cependant, l'impact de la mécanique sur le renouvellement des tissus et le maintien de la niche des cellules souches reste mal compris. Dans ce travail, nous abordons ces questions en utilisant comme système modèle l'épithélium intestinal cultivé sur des surfaces planes. L'épithélium intestinal comprend différents types de cellules issues d'une même lignée dont la distribution spatiale suit l'axe crypte-villosité. Les cellules souches qui permettent un renouvellement rapide de l'épithélium sont localisées dans la niche. Les cellules engagées dans la différenciation sortent de la niche pour proliférer dans la zone d'amplification transitoire. Ensuite, elles quittent cette zone. Puis, parallèlement au processus de différenciation, les cellules migrent activement le long de la villosité. Afin d'examiner le rôle des contraintes mécaniques sur l'auto-organisation et le maintien de la crypte intestinal et la niche des cellules souches, nous avons cultivé des cellules d'organoïdes intestinaux de souris sur des gels de polyacrylamide plans de rigidité contrôlée re-

couverts de Matrigel. Nous avons observé l'émergence de domaines de type crypte contenant des cellules de Paneth et des cellules souches LGR5+, comparables aux domaines de crypte trouvés dans les organoïdes intestinaux en trois dimensions *in vitro* ainsi qu'*in vivo*. Les cryptes sont caractérisées par une très forte densité cellulaire et des cellules plus columnnaires que les cellules différenciées environnantes. La hauteur, la densité et la prolifération des cellules des cryptes diminuent avec l'augmentation de la rigidité du substrat. Les cryptes sont entourées de cellules très allongées alignées tangentiellement aux domaines prolifératifs formant une frontière entre les deux domaines. Cette limite est caractérisée par des câbles supra-cellulaires d'acto-myosine alignés. En plaçant des cellules entièrement dissociées, nous avons également montré que les cryptes émergent en deux à trois jours à partir d'une monocouche initialement homogène et riche en cellules souches LGR5+. Au cours de ce processus, la prolifération est maintenue et la densité cellulaire augmente dans les domaines prolifératifs; tandis que la densité et la prolifération des cellules souches LGR5+ diminue dans la zone périphérique peuplée de cellules différenciées, rappelant le scénario observé au cours du développement de l'épithélium intestinal *in vivo*. Une augmentation de la rigidité du substrat freine ce processus, en raison d'une réduction drastique de la prolifération des cellules non-différenciées. De plus, le knock-out de la myosine IIA altère fortement la prolifération des cellules non-différenciées et le maintien des domaines de crypte. Ces résultats suggèrent donc que les cryptes peuvent être formées et maintenues sans courbure de l'épithélium par une contribution conjointe de la pression de prolifération et de la formation d'une frontière entre les domaines des cellules prolifératives et différenciées. Par ailleurs, cette frontière dépend de l'activité de la myosine II A. En conclusion, ces travaux contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires liés au développement et au renouvellement de l'épithélium intestinal.

Mots-clés : organoïdes intestinaux, cellules souches, destin cellulaire, auto-organisation, mécanobiologie.

Role of mechanical constraints on self-organization of intestinal épithelium

Abstract

Morphogenesis and tissue homeostatic renewal result from a complex crosstalk between genetic regulation programs, and cellular self-organization processes which are in part controlled by physical parameters such as cell and tissue mechanics. However, the impact of mechanics on homeostatic tissue renewal and tissue stem cell niche maintenance remains poorly understood. Here we addressed this question using the intestinal epithelium cultured on 2D surfaces as a model system. The single layered intestinal epithelium comprises different cell types issued from a single lineage whose spatial distribution follows the crypt/villus axis in function of their birth date and differentiation status. Stem cells which allow a rapid renewal of the epithelium are located in the crypts. Cells committed to differentiate exit the crypt to proliferate in the transitory amplifying zone from where they further migrate actively along the villus as differentiated cells. To question the role of mechanical constraints on the self-organization and maintenance of intestinal crypts, the niche of stem cells, we cultured mouse intestinal organoid cells on 2D Matrigel-coated polyacrylamide gels of controlled stiffness. We observed the emergence of crypt-like domains containing Paneth cells and LGR5+ stem cells, comparable to the crypt domains found in intestinal organoids in three dimensions in vitro as well as in vivo. Crypts were

characterized by a very high density of cells that are more columnar than the surrounding differentiated cells. The height, density and proliferation of crypt cells decrease with increasing substrate stiffness. The crypts are surrounded by highly elongated cells aligned tangentially to the crypt-like domain forming a boundary between the latter and the differentiated cells. This boundary is characterized by tangentially aligned supra-cellular acto-myosin cables. By seeding fully dissociated cells, we further showed that crypts emerge in two to three days out of an initially homogeneous cell monolayer enriched in LGR5+ cells. During this process, proliferation was maintained and cell density increased in the crypt-like domains; while LGR5+ cells density and proliferation decreased in area around populated of differentiated cells, recalling the scenario observed during the development of the intestinal epithelium in vivo. An increased substrate rigidity impaired this process, due to a drastic reduction of precursor cell proliferation. In addition, the knock-out of myosin IIA strongly impaired both precursor cell proliferation and crypt-domain maintenance. These results therefore suggest that crypts can be formed and maintained without curvature of the epithelium by a joint contribution of proliferation pressure and the formation of a myosin IIA-dependent boundary between the proliferative and differentiated cell domains. Altogether, they contribute to a better understanding of the cellular mechanisms related to the development and homeostatic renewal of the intestinal epithelium.

Keywords : intestinal organoids, stem cell, stem cell fate, self-organization, mechanobiology.

Remerciements

Quatre années de thèse, c'est tellement long que j'en ai presque oublié ce qu'était la vie sans thèse. Mais avant retrouver la vie sans le stress de la thèse, j'aimerais remercier les personnes qui m'ont soutenue et aidée tout au long de ces années.

J'aimerais en premier lieu remercier René-Marc et Benoît pour m'avoir donné la possibilité d'effectuer une thèse au sein du laboratoire. J'aimerais remercier les membres du jury et leurs corrections et retours sur mon travail.

Ensuite, j'aimerais remercier toute l'équipe Ladoux-Mège, et les personnes que j'ai rencontrées au fur et à mesure de ces années passées à l'institut Jacques Monod. Plus particulièrement, je voudrais remercier Joseph qui a été la première personne que j'ai rencontrée dans l'équipe et qui m'a encadrée lors de mon stage de M2. J'ai aimé discuter avec toi sur le fond scientifique de mes sujets de recherche (et même discuter tout court sur n'importe quoi) que ce soit pendant mon stage ou après pendant ma thèse. J'admire la manière que tu as d'aborder la recherche et ton travail. Si jamais un jour je continue dans la recherche, je pense que j'aimerais vraiment travailler comme toi, et ce même si tu aimes les tortillas du supermarché. J'aimerais aussi remercier Marc-Antoine avec qui j'ai partagé mon bureau pendant mon stage et au début de ma thèse. Tu mènes la vie de chercheur de mes rêves. Tu fais les choses qui te plaisent avec les gens que tu aimes. Et je suis contente que tu aies été sensible à mes goûts littéraires et d'acteurs (pour ne pas nommer Brad Pitt). J'aime-

rais remercier Shreyansh qui m'a soutenue au début de ma thèse dans les moments où ça n'allait pas fort. Victor, je n'aurais pas pu rêver meilleur co-thésard. Je sais que je te laisse pour les trois derniers mois, mais tu as mon soutien illimité pour ces derniers instants d'épreuve ! Je voudrais remercier Olivia, sans qui je n'aurais jamais pu terminer ma thèse. Tout le travail et le temps que tu as consacré à mon projet, ça a vraiment fait une différence énorme pour moi. Et surtout tu as été un soutien psychologique et de dissidence sans faille ! J'espère vraiment que tu auras ton poste à Marseille, comme ça on ira faire plein de randonnées dans les calanques avec Alison ! Je voudrais bien évidemment remercier Carine, tu as toujours été disponible pour m'écouter, me soutenir et me rassurer dans mes moments d'angoisses. Tu as su m'aiguiller et me conseiller quand je ne savais plus trop dans quelle direction aller. Tu es attentive et présente pour les gens et je pense que ce sont les meilleures des qualités qui soient ! Alison, tu as peu été à Paris, mais ton soutien et tes conseils ont été très précieux pour moi. Gowthamy, tu as été dans le labo que rapidement et à la fin de ma thèse mais j'étais vraiment contente de te rencontrer. j'espère que tout va rouler pour toi pendant ta thèse par la suite ! Et Ruben, merci encore pour tes précieux conseils et ton soutien pour ma présentation. Ne m'oublie pas quand tu seras premier ministre ! Merci à Tien qui malgré tous les thésards qu'elle a rencontrés pendant ses années de travail dans différents laboratoires ne se lasse pas de les soutenir à chaque fois ! Merci Simon, pour tes conseils musique, maintenant j'écoute en boucle bonde do rolè ! Merci à Lucas pour ton aide sur le projet et de partager cet amour pour l'esthétique des graphiques python. Merci à Fanny parce que j'ai l'impression que tu comprends mon stress. J'espère que je pourrai voir ta soutenance ! Merci à Andréas, Sudheer, Sushil, Amaris, Xi Wang, Matis, tous et toutes les autres !

Et pour les anciens et les anciennes, Lakshmi, tu es toujours disponible et présente, merci énormément pour ton aide ! Merci Surabhi pour avoir été tellement disponible

au début de ma thèse. Merci Alex pour avoir été un interlocuteur très réceptif à la plainte.

Merci surtout à l'équipe Cadoret ! A Chrystelle pour avoir été disponible et m'avoir soutenue et écoutée. Merci à Sujung pour le cinéma coréen et la nourriture coréenne ! J'ai hâte d'avoir du temps de nouveau pour ça !

Bien sûr merci aux amis ! Merci à Raphaëlle pour ton écoute, pour avoir été présente et compréhensive avec moi. Merci à Katia, je suis tellement triste que tu ne puisses pas venir à la soutenance. Mais c'est pas grave, on aura tout le temps du monde maintenant pour faire plein de choses ! Merci Sarah, copine de master, de thèse et bientôt de chômage ! J'ai hâte ! Merci Julia, pour la touche queyrassine parce que c'est toujours bien ! Plus sérieusement, merci d'avoir été disponible et présente pour me changer les idées quand je n'étais pas en forme. Merci Juliette, pour les dessins, pour tout, d'avoir écouté, d'avoir été là, de m'avoir soutenue, d'être ma meilleure amie. J'ai hâte qu'on ait enfin plus de temps à passer ensemble !

Merci les coloc, Enzo, Mehdi et Paul de m'avoir supportée. Je sais que maintenant vous ne revivrez plus jamais avec quelqu'un qui fait une thèse. Je pense que c'est une très bonne chose ! Merci surtout à Mehdi et Paul pour les petits plats ! Ce sera bizarre de vivre sans vous. Je ne sais pas comment je vais me tenir au courant des derniers reels.

Merci surtout à la famille, à mes parents qui m'ont soutenue et aidée pendant ces très longues années d'étude. Merci à Annie, Jacques et Marguerite qui avaient sincèrement l'air intéressé par ce que je faisais. Merci aux cousins et cousines ! Sarah et Julia, je sais que vous comprenez. Merci Martin pour me soutenir dans mes super idées de reconversion ! Merci surtout à toi Lucie qui a été là quand ça n'allait pas fort. (Et d'avoir cuisiné des plats trop bons !)

Surtout surtout merci à Raph et Areen ! Vous m'avez soutenue de manière indéfec-

tible. Vous étiez tout le temps là, vous faisiez des bons plats et plein de cadeaux!
Vous êtes trop chouettes et vous êtes beaux! J'ai trop hâte de bientôt pouvoir passer
plein de temps avec vous!

Enfin, merci Philippe. Je sais que ça a pas du tout été facile pour toi pendant ces
dernières années. Et pourtant tu as toujours été là pour moi, tu m'as toujours sou-
tenue et su me donner le courage, la force et l'énergie de continuer. Je ne sais pas
comment j'aurais fait sans toi. J'aurais sûrement pas fait. Mais maintenant c'est la
nouvelle vie! Maintenant, tous les jours, ce sera la fête!



Merci Juliette!

Table des matières

I	Introduction	20
I.1	L'environnement influence l'auto-organisation et la différenciation des cellules souches	21
I.1.1	Les instabilités chimiques : le modèle de réaction diffusion . .	22
I.1.2	Les instabilités mécaniques provoquent l'émergence de formes	25
I.1.3	L'environnement mécanique influence la morphogenèse	27
I.1.3.1	Les contraintes géométriques dirigent l'organisation des cellules souches embryonnaires	27
I.1.3.2	L'élasticité du substrat dirige la différenciation des cellules souches mésenchymateuses	32
I.1.3.3	Le temps de relaxation du substrat joue aussi un rôle dans la différenciation cellulaire	34
I.1.4	Détection et transmission des signaux mécaniques de l'environnement	36
I.1.4.1	Les adhésions focales : senseurs des propriétés mécaniques du substrat	36
I.1.4.2	Les cellules peuvent se transmettre les informations mécaniques via les jonctions adhérentes	42

I.1.4.3	Le cytosquelette d'acto-myosine répond aux propriétés mécaniques de l'environnement	45
I.2	L'épithélium intestinal : un modèle de tissu stéréotypé	50
I.2.1	L'épithélium intestinal est un tissu à multiples fonctions	51
I.2.2	Au cours du développement les villosités et les cryptes se forment successivement	53
I.2.3	L'épithélium intestinal est exposé à un environnement dynamique	55
I.2.4	Les cellules souches de la crypte maintiennent l'homéostasie du tissu	57
I.2.5	Les cellules de l'épithélium intestinal migrent activement du bas vers le haut des villosités	60
I.2.6	La compression et la contractilité cellulaires participent à l'extrusion dans l'épithélium intestinal	62
I.3	Les outils d'étude de l'épithélium intestinal	65
I.3.1	La culture d'organoïdes a bouleversé l'étude de l'épithélium intestinal <i>in vitro</i>	65
I.3.2	Contrôler l'environnement pour mieux comprendre la comportement cellulaire au sein de l'épithélium intestinal	68
I.3.3	Vers une culture plane des organoïdes	72
II	Méthodes	77
II.1	Préparation et culture des organoïdes intestinaux	77
II.1.1	Types cellulaires	77
II.1.2	Préparation des organoïdes intestinaux	79
II.1.3	Culture des organoïdes intestinaux	80
II.1.4	Préparation du milieu de croissance	80
II.1.5	Dépôt des cellules sur gels de PAA (polyacrylamyde)	81

II.2	Préparation des substrats de culture 2D	84
II.2.1	Silanisation du verre	84
II.2.2	Préparation des gels PAA sans motif	84
II.2.3	Préparation des gels PAA avec motifs protéiques conditionnés	86
II.3	Marquage immunologique	90
II.3.1	Fixation et Marquage	90
II.4	Microscopie	93
II.4.1	Imagerie des monocouches fixées	93
II.4.2	Imagerie des monocouches vivantes	93
II.5	Analyse d'images	94
II.5.1	Mesure de la proportion de cellules positives LGR5 et EdU . .	94
II.5.2	Analyse des vitesses moyennes des cellules à l'aide de la PIV .	94
II.5.3	Segmentation et suivi des cellules	98
III	Auto-organisation des cellules de l'épithélium intestinal en domaines	
	de crypte sur des gels plans de PAA	100
III.1	Les cellules d'organoïdes intestinaux s'auto-organisent en domaines de crypte et domaines différenciés sur des gels plans	103
III.2	Discussion	143
IV	Effet des contraintes géométriques sur l'auto-organisation des cel-	
	lules de l'épithélium intestinal	147
IV.1	Méthode de culture de cellules d'organoïdes intestinaux contraints géo- métriquement en 2D sur des gels plans de PAA	150
IV.2	Conclusion et perspectives	154
V	Conclusion	156

A	Liste et référence des réactifs utilisés	162
B	Revue : Bioengineering methods for organoid systems	164
C	Article : Modulation of designer biomimetic matrices for optimized differentiated intestinal epithelial cultures	182

Acronymes

2D Deux dimensions. 12, 18, 23, 81, 84, 102, 148, 150, 154, 158

ADN Acide désoxyribonucléique. 47, 95

APS Ammonium persulfate. 86, 163

DMSO diméthylsulfoxyde. 91

EDTA Éthylènediaminetétra-acétique. 79, 88, 152

EdU 5-Ethynyl-2-deoxyuridine. 19, 91–94

FBS Sérum de veau foetal ou *Fetal Bovine Serum*. 80, 82, 83, 90, 91, 163

GFP Protéine fluorescente verte ou *Green Fluorescent Protein*. 78

H2B Histone H2B. 78, 93, 96

HEPES acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique. 87

KO invalidation génétique ou *Knock Out* (génétique). 78, 103, 146

MDCK *Madin-Darby Canine Kidney*. 155

PAA Polyacrylamyde. 11, 12, 17–19, 81, 83–89, 91, 100, 102, 103, 143, 144, 150–153, 157, 158, 182

PBS Tampon phosphate salin ou *Phosphate-Buffered Saline*. 79, 85–92

PDMS Polydimethylsiloxane. 148, 150

PEG Polyéthylène glycole. 87, 151

PFA Paraformaldéhyde. 90, 92, 163

PIV Vélocimétrie par images de particules ou *Particle Image Velocimetry*. 12, 94–97, 145

PLL Poly-L-lysine. 87, 151

RPM Rotation par minute. 79, 81–83

TA Amplification transitoire ou *Transitory Amplifying*. 76, 101

TFM Microscopie à force de traction ou *Tranction Froce Microscopy*. 144

UV Ultraviolet. 87, 150, 151

VT Villin tomato. 78

WT Type sauvage ou *Wilde type*. 77

Table des figures

I.1	Schéma d'un modèle simple de réaction-diffusion à une dimension . . .	23
I.2	Schéma du modèle de réaction-diffusion dans la formation de l'extrémité des membres chez les tétrapodes	24
I.3	Formation des follicules de plume par auto-organisation	26
I.4	Différenciation des cellules souches embryonnaires humaines contraintes géométriquement	29
I.5	Différenciation des cellules souches humaines pluripotentes induites contraintes géométriquement	31
I.6	Élasticité des tissus et différenciation des cellules souches mésenchymateuses	33
I.7	Influence de la variation viscoélastique de l'environnement dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses	35
I.8	Schéma de maturation des adhésions focales	37
I.9	Schéma du modèle d'embrayage	41
I.10	Schéma du processus de maturation de la E-cadhérine	43
I.11	Schéma du processus de liaison de la vinculine à l' α -caténine	44
I.12	Schéma de liaison de la myosine à l'actine-F	45
I.13	Image de l'organisation de l'actine et de la myosine dans des fibroblastes cultivés sur des substrats mous et durs	46

I.14	Localisation de YAP/TAZ en fonction de l'environnement mécanique de la cellule	48
I.15	Schéma du modèle décrivant la régulation de la transcription et de la différenciation des kératinocytes par la déformation mécanique.	49
I.16	Schéma de la structure de l'épithélium intestinal	52
I.17	Schéma des étapes de la formation de la structure de l'épithélium intestinal	54
I.18	Schéma de l'environnement cellulaire de l'épithélium intestinal	56
I.19	Schéma de la niche de l'épithélium intestinal	59
I.20	Schéma du modèle mécanique de la migration cellulaire de l'épithélium intestinal	61
I.21	Schéma récapitulatif de l'organisation de l'épithélium intestinal	64
I.22	Schéma de la préparation originale des organoïdes intestinaux	66
I.23	Contrôle de l'environnement pour diriger la structure des organoïdes intestinaux	70
I.24	Les forces exercées par les cellules sur le substrat permet de maintenir la séparation entre les cellules de la crypte et les cellules différenciées	76
II.1	Schéma des étapes de la dissociation mécanique	82
II.2	Schéma des étapes de la dissociation enzymatique	83
II.3	Schéma des étapes de préparation des gels de PAA sans motif	85
II.4	Schéma des étapes de reproduction de motifs sur gel de PAA	88
II.5	Schéma des étapes de conditionnement des gels de PAA à motif	89
II.6	Schéma de dépôt des cellules isolées d'organoïdes intestinaux sur des substrats conditionnés	90
II.7	Exemple de cellules repérées automatiquement	95

II.8	Exemple de cryptes repérées et encadrées sur des monocouches de 2,4 kPa.	96
II.9	Exemple de rotation du champ de vitesse d'une crypte selon l'écoulement moyen sur un gel de 2.4 kPa.	97
II.10	Exemple de segmentation et de suivi de cellules villin-tomato centré sur un domaine de crypte.	99
IV.1	Les cellules MCF10A déposent de la laminine 5 sur les substrats. . . .	152
IV.2	Les cellules d'organoïdes intestinaux adhèrent et colonisent les gels de PAA (de 2,4 kPa) avec des motifs conditionnés de fibronectine.	153
IV.3	Les cellules d'organoïdes intestinaux se répartissent de façon inhomogène à la surface des motifs conditionnés de fibronectine.	154
IV.4	Les cellules souches d'organoïdes intestinaux se répartissent de façon inhomogène à la surface des motifs conditionnés de fibronectine.	155
V.1	Schéma de l'auto-organisation des cellules d'organoïdes intestinaux sur des gels 2D de PAA de rigidité différente	158

Liste des tableaux

II.1	Proportions des composants des solutions de PAA	86
II.2	Liste des anticorps utilisés	92
II.3	Proportion des différents composants de la solution cocktail pour le marquage EdU	93
A.1	Liste des anticorps utilisés et leur référence fournisseur	162
A.2	Liste des réactifs utilisés et leur référence fournisseur	163

Chapitre I

Introduction

Au cours de l'embryogenèse, une seule cellule, la cellule-oeuf, engendre des milliards de cellules qui se structurent en un embryon. La morphogenèse correspond à l'ensemble des modifications subies par un embryon jusqu'à l'acquisition de sa forme finale. La très grande reproductibilité des formes observées pendant l'embryogenèse suggère la présence d'informations de natures diverses qui seraient produites, lues et interprétées par les cellules à des temps et des positions spécifiques.

Comme le suggère l'article de C. Collinet et T. Lecuit, il existe deux principales structures de ce flux d'informations dans l'espace et le temps [24]. La première est une structure programmatique. Elle induit des règles déterminées et un flux d'informations hiérarchisées et inscrites dans un réseau complexe avec des ramifications abondantes. La seconde est une structure qui suit les principes de l'auto-organisation. Contrairement à la première qui est déterministe, celle-ci tient compte de phénomènes aléatoires. Les formes complexes émergent d'interactions locales et directes. De plus, dans l'auto-organisation, les informations ne sont pas hiérarchisées ; il existe un échange réciproque entre la biochimie, la géométrie et la mécanique. Par exemple, l'expression génétique influence la mécanique des tissus et vice-versa. Mon travail de

thèse exposé ici s'intéressera plus particulièrement à l'auto-organisation.

Dans ce premier chapitre, nous nous attacherons à décrire l'état de la recherche concernant l'influence de l'environnement sur le développement, et en particulier sur l'épithélium intestinal. Nous verrons ainsi dans un premier temps comment l'environnement mécanique peut influencer l'auto-organisation des tissus et la différenciation des cellules souches. Dans un deuxième temps, nous nous concentrerons sur la description de notre modèle biologique : l'épithélium intestinal. Enfin, dans un troisième temps, nous examinerons les outils récemment développés qui ont permis d'étudier l'influence de l'environnement mécanique sur le comportement des cellules de l'épithélium intestinal.

I.1 L'environnement influence l'auto-organisation et la différenciation des cellules souches

La présente section portera sur la perception par les cellules de leur environnement et leur réponse face à ces stimuli. Ainsi, elle traitera dans un premier temps des instabilités chimiques et plus particulièrement du modèle de réaction-diffusion développé par A.M. Turing. Ensuite, nous verrons une explication de l'auto-organisation basée sur des instabilités mécaniques. Par la suite, nous aborderons la façon dont les propriétés de l'environnement mécanique peuvent diriger la différenciation cellulaire. Enfin, nous parlerons des éléments cellulaires impliqués dans la détection et la transmission intercellulaire des propriétés mécaniques.

I.1.1 Les instabilités chimiques : le modèle de réaction diffusion

Lors de l'embryogenèse, à partir d'un système assez homogène, des formes émergent de faibles fluctuations autour de l'équilibre. On sait que de nombreux signaux chimiques diffusifs influencent le déroulement de la morphogenèse. En effet, l'histoire de la biologie développementale est traversée par la mise en évidence de ces signaux chimiques diffusifs jouant un rôle clef à certaines étapes de l'embryogenèse. On compte parmi eux des grandes familles de molécules telles que : BMP (Bone Morphogenetic Protein), Hedgehog, FGF (Fibroblast Growth Factors) ou encore Wnt [95].

Il existe différents modèles qui expliquent l'émergence spontanée de motifs et de rupture de symétrie à travers des voies biochimiques de signalisation. Un des modèles incontournables est celui dit de réaction-diffusion de Turing [160]. Nous développerons ainsi dans cette partie ce modèle et l'illustrerons grâce à un exemple tiré de la biologie du développement.

Comme l'expliquent F. Schweisguth et F. Corson, dans le modèle de Turing, les unités de base du modèle, nommées ici cellules, interagissent entre elles par la diffusion d'espèces chimiques [141]. Ces cellules sont statiques et les espèces chimiques peuvent diffuser à des distances supérieures à la taille d'une cellule. L'interaction de ces espèces chimiques est décrite par des équations aux dérivées partielles avec des variations continues de concentration. Dans un modèle simple de réaction-diffusion, un activateur va stimuler sa propre production ainsi que la production d'un inhibiteur. En modulant les vitesses de diffusion de l'activateur et de l'inhibiteur, on peut obtenir des motifs divers, stables ou non dans le temps. Par exemple, si la vitesse de diffusion de l'activateur est inférieure à celle de l'inhibiteur, on obtient des motifs stables dans le temps avec un milieu initial uniforme (fig I.1). Ce modèle simple, en deux dimensions, peut faire émerger des motifs semblables au pelage de certains

animaux [80].

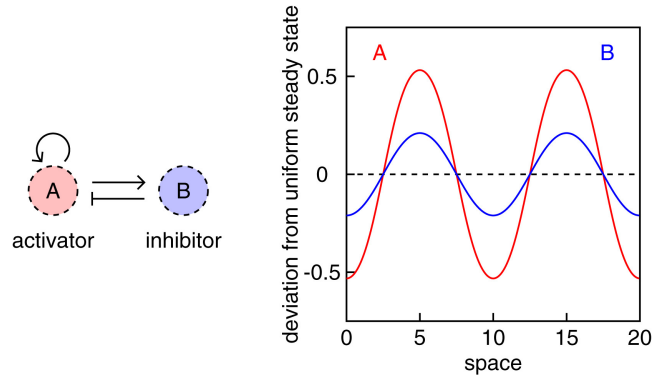


FIGURE I.1 – Schéma d'un modèle simple de réaction-diffusion à une dimension
Adapté de [141].

Un des exemples d'auto-organisation suivant un modèle de Turing *in vivo* est la formation des autopodes chez les tétrapodes. Ainsi, d'après J. Raspopovic et collègues, la structure de l'extrémité des membres chirodiens est auto-organisée selon un modèle de réaction-diffusion [125]. Ce modèle compte trois espèces biochimiques : Sox9 (un facteur de transcription) et deux signaux diffusifs BMP et Wnt. Comme présentée en une dimension dans la figure I.2, l'expression de Sox9 (qui induit les domaines de formation des doigts) est activée par BMP2 mais inhibée par Wnt. Le modèle BMP-Sox9-Wnt simulé en 2D (deux dimensions) produit des stries d'expression de Sox9 orientées de façon aléatoire. Il est donc nécessaire d'implémenter au modèle deux conditions pour retrouver le motif spatial d'expression de Sox9. La première condition est l'expression de Hoxd13 qui limite des instabilités de Turing à la région distale des membres et entraîne une orientation proximo-distale des stries. La deuxième condition est l'association de l'expression de Hoxd13 avec celle de FGF afin de contrôler le nombre de doigts et d'éviter les fourches au bout des doigts. Par ailleurs, une inhibition des signaux BMP et Wnt entraîne des membres mal formés.

L'inhibition de BMP annule la formation des doigts. Quant à l'inhibition de Wnt, elle annule la formation d'espaces inter-digitaux [125]. Cet exemple nous permet de constater que la différence de vitesse de diffusion d'espèces chimiques explique l'apparition de motifs d'expression de gènes impliqués dans la morphogenèse.

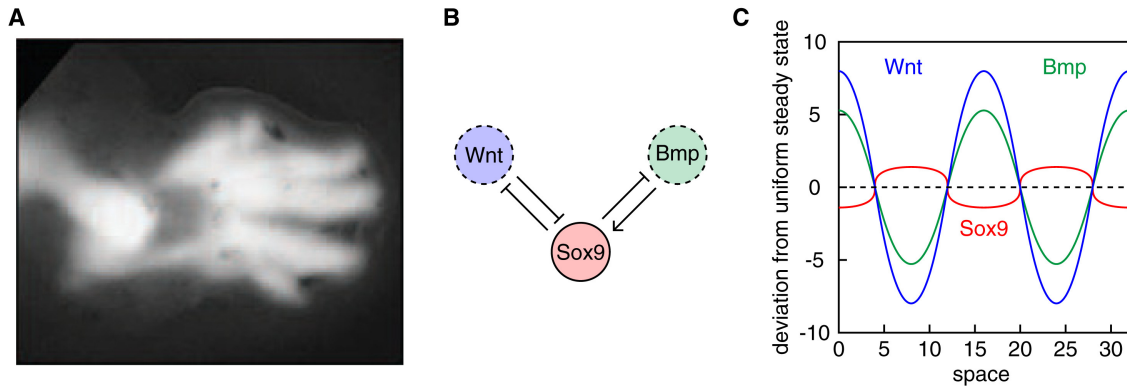


FIGURE I.2 – Schéma du modèle de réaction-diffusion dans la formation de l'extrémité des membres chez les tétrapodes

(A) Expression du facteur de transcription Sox 9 dans les membres. (B) Modèle de réaction-diffusion proposé pour la formation des membres. (C) Simulation en une dimension de la présence de Wnt et BMP et de l'expression de Sox9. Adapté de [141].

Une explication de la formation d'organes ou de membres uniquement par la diffusion d'espèces chimiques peut sembler un peu limitée. Et Turing lui-même admettait que la diffusion de composés chimiques n'est qu'une seule manière parmi d'autres pour les cellules de communiquer. La communication intercellulaire peut aussi passer par un contact direct entre les cellules sans diffusion. Par exemple, la voie de signalisation Notch est enclenchée par le contact direct entre des cellules présentant Notch à leur membrane et les cellules présentant des récepteurs transmembranaires de Notch [89]). La communication cellulaire peut aussi passer par des forces mécaniques par exemple. Nous verrons donc ensuite l'auto-organisation induite par des instabilités mécaniques.

I.1.2 Les instabilités mécaniques provoquent l'émergence de formes

Nous avons vu dans la partie précédente que l'auto-organisation des cellules dans un organisme pouvait résulter d'une instabilité chimique avec en particulier le modèle de Turing. Seulement, la diffusion de signaux chimiques n'est pas le seul moyen de communication des cellules entre elles. Nous verrons donc dans cette partie comment les instabilités mécaniques peuvent aussi engendrer de l'auto-organisation des follicules de plume chez le poulet.

Dans cette étude présentée par A.E. Shayer et collègues, les auteurs étudient la formation de follicules de plume chez le poulet [143]. Avant la formation des follicules, la peau embryonnaire est composée d'un feuillet de cellules épithéliales qui reposent sur une matrice extra-cellulaire dans laquelle des cellules mésenchymateuses se meuvent. Les deux types cellulaires sont séparés par une membrane basale. La peau initialement homogène présente au bout de deux jours des agrégats de cellules mésenchymateuses espacés périodiquement. Ces agrégats s'auto-organisent en exerçant des forces de traction à l'intérieur de la matrice extra-cellulaire. Ces agrégats poussent les cellules épithéliales adjacentes. Cette pression provoque dans les cellules épithéliales la translocation de la β -caténine dans le noyau. Ainsi par cette translocation, les cellules épithéliales situées au dessus des amas de cellules mésenchymateuses expriment des gènes de follicules précoces de plume.

Ensuite, les auteurs ont évalué l'influence de la rigidité du substrat sur la formation des follicules. Pour ce faire, des explants de peau sont cultivés sur des gels de polyacrylamide couverts de fibronectine. Les auteurs font varier la rigidité du gel et observent que l'espacement et la taille des agrégats changent avec la rigidité. La diminution de la rigidité réduit l'espacement, mais augmente la taille des agrégats

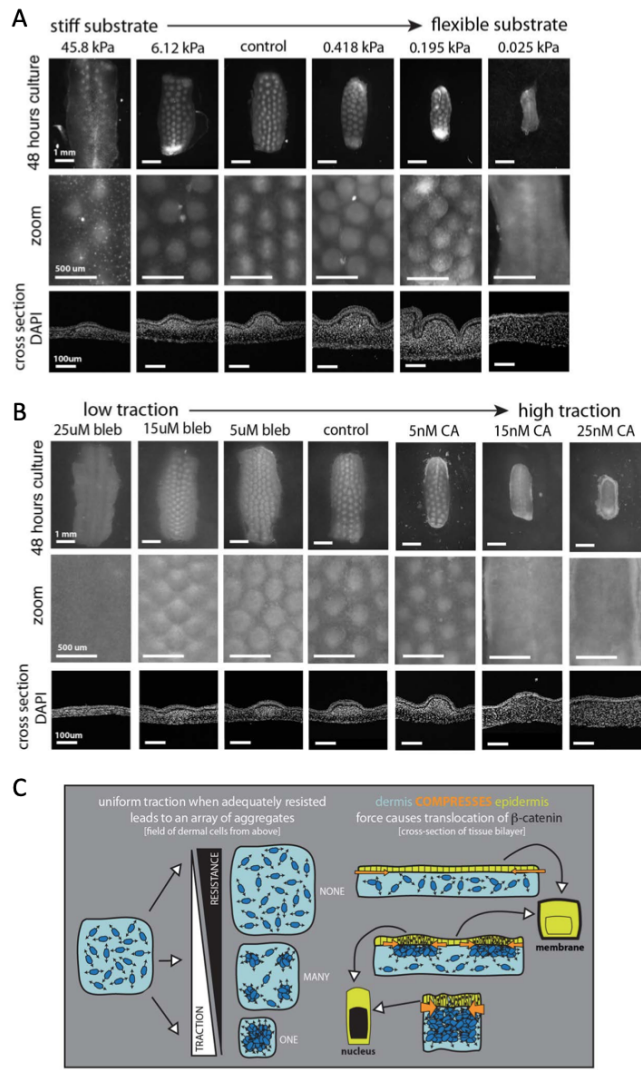


FIGURE I.3 – Formation des follicules de plume par auto-organisation

(A) Influence de la rigidité du substrat dans l'auto-organisation. La surface de l'échantillon de peau diminue avec la rigidité. Ensuite, le nombre de follicules diminue si l'on s'éloigne de la rigidité physiologique. Enfin, leur taille augmente avec la diminution de la rigidité tandis que la distance entre les follicules diminue avec la rigidité. (B) Influence de la contractilité cellulaire dans l'auto-organisation. Plus on augmente la contractilité cellulaire plus l'échantillon de peau diminue. En outre, plus on inhibe ou augmente la contractilité cellulaire moins on observe de follicules se former. Enfin, plus on augmente la contractilité, plus les follicules sont petits et éloignés. (C) Schéma du modèle : les cellules contractiles du derme forment des agrégats si elles sont exposées à une résistance suffisante et si elles sont capables d'exercer une traction physiologique. Adapté de [143]

(fig I.3). Par ailleurs, les auteurs mesurent l'impact des forces de traction exercées par les cellules sur le substrat dans la formation des follicules. Pour cela, la contractilité cellulaire est augmentée ou diminuée (à l'aide de calyculine A et de blebbistatine respectivement). Les auteurs notent qu'une très grande diminution, tout comme une très grande augmentation, de la contractilité inhibe la formation des follicules. De plus, la perturbation de la contractilité mène à une modification de la taille et de l'espacement des follicules (fig I.3).

En conclusion, les auteurs suggèrent que les cellules mésenchymateuses du derme forment des agrégats agencés de façon périodique. Ces agrégats compressent les cellules de l'épiderme adjacentes. Ces forces compressives représentent une informations qui va influencer le destin des cellules épithéliales. Elles vont en effet sous l'influence des forces de compression se diriger vers une voie de différenciation de follicule de plume (fig I.3). Cette étude montre que des instabilités mécaniques peuvent être à l'origine de l'auto-organisation des cellules et la morphogenèse des tissus.

I.1.3 L'environnement mécanique influence la morphogenèse

Nous avons vu plus haut que les cellules peuvent utiliser la transmission de l'information par des moyens mécaniques pour s'auto-organiser. Nous allons donc voir maintenant comment les paramètres mécaniques de l'environnement peuvent diriger la différenciation des cellules souches.

I.1.3.1 Les contraintes géométriques dirigent l'organisation des cellules souches embryonnaires

Ces dernières années, de nombreuses techniques ont été développées afin de contraindre de façon géométrique les monocouches cellulaires. Une des méthodes uti-

lisées est d'imprimer des protéines selon les motifs désirés à la surface d'un substrat de culture. Ainsi les cellules adhèrent uniquement dans les zones voulues et adoptent les formes souhaitées [161]. Ces outils ont permis de mettre en évidence l'effet des contraintes géométriques sur le comportement collectif des cellules, comme la prolifération ou la migration.

Il a par exemple été montré que les contraintes géométriques influencent des comportements collectifs de migration cellulaire. Par exemple, K. Doxzen et collègues confinent des cellules épithéliales (MDCK) dans des disques de différentes tailles et observent que toute la population cellulaire a un mouvement de rotation dans le même sens uniquement sur des îlots ayant au maximum un diamètre de 200 μm [33]. Pour des îlots cellulaires supérieur à 200 μm , l'ensemble des cellules de l'îlot ne vont pas synchroniser leur mouvement. On verra des mouvements cellulaires coordonnés uniquement dans des sous-parties de l'îlot.

De la même manière, il a été montré que la contrainte mécanique se répartit dans un îlot cellulaire différemment selon les contraintes géométriques appliquées à celui-ci. C. M. Nelson et collègues utilisent des cellules endothéliales (des cellules endothéliales d'artère pulmonaire de bovin) et des cellules épithéliales (des cellules épithéliales de rein de rat). Les auteurs montrent par modélisation qu'en contraignant géométriquement ces cellules, on obtient une répartition inhomogène de la contrainte [109]. Les zones de plus grande contrainte sont aussi des zones de plus grande prolifération cellulaire. De plus, lorsque les auteurs perturbent la contractilité cellulaire (avec de la blebbistatine) ou l'adhésion intercellulaire cellulaire (par les cadhérines), les motifs de prolifération disparaissent.

Ces observations concernant l'effet de la répartition de la contrainte sur le comportement collectif des cellules ont amené plusieurs équipes de recherche à examiner

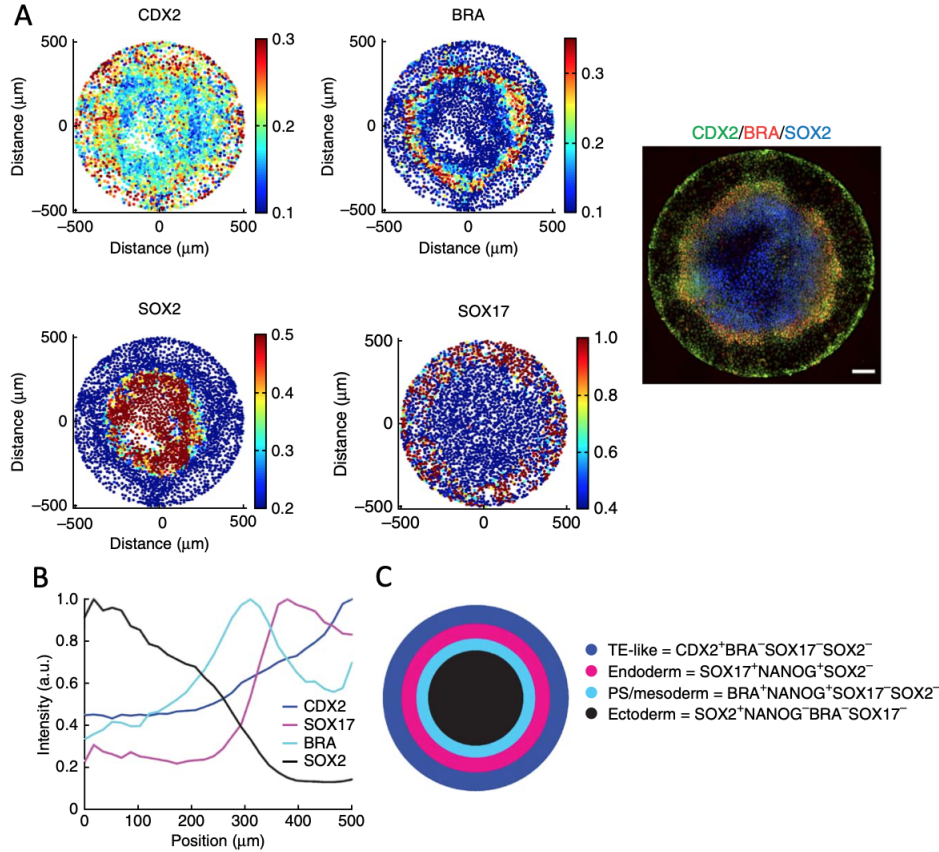


FIGURE I.4 – Différenciation des cellules souches embryonnaires humaines contraintes géométriquement

(A) Niveau de fluorescence des marqueurs de différenciation. (B) Quantification des niveaux de fluorescence. (C) Schéma de répartition des feuillets embryonnaires. Barre d'échelle : $100 \mu\text{m}$. Adapté de [169]

plus particulièrement l'effet sur la différenciation des cellules souches [175, 129]. Par exemple, B. Sorre et collègues étudient l'influence du confinement de cellules souches embryonnaires humaines [169]. Les auteurs confinent donc les cellules sur des micro-motifs de tailles différentes recouverts de protéines adhérentes (de la laminine-521 ou du Matrigel). Les auteurs montrent que la forme en disque avec l'ajout de la protéine morphogénétique osseuse 4 (ou BMP4) suffit à induire la formation et la disposition

de feuillet embryonnaires. Les auteurs observent la formation d'un anneau extérieur de trophectoderme, un disque d'ectoderme au centre et un anneau de mesendoderme entre les deux feuillet (fig I.4). Cependant, une étude récente montre que les récepteurs de la protéine BMP dans les cellules souches embryonnaires humaines ne sont pas répartis de façon homogène sur l'axe apico-basal des membranes [186]. En effet, les auteurs expliquent que les récepteurs à la protéine BMP se trouvent en dessous des jonction serrées. Or les jonction serrées sont des complexes d'adhérence qui contrôlent la perméabilité entre les cellules. On les trouve dans les cellules épithéliales et endothéliales [188]. Dans ce cas-ci, la répartition des feuillet embryonnaire est très certainement liée à un accès différencié à la BMP par leurs récepteurs en fonction de la localisation des cellules : si elles se trouvent au bord ou non de l'îlot cellulaire.

Une autre étude s'est penchée sur l'effet de la géométrie sur la différenciation de cellules souches humaines pluripotentes induites. Q. Smith et collègues déposent ces cellules sur des substrats présentant différents motifs d'adhésion (des disques, des triangles et des étoiles de tailles variables). Ils montrent que lorsque les cellules sont déposées sur ces motifs, une couche de cellules Brachyury-positives se forme en périphérie (fig I.5). Les cellules Brachyury-positives sont des cellules qui vont suivre une voie de différenciation vers des cellules endothéliales. Les auteurs montrent dans ce cas-là que la réduction de la tension du cytosquelette va perturber cette auto-organisation. Les auteurs expliquent qu'une tension élevée à des temps précoces amène les cellules vers la voie de différenciation endothéliale [144]. Ils démontrent dans ce cas-là que la différenciation dirigée par une géométrie contrôlée n'est pas due à des espèces chimiques solubles mais bien à l'effet de la tension engendrée par l'activité du cytosquelette.

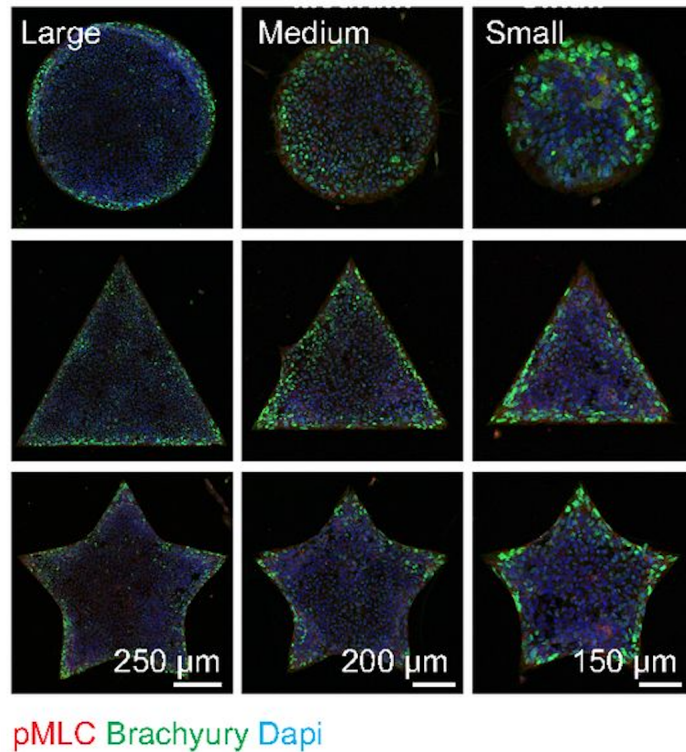


FIGURE I.5 – Différenciation des cellules souches humaines pluripotentes induites contraintes géométriquement

Après 48h de culture sur des motifs de taille et de forme différentes, les cellules souches humaines pluripotentes induites s'auto-organisent. Les cellules Brachyury positives se positionnent en périphérie des îlots cellulaires, indépendamment des signaux chimiques.

Adapté de [144]

En conclusion, les contraintes géométriques ont un effet sur le comportement collectif des cellules. Cependant, il faut comprendre que ces effets sont reçus par les cellules à plusieurs niveaux, par exemple une certaine répartition de la contrainte et/ou un accès inhomogène à des ligands. Tous ces effets vont participer à une organisation et une différenciation de cellules souches dirigées par la géométrie de l'îlot cellulaire.

I.1.3.2 L'élasticité du substrat dirige la différenciation des cellules souches mésenchymateuses

Nous avons vu dans la section précédente que la contrainte géométrique répartit de façon inhomogène la tensions au sein des îlots de cellules souches humaines pluri-potentes induites. La tension élevée à des temps précoces dirige le destin cellulaire. Cependant les cellules dans l'organisme sont exposées à différents environnements mécaniques et la contrainte géométrique n'est qu'un seul des paramètres de cet environnement. En effet, un autre paramètre mécanique de l'environnement cellulaire qui peut être étudié est la rigidité du substrat sur lequel elles sont accrochées.

Le travail de A.J. Engler et collègues traite de l'influence de la rigidité sur des cellules souches mésenchymateuses isolées [43]. Dans cette étude, des cellules souches mésenchymateuses sont cultivées sur des gels de polyacrylamide couverts de collagène I. Le collagène I permet l'adhésion des cellules sur les gels. Les auteurs utilisent des gels de polyacrylamide car ce sont des hydrogels dont la rigidité est modifiable en ajustant la concentration d'agent réticulant (le bis-acrylamide) [115]. Les cellules sont toutes cultivées dans le même milieu. Les auteurs observent que la seule modification de la rigidité du substrat amène les cellules vers des voies de différenciation distinctes. Ainsi les cellules souches mésenchymateuses cultivées sur des substrats mous (entre 0,1 et 1 kPa) vont présenter des caractéristiques de neurones, tandis que les cellules mésenchymateuses cultivées sur des substrats rigides (ici entre 25 et 40 kPa) vont présenter des caractéristiques d'ostéoblastes (fig I.6). Par ailleurs, ces rigidités correspondent à l'ordre de grandeur des modules élastiques mesurés dans les tissus correspondants aux voies de différenciation des cellules. Le cerveau a une rigidité d'environ 1 kPa, alors que la matrice collagénique des os a une rigidité d'environ 100 kPa. De plus, les auteurs montrent que le fait d'inhiber la contractilité cellulaire

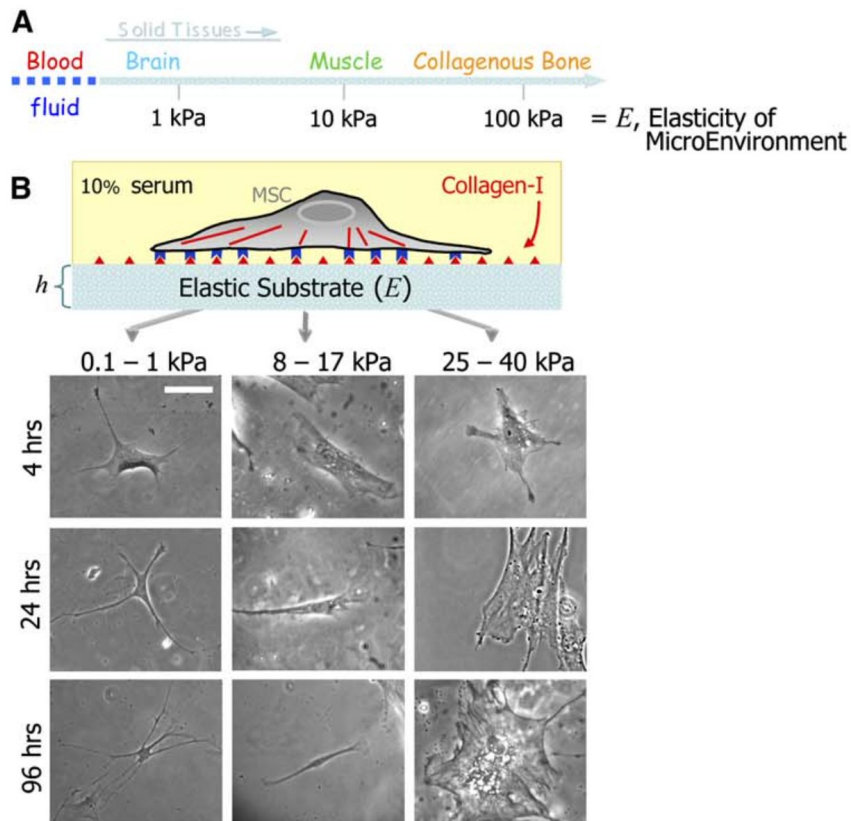


FIGURE I.6 – Élasticité des tissus et différenciation des cellules souches mésenchymateuses

(A) Élasticité mesurée de l’environnement cellulaire. (B) Les cellules souches mésenchymateuses cultivées sur des substrats de rigidités différentes présentent des caractéristiques de cellules différenciées distinctes selon la rigidité. Barre d’échelle : 20 μm . Adapté de [43]

avec de la blebbistatine bloque la différenciation.

En conclusion, les propriétés mécaniques de l’environnement cellulaire, en particulier la rigidité du substrat, influencent le destin cellulaire.

I.1.3.3 Le temps de relaxation du substrat joue aussi un rôle dans la différenciation cellulaire

Nous avons vu plus haut que la variation de l'élasticité du substrat pouvait avoir un effet sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Néanmoins les tissus vivants ne se comportent pas comme des objets purement élastiques. En effet, certains tissus mettent du temps à retrouver leur forme initiale après une déformation. On le voit de manière macroscopique sur la peau ou les tissus adipeux par exemple : après déformation, la peau va retrouver sa forme initiale au bout d'un certain temps, pas de manière immédiate. De la même manière, lorsque les tendons sont étirés lentement, ils ont la capacité à s'allonger puis retrouvent leur taille et forme d'origine. En revanche, lorsque ceux-ci sont étirés rapidement, ils se rigidifient sous la contrainte et peuvent se sectionner [166]. Les tissus vivants ne sont donc pas des objets purement élastiques. Les cellules sont immergées dans un environnement viscoélastique dont elles vont pouvoir sentir les propriétés et adapter leur comportement.

Ainsi des études se sont penchées sur l'influence de la réponse visqueuse, et non seulement la réponse élastique de l'environnement, sur le comportement cellulaire et plus particulièrement sur la différenciation des cellules. Notamment, O. Chaudhuri et collègues se sont intéressés à l'influence de la variation du temps de relaxation des hydrogels, sans modifier la part élastique des gels, sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses [20]. Pour ce faire, les auteurs utilisent un gel d'alginate qui leur permet de découpler la viscosité du module élastique. Les auteurs montrent qu'en diminuant le poids moléculaire de l'alginate et en augmentant l'espacement stérique par l'ajout de polyéthylène glycol, ils peuvent modifier le temps de relaxation du gel sans changer son élasticité (fig I.7). Par la suite, les auteurs cultivent des cellules souches mésenchymateuses insérées dans ces gels. Les auteurs notent d'une

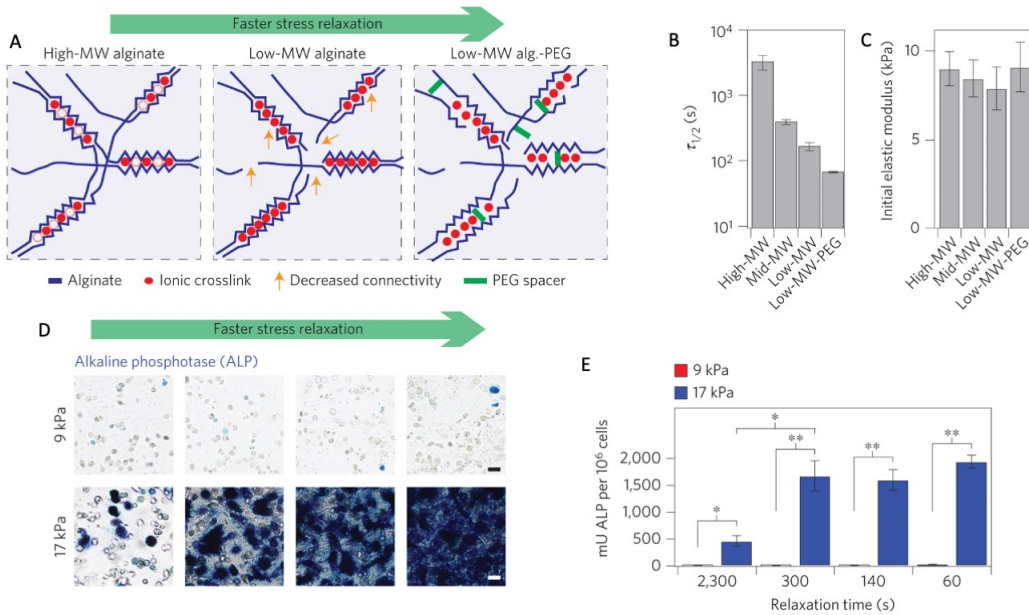


FIGURE I.7 – Influence de la variation viscoélastique de l’environnement dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses

(A) Méthode de modification du temps de relaxation des gels d’alginate. (B) $\tau_{1/2}$ temps pour lequel la contrainte est relâchée de moitié. (C) Le module élastique mesuré initialement ne change pas significativement avec la diminution de $\tau_{1/2}$. (D) Images représentatives de cryosections contenant un marquage alcaline phosphatase (en bleu). L’alkaline phosphatase est un marqueur précoce de la différenciation ostéogénique. (E) Quantification de l’activité d’alkaline phosphatase dans des lysat de cellules cultivées dans des gels de d’alginate. Adapté de [20]

part que la diminution du temps de relaxation provoque l’étalement et le prolifération cellulaire. D’autre part, les auteurs observent qu’une relaxation plus rapide du gel engendre une différenciation ostéogénique (fig I.7).

En conclusion, les cellules se trouvent dans un environnement dont les propriétés mécaniques varient. Nous avons vu dans cette partie que la modification de ces propriétés a un effet sur le comportement des cellules, et en particulier sur la différenciation des cellules souches. Les cellules sont donc capables de détecter les propriétés

mécaniques du substrat. De plus, elles peuvent se transmettre des informations afin de s'organiser collectivement en fonction des caractéristiques mécaniques détectées. Ainsi nous verrons par la suite comment les cellules sont sensibles aux propriétés mécaniques de leur environnement et par quels moyens ces informations sont transmises entre les cellules.

I.1.4 Détection et transmission des signaux mécaniques de l'environnement

Nous avons vu plus haut que les cellules pouvaient sentir des variations mécaniques de l'environnement. De plus, les études exposées montrent que l'inhibition de la contractilité cellulaire, en particulier de la myosine II, amenait à une perte de la détection des propriétés mécaniques de l'environnement. Nous verrons donc dans cette partie quelles sont les protéines mises en jeu dans la détection mécanique de l'environnement, comment cette détection se produit et comment ces informations sont transmises d'une cellule à l'autre.

I.1.4.1 Les adhésions focales : senseurs des propriétés mécaniques du substrat

Les cellules peuvent adhérer au substrat de deux manières : via les adhésions focales ou via les hémidesmosomes. Les hémidesmosomes font le lien entre la matrice extra-cellulaire et les filaments intermédiaires, tandis que les adhésions focales lient la matrice extra-cellulaire au cytosquelette d'acto-myosine. L'adhésion focale est le type d'adhésion le mieux décrit dans la littérature. De plus, elles sont connues pour être un des sièges de la perception mécanique du substrat par les cellules [130]. Nous nous concentrerons donc dans cette partie sur les adhésions focales.

Les intégrines sont les protéines centrales des adhésions focales. Ces protéines trans-

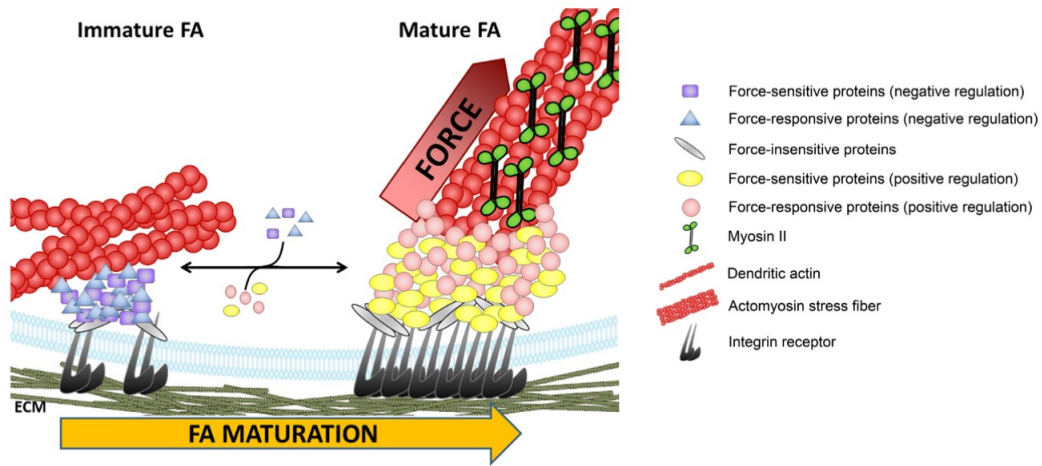


FIGURE I.8 – Schéma de maturation des adhésions focales

Les adhésions focales sous tension traversent un processus de maturation. Les adhésions grossissent au cours du temps. Les protéines à l'intérieur des adhésomes subissent des réarrangements, des réorganisations et des changements de conformations. D'autres protéines vont être recrutées, dont l'actine. L'augmentation de la présence d'actine augmente la tension exercée sur l'adhésion focale. A l'inverse, la diminution de tension entraîne une diminution de taille de l'adhésion. Adapté de [86]

membranaires sont des hétérodimères composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Chez les mammifères, on compte 24 hétérodimères différents, composés de 18 sous unités α et 8 sous-unités β . Les divers assemblages possibles des deux sous-unités permettent aux intégrines de reconnaître les différents composés de la matrice extra-cellulaire [73, 5, 72]. Cette grande diversité d'hétérodimères permet de reconnaître entre autres les différents isoformes de fibronectine, de collagène ou de laminine [72]. Ainsi les intégrines vont interagir dans leur partie extra-celulaire avec des protéines du substrat et dans leur partie intra-cellulaire avec un ensemble de protéines elles-mêmes connectées au cytosquelette d'actine. L'ensemble des molécules impli-

quées dans la structure et l'activité de signalisation des adhésions focales est appelé adhésome d'intégrine [172]. L'adhésome est un ensemble moléculaire complexe et on estime à 180 le nombre de molécules impliquées dans les adhésions focales [184, 183]. Les adhésions focales se forment avec la liaison à leur ligand [68]. Ensuite les adhésions focales s'agrandissent. Ce processus s'appelle le processus de maturation [69]. A la suite ce processus, les adhésions focales vont soit se stabiliser, soit commencer à se défaire [86]. Les divers états de maturation correspondent à des tailles différentes des adhésions ainsi que des compositions et conformations protéiques différentes. Ces différents états sont déterminés par des forces mécaniques locales [139, 87]. Ainsi, certaines protéines des adhésions subissent des réarrangements dans leur structure ou bien des modifications enzymatiques en réponse à une force mécanique. Ces changements de conformation modifient les affinités protéiques à l'intérieur des adhésions focales (fig I.8). Par exemple, la taline joue le rôle de senseur "gradué" des forces. En effet, lorsque la taline est sous tension, elle va changer de conformation et exposer des sites de liaison à la vinculine. Plus la tension est forte, plus la taline se dépie et plus il y a de sites exposés à la vinculine [127, 70, 100, 179, 178]. La vinculine quant à elle permet le recrutement de l'actine aux adhésions focales. Une fois l'actine recrutée, la tension augmente davantage.

A la suite de ces observations, A. Elosegui-Artola et collègues proposent un modèle d'embrayage pour expliquer la réponse des cellules à une augmentation de la rigidité du substrat [41]. Au départ, il existe un flux rétrograde de l'actine polymérisée. Les filaments sont tirés par un nombre n_m de moteurs de myosine qui exercent chacun une force F_m . Si l'actine polymérisée n'est pas liée aux adhésions focales, elle possède une vitesse v_a . Cette vitesse correspond à la vitesse d'un moteur de myosine sans charge. Le filament d'actine peut être embrayé sur le complexe intégrine-taline (modélisé par une constante de raideur k_c) et se lier à un nombre de molécules de fibronectine

n_f . La fibronectine est elle-même liée au substrat (modélisé par une constante de raideur k_{sub}). Cette constante de raideur k_{sub} représente la rigidité du substrat.

A chaque pas de temps, la simulation calcule les différentes constantes de liaison et temps de liaison entre les sous-parties du modèle. Ainsi, au niveau du substrat, Le fibronectine peut s'attacher aux intégrines avec le taux de liaison suivant :

$$k_{on} = k_{ont} \cdot d_{int}$$

où k_{ont} est le taux de liaison "réelle" et d_{int} la densité d'intégrine.

De la même manière, les intégrines peuvent se détacher du substrat avec un taux de détachement k_{off} qui dépend de la force exercée dessus, suivant un modèle de "catch bound". Plus la force exercée est élevée, plus k_{off} est élevée. A la fin de chaque pas de temps de la simulation, l'actine progresse vers l'intérieur de la cellule et tire sur les intégrines fixées au substrat. Elle exerce ainsi une force sur chaque intégrine et sur le substrat. La force totale F exercée sur le substrat est calculée en tenant en compte de l'équilibre des forces. Et de la vitesse de l'actine est recalculée.

La vitesse de l'actine recalculée dépend linéairement de la force appliquée sur le substrat. Elle est comprise entre v_a , la vitesse de l'actine sans lien avec les adhésions focales comme expliquée plus haut, et 0. La vitesse de l'actine est égale à 0 lorsque la force maximale est atteinte, soit :

$$F = n_m \cdot F_m$$

où n_m est le nombre de moteurs de myosine qui exercent chacun une force F_m .

La simulation commence alors un nouveau cycle de détachement.

Dans ce modèle est ajouté un nouvel élément : le dépliement et le repliement de la taline. Pour chaque pas de temps et pour chaque complexe intégrine-taline, les

talines peuvent se détacher de la vinculine avec un taux k_{offt} et se déplient selon un taux k_{unft} . k_{offt} est calculé selon la force f appliquée sur la taline et suit un modèle de "catch bound". De la même manière que pour la détachement des intégrines, k_{offt} augmente avec l'augmentation de f . k_{unft} est calculé selon la force f appliquée sur la taline et suit un modèle de "slip bound". Plus la force exercée sur la taline est élevée, plus k_{unft} est élevé.

Ensuite, les temps de dépliement t_{unft} et de détachement t_{offt} sont calculés aléatoirement selon k_{unft} et k_{offt} respectivement. Ainsi si $t_{unft} < t_{offt}$, la taline se déplie et peut soit s'attacher à la vinculine avec un taux k_{vin} , soit elle se replie selon un taux k_{foldt} . k_{foldt} est calculé avec les données recueillies. Si la vinculine s'attache, alors la densité d'intégrine d_{in} augmente (fig I.9). Au contraire, si le temps de détachement des intégrines est inférieur au temps de dépliement de la taline, $t_{unft} > t_{offi}$, la densité d'intégrine d_{in} diminue. Dans ce cas-là, les intégrines se détachent avant que la taline ne se déplie. De la même manière, si le temps de détachement des vinculines est inférieur au temps de dépliement de la taline, $t_{unft} > t_{offv}$, la densité d'intégrine d_{in} diminue aussi. Dans ce cas-ci la taline se replie avant que la vinculine n'ait pu s'attacher. On voit alors que la taille des adhésions focales diminue avec la force exercée sur celles-ci.

En conclusion, les adhésions focales sont un des lieux de la perception de l'environnement mécanique par les cellules. Elles font le lien entre le cytosquelette d'actomyosine et la matrice extra-cellulaire. Nous verrons dans la partie suivante les lieux de la transmission intercellulaire des informations mécaniques.

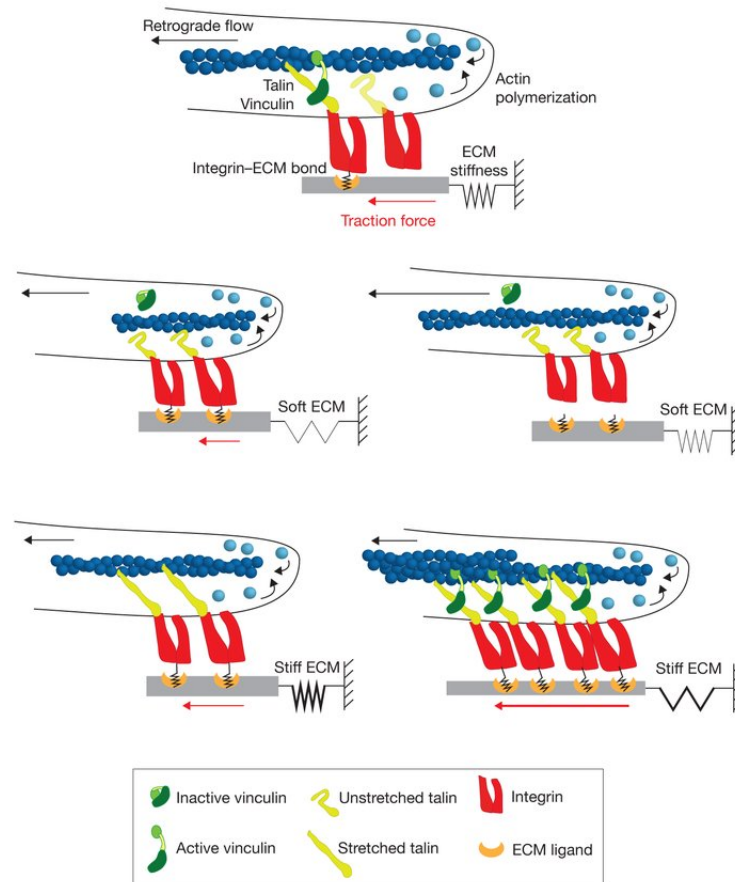


FIGURE I.9 – Schéma du modèle d’embrayage

Le flux rétrograde d’actine embraye les intégrines. Si le substrat est mou, le temps de liaison des intégrines au substrat est plus court que le temps de transmission de la force à la taline. L’information n’est pas transmise à la taline. Elle ne change pas de conformation pas et ne recrute pas la vinculine. En revanche, si le substrat est plus dur, le temps de transmission de l’information de l’intégrine à la taline est plus court que le temps de liaison des intégrines au substrat. L’information peut être transmise à la taline. La taline change de conformation et recrute la vinculine qui elle-même recrute l’actine. L’adhésion est renforcée et entre dans un processus de maturation. Adapté de [151]

I.1.4.2 Les cellules peuvent se transmettre les informations mécaniques via les jonctions adhérentes

Dans les épithéliums, la cohésion du tissu est assurée par des complexes protéiques que l'on appelle des jonctions inter-cellulaires. Il existe trois types de jonctions intercellulaires : les jonctions gaps, les jonctions serrées et les jonctions d'ancrages qui comprennent les desmosomes et les jonctions adhérentes. Les jonctions d'ancrage ainsi que les jonctions serrées sont les jonctions confèrent à l'épithélium la plus grande partie de sa résistance et sa stabilité mécanique. Les jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires : les claudines, occludines. Le domaine cytoplasmique de ces protéines est liée au cytosquelette d'acto-myosine via les protéines ZO (Zonula occludens). ZO-1 peut subir des changements de conformation selon la force exercée sur celle-ci [3]. dans les jonctions d'ancrage, les desmosomes sont liés à l'intérieur de la cellule aux filaments intermédiaires, tandis que les jonctions adhérentes se lient au cytosquelette d'actine. Les jonctions adhérentes sont mieux décrites et connues pour jouer un rôle majeur dans la transmission des forces entre les cellules. Nous nous concentrerons donc dans cette partie sur les jonctions adhérentes.

Les cadhérines sont des protéines transmembranaires, calcium dépendantes, qui jouent un rôle central dans les jonctions adhérentes. Les jonctions adhérentes se forment à partir de l'interaction homophile entre les cadhérines, en présence de calcium [60]. Il existe deux types d'interactions entre les cadhérines : les interactions cis (entre les cadhérines d'une même cellule) et les interactions trans (entre les cadhérines de cellules adjacentes) [42, 16]. On observe différents types de cadhérines que l'on retrouve en quantités différentes selon les types cellulaires, notamment la E-cadhérine, la P-cadhérine, la N-cadhérine, etc. Au cours du développement, on observe aussi une expression différenciée des cadhérines dans l'espace et le temps [153]. Dans les cellules

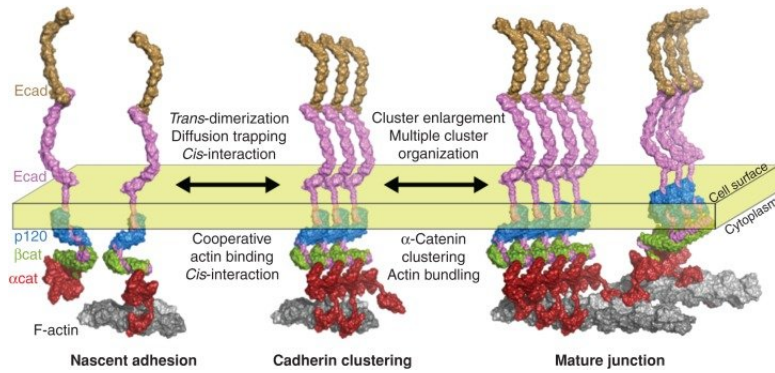


FIGURE I.10 – Schéma du processus de maturation de la E-cadhérine

Lorsque le contact est initié, d'autres E-cadhérines diffusent et sont piégées dans la zone de contact. On voit alors des amas de E-cadhérines se former. Le processus de maturation est influencé par les forces mécaniques exercées sur les jonctions. Adapté de [103].

épithéliales, on retrouve très majoritairement de la E-cadhérine.

Avant le contact inter-cellulaire, on trouve des cadhérines diffusives réparties à la surface des cellules. Une fois le contact initié entre des cellules voisines, les cadhérines diffusent et viennent se piéger dans la zone de contact [1]. De la même manière que les adhésions focales, les jonctions adhérentes vont croître pendant le processus de maturation et former des oligomères de E-cadhérines (fig I.10). Néanmoins, autour de ces amas se forme un réseau d'actine qui les empêche de fusionner [173]. La maturation des jonctions adhérentes se traduit aussi par une réorganisation des protéines liées aux cadhérines à l'intérieur de la cellule. La β -caténine va elle-même recruter l' α -caténine [63, 11]. Or l' α -caténine possède deux conformations différentes : une ouverte et une fermée. Cette conformation dépend de la force appliquée sur la protéine. Ainsi, si la force est supérieure à 5 pN, l' α -caténine sera en conformation ouverte, sinon elle restera fermée. Tout comme la taline, lorsque l' α -caténine se trouve en conformation ouverte, elle va se lier à la vinculine [17, 177]. La vinculine peut stabiliser les jonctions en recrutant ensuite des filaments d'actine qui augmenteront la

tension à la jonction (fig I.11) [181]. De la même manière que pour les adhésions focales, la vinculine peut être un marqueur de l'intensité de la tension exercée sur les jonctions adhérentes.

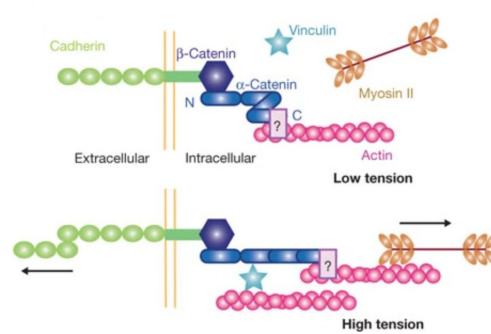


FIGURE I.11 – Schéma du processus de liaison de la vinculine à l'α-caténine

Lorsque la tension exercée sur l'α-caténine est assez forte, la protéine s'ouvre. En conformation ouverte, l'α-caténine recrute la vinculine. Le recrutement de la vinculine entraîne le recrutement de l'actine et augmente ainsi la tension à la jonction. Adapté de [181].

En conclusion, par la mécanotransduction, les cellules peuvent détecter les caractéristiques mécaniques de leur environnement. De plus, elles peuvent aussi transmettre et recevoir des informations d'ordre mécanique aux cellules adjacentes. Ces informations sont médiées entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule par les jonctions adhérentes et les adhésions focales. Les adhésions focales et les jonctions adhérentes font le lien entre l'environnement cellulaire et le cytosquelette d'acto-myosine. Nous verrons dans la partie suivante comment le cytosquelette d'acto-myosine répond aux stimulations mécaniques.

I.1.4.3 Le cytosquelette d'acto-myosine répond aux propriétés mécaniques de l'environnement

Nous avons vu dans les sections précédentes que les adhésions focales et les jonctions adhérentes sont solidement liées au cytosquelette d'actine. Nous allons donc maintenant voir comment le cytosquelette peut recevoir ou transmettre des forces via les jonctions adhérentes et/ou les adhésions focales.

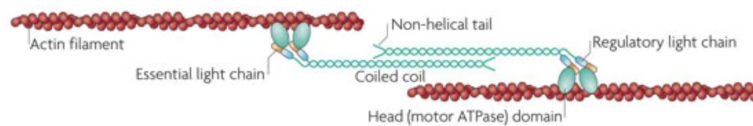


FIGURE I.12 – Schéma de liaison de la myosine à l'actine-F
Adapté de [114].

Le cytosquelette est composé d'actine-F (fibrillaire) qui peut adopter des comportements différents selon les protéines auxquelles elle est associée. L'actine-F est un filament polarisé issu de la polymérisation d'actine globulaire (actine-G). Ces filaments peuvent se regrouper et former diverses structures : des réseaux d'actine branchée, des réseaux d'actine réticulée ou bien des faisceaux d'actine. Ces multiples architectures peuvent être envisagées comme une série d'éléments mécaniques (composés de ressorts et d'amortisseurs) qui vont guider les changements de forme des cellules et leur motilité [14]. On trouve sur ces filaments d'actine des moteurs moléculaires : les myosines. Elles peuvent se lier et se déplacer sur les filaments d'actine. Il existe 25 classes différentes de myosines, la myosine II non-musculaire est celle qui contribue le plus à la contractilité cellulaire chez les mammifères. La myosine II est composée de deux chaînes lourdes, deux chaînes essentielles légères et deux chaînes de régulation [163]. La tête de myosine se lie à l'actine. L'hydrolyse de l'ATP permet à la molécule de changer de conformation pour se déplacer sur le long de l'actine.

L'autre extrémité de la myosine, la chaîne lourde, se lie à d'autres myosines. La myosine II ne peut se déplacer que vers le pôle (+) de l'actine-F. Lorsque les myosines sont liées entre elles par leur chaîne lourde, elles peuvent se déplacer le long de filaments d'actine de polarités opposées. Ce faisant, elles vont les faire glisser et générer des forces contractiles au sein de la cellule (fig I.12). Ainsi, à l'aide de ces moteurs moléculaires et de l'organisation de l'actine, le cytosquelette est capable d'exercer des forces sur les adhésions focales et/ou les jonctions adhérentes.

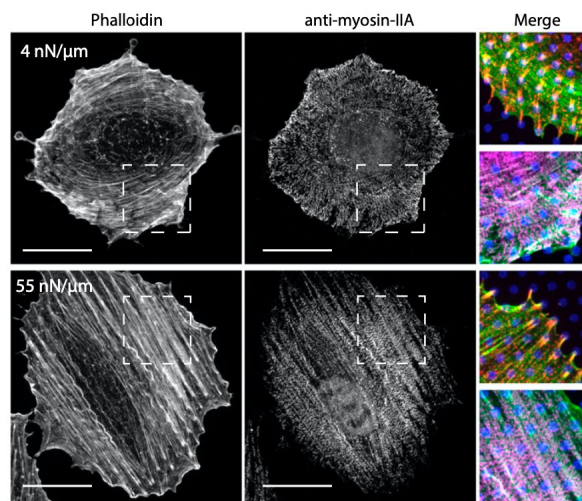


FIGURE I.13 – Image de l'organisation de l'actine et de la myosine dans des fibroblastes cultivés sur des substrats mous et durs

En bleu la fibronectine, en vert la phalloïdine, en magenta la myosine II A, enfin en rouge l' α -actinine 4. Barre d'échelle : 20 μ m.

Lorsque les cellules sont sur des substrats plus rigides, leurs fibres de stress s'alignent.
Adapté de [157]

En outre, le cytosquelette est capable de recevoir, répondre et se réorganiser en fonction des forces transmises par les jonctions adhérentes et/ou les adhésions focales. Il a été par exemple montré que les fibres de stress s'alignent avec l'augmentation de la rigidité du substrat (fig I.13) [157, 64, 180]. J. Solon et collègues montrent aussi dans une étude sur des fibroblastes isolés que le cytosquelette se réarrange selon la

rigidité ressentie et modifie les propriétés mécaniques des cellules. En mesurant avec un indenteur la rigidité des cellules, les auteurs montrent que le module élastique des cellules correspond environ à celui du substrat pour des substrats en dessous de 20kPa [145].

Par ailleurs, la contractilité du cytosquelette d'acto-myosine peut induire la différenciation des cellules via la lamine A et les protéines YAP/TAZ (par la voie de signalisation Hippo) [152]. En présence d'un substrat rigide, le cytosquelette associé aux adhésions focales s'organise autour du noyau et exerce des forces sur celui-ci. Le cytosquelette aplatit le noyau et étire les pores nucléaires. Cette déformation des pores nucléaires permet l'entrée de YAP dans le noyau [36, 40]. En revanche, sur des substrats mous, la force transmise par le cytosquelette sur le noyau est plus faible. Les pores nucléaires ne sont pas déformés. Dans ce cas là, YAP reste dans la cytoplasme. YAP est un facteur de transcription connu pour jouer un rôle important dans le contrôle de la croissance cellulaire. On voit ainsi que la transmission de la force ressentie par les cellules et transmise par le cytosquelette jusqu'au noyau peut modifier le comportement cellulaire en faisant entrer dans la noyau ou non des facteurs de transcription.

Une autre étude a aussi montré que les propriétés mécaniques de l'environnement pouvaient modifier la voie de différenciation des cellules en agissant sur la compaction de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) via le cytosquelette d'acto-myosine. Dans cette étude, H.Q. Le et collègues déposent des kératinocytes primaires humains sur une membrane de silicone et déforment celle-ci de 10% à une fréquence de 100 mHz. Les auteurs montrent qu'après 12h de déformation mécanique la transcription des gènes de différenciation est réduite. La contrainte mécanique appliquée va réorganiser le cytosquelette d'acto-myosine à l'extérieur de l'enveloppe nucléaire. On observe

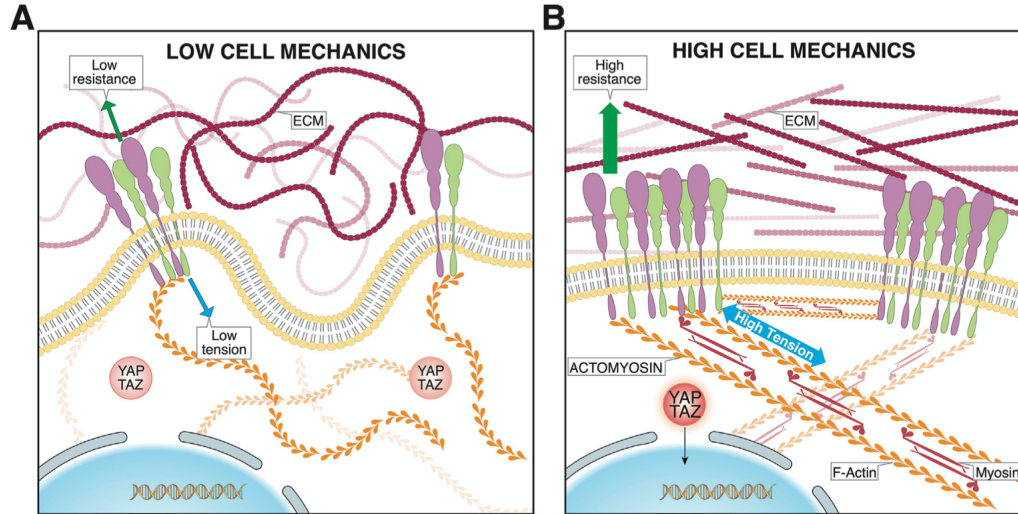


FIGURE I.14 – Localisation de YAP/TAZ en fonction de l’environnement mécanique de la cellule

(A) Comme exposé précédemment, une rigidité faible de la matrice réduit la taille des adhésions focales, la contractilité cellulaire et rend YAP/TAZ inactif. (B) Une rigidité élevée augmente la taille des adhésions focales, la contractilité cellulaire et permet la translocation nucléaire de YAP/TAZ. Adapté de [120]

alors une réduction l’actine G libre et de Emd (émerine) à l’intérieur du noyau. Cette réduction entraîne une augmentation des marques H3K27me3 (sur histone 3) et modifie la compaction de la chromatine. Ce sont en particulier les gènes ciblés par PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*). On y trouve les gènes de différenciation TGM1 (transglutaminase 1) et PPL. Cette réduction peut être bloquée en inhibant la contractilité cellulaire à l’aide de blebbistatine. Les auteurs suggèrent que la déformation des cellules entraîne une réorganisation importante de la chromatine et donc une baisse de l’expression des gènes de différenciation (fig. I.15) [93]. On voit alors que les contraintes mécaniques à travers le cytosquelette d’acto-myosine peuvent avoir une influence sur l’expression des gènes en réorganisant de la chromatine.

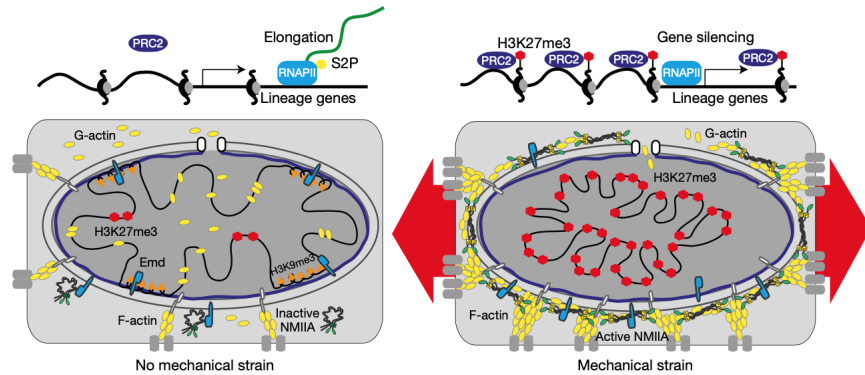


FIGURE I.15 – Schéma du modèle décrivant la régulation de la transcription et de la différenciation des kératinocytes par la déformation mécanique.

L'application d'une déformation mécanique et cyclique va permettre l'enrichissement de Emd et de la myosine IIA non-musculaire à la partie externe de la membrane nucléaire.

La baisse de l'Emd sur la partie interne de la membrane nucléaire conduit à un réarrangement important de la chromatine. L'enrichissement de Emd et de la myosine IIA non-musculaire à la partie externe de la membrane nucléaire engendre aussi la baisse de l'actine G disponible à l'intérieur du noyau. La présence des marques H3k27me3, de la phosphorylation de Ser2 et la baisse de l'actine G vont favoriser le blocage de l'expression des gènes de différenciation. Adapté de [93]

En conclusion, on voit que les jonctions adhérentes ainsi que les adhésions focales sont des complexes dynamiques qui vont mûrir, se stabiliser ou au contraire se défaire au cours du temps. Elles mettent en jeu un nombre important de protéines et sont étroitement liées au cytosquelette d'acto-myosine. Ces complexes vont agir sur le cytosquelette et inversement : les adhésions focales et les jonctions adhérentes transmettent la réponse du substrat ou des cellules adjacentes au cytosquelette, réciproquement, le cytosquelette va exercer une tension sur les adhésions focales et les jonctions adhérentes qui sera transmise au substrat ou aux cellules adjacentes. Toutes ces interactions vont engendrer une réorganisation du cytosquelette d'acto-myosine. De cette réorganisation va découler une réponse de la cellule, par exemple un changement de leur forme, de leur rigidité ou même de l'expression de certains gènes.

I.2 L'épithélium intestinal : un modèle de tissu stéréotypé

Dans la section précédente, nous avons vu que les cellules pouvaient sentir les propriétés mécaniques de leur environnement et transmettre ces informations aux cellules adjacentes. Nous avons aussi constaté que les propriétés mécaniques du substrat, comme la rigidité, influencent le destin des cellules uniques. Cependant beaucoup d'effets mécaniques sur la différenciation cellulaire, en particulier sur des amas multi-cellulaires, restent à déterminer. Afin de creuser ces questions, nous avons décidé de prendre comme tissu modèle l'épithélium intestinal, plus précisément celui de l'intestin grêle. En effet, ce dernier se révèle être un système idéal pour les raisons suivantes : il contient des cellules souches adultes qui se divisent et se différencient très rapidement tout au long de son existence ; il possède une architecture stéréotypée en villus et cryptes ; enfin, beaucoup d'outils ont été développés ces dernières années afin de conserver et cultiver plus aisément des cellules primaires d'épithélium intestinal.

Ainsi dans cette section, nous nous intéresserons tout d'abord aux différentes fonctions que remplit l'épithélium intestinal. Puis, nous présenterons comment l'épithélium intestinal acquiert au cours du développement sa forme compartimentée en villosités et cryptes. Ensuite nous étudierons l'environnement de l'épithélium intestinal. Enfin nous verrons les trois grands phénomènes qui régissent l'homéostasie du tissu : la prolifération dans la crypte, la migration le long de la villosité et l'extrusion au sommet de ces dernières.

I.2.1 L'épithélium intestinal est un tissu à multiples fonctions

L'épithélium intestinal est un tissu qui remplit plusieurs fonctions. Il remplit trois tâches principales : digérer les aliments (avec l'aide des enzymes libérées par le foie et le pancréas), absorber les nutriments de la nourriture provenant de l'estomac et constituer une barrière efficace entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme [9]. La structure de l'épithélium est ajustée à ces fonctions.

En effet, l'intestin grêle est un tube tapissé de villosités, orientées vers la lumière de l'intestin, et de cryptes, enfoncées dans le mésenchyme. Chaque villosité est entourée d'au moins 6 cryptes de Lieberkühn. La conformation de l'épithélium en villosité permet d'augmenter la surface de contact entre les cellules et le contenu de l'intestin, et ainsi augmenter l'absorption des nutriments par les cellules. Les villosités sont très majoritairement recouvertes d'entérocytes. Ces cellules jouent à la fois un rôle d'absorption des nutriments, mais sécrètent aussi des enzymes permettant la dégradation du chyme. Sur les villosités, on trouve aussi des cellules calciformes (Goblet cells sur la figure I.16) qui sécrètent du mucus et des cellules entéroendocrines qui sécrètent des hormones (fig I.16).

De l'autre côté, à l'intérieur des cryptes, on retrouve les cellules souches et les cellules progénitrices qui vont maintenir la population cellulaire (section I.2.4). Les cellules de Paneth sont aussi présentes dans la crypte. Les cellules de Paneth sécrètent des substances anti-microbiennes ainsi qu'une hydrolase, le lysozyme. De plus, la crypte possède une très petite exposition vers la lumière de l'intestin, avec une ouverture de 3 μm environ [98]. Ces deux facteurs contribuent à la protection des cellules de la crypte.

En outre, l'épithélium intestinal abrite d'autres types cellulaires dont la fonction est peu connue : les cellules "cup", les cellules "tuft" et les cellules "microfold"[55].

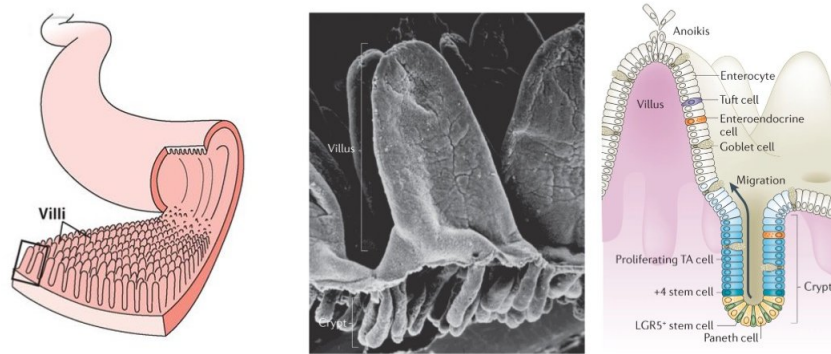


FIGURE I.16 – Schéma de la structure de l'épithélium intestinal

De gauche à droite : schéma de l'intestin en trois dimensions ; image en microscopie électronique d'une villosité ; schéma de la répartition des différents types cellulaires de l'épithélium intestinal. Adapté de [25, 9]

Par ailleurs, l'intestin constitue une des barrières les plus importantes entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme. L'épithélium intestinal laisse entrer dans l'organisme l'eau, les ions essentiels et les nutriments tout en évitant l'entrée de pathogènes [126]. Les molécules, selon leurs propriétés chimiques, peuvent traverser l'épithélium intestinal de trois manières différentes : via des transporteurs à l'intérieur des cellules, par une diffusion passive à travers les membranes ou par une diffusion passive entre les cellules. Pour réguler cette dernière, les cellules sont attachées les unes aux autres dans leur partie apicale par des jonctions serrées. Les jonctions serrées restreignent le passage intercellulaire à des molécules hydrophiles [150, 99, 77]. Elles empêchent ainsi le transport de peptides microbiens, de lipides et de protéines [32, 12]. La détérioration de ces jonctions serrées peut entraîner de nombreux troubles dans l'organisme.

I.2.2 Au cours du développement les villosités et les cryptes se forment successivement

L'épithélium intestinal est un tissu, à la structure très stéréotypée. Il est composé de deux compartiments : les cryptes et les villosités. Nous verrons dans cette partie comment ces deux compartiments se forment au cours du développement.

Pendant le développement, les cryptes et les villosités se forment de façon successive. Dans un premier temps les villosités apparaissent, puis c'est au tour des cryptes de se développer. Chez la souris, la morphogénèse de l'épithélium démarre au 14, 5^{ème} jour après la naissance (et entre la 8^{ème} et la 10^{ème} semaine de gestation chez l'humain) [88]. C'est à ce moment là que l'on observe la protrusion de villosités vers la lumière de l'intestin [146, 165].

En effet, au commencement, l'épithélium intestinal est plat et homogène, constitué entièrement de cellules indifférenciées. Il ne présente ni crypte, ni villosité. De même que la formation des follicules chez le poulet (section I.1.2), l'apparition des villosités est initiée par l'accumulation en amas des cellules mésenchymateuses en dessous de l'épithélium intestinal (fig I.17). Il a été montré que l'inhibition de ces amas cellulaires empêchait la formation des villosités [76, 97, 164]. La diffusion de ligands par les cellules épithéliales favorise la formation de ces amas de cellules mésenchymateuses [76, 97, 82, 164, 53]. Ensuite, l'élévation des villosités par les cellules du mésenchyme déforme l'épithélium initialement plat. La déformation de l'épithélium engendre le confinement des zones de prolifération entre les villosités [26, 142]. La hauteur des villosités va continuer d'augmenter grâce à la prolifération cellulaire entre celles-ci. Par la suite de nouveaux amas de cellules mésenchymateuses se forment sous l'épithélium et font apparaître de nouvelles villosités [164, 165]. Puis, les cellules mésenchymateuses produisent un gradient de BMP qui favorise la différenciation des cellules du haut vers le bas de la villosité [66, 26].

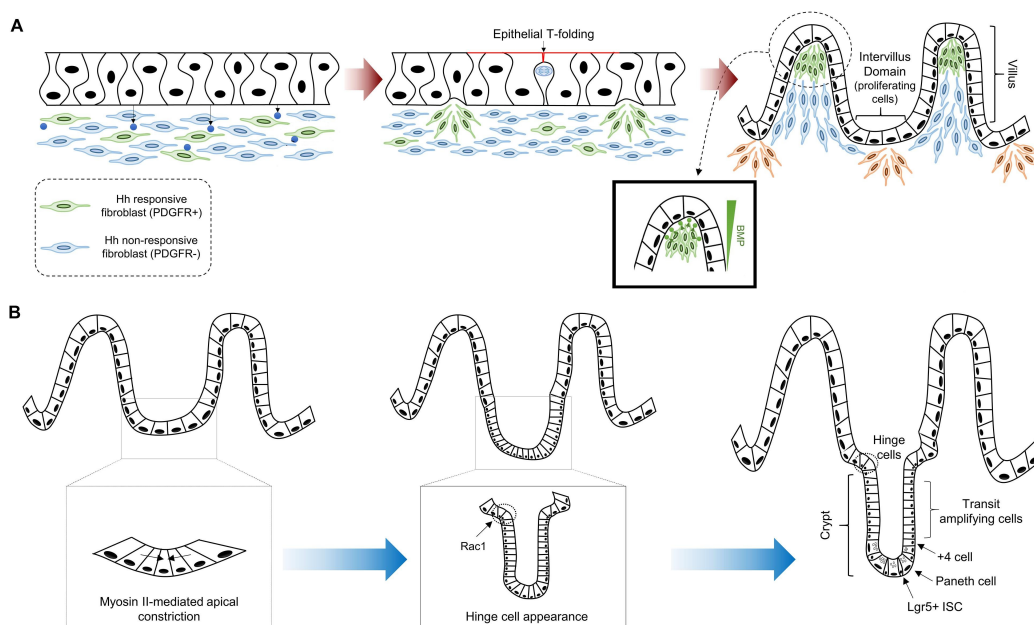


FIGURE I.17 – Schéma des étapes de la formation de la structure de l'épithélium intestinal

(A) Étapes de la formation des villosités. Des amas de cellules mésenchymateuses se forment sous l'épithélium. Les villosités poussent vers la lumière de l'intestin entraînées par les cellules du mésenchyme. (B) Les étapes de la formation de la crypte. Les cellules qui prolifèrent se contractent au niveau apical. La crypte s'enfonce. Un anneau de cellules délimite la frontière entre le haut de la crypte et le bas de la villosité. Adapté de [88].

Dans un deuxième temps, les cryptes se constituent. Chez la souris la formation de ces dernières commence pendant la première semaine après la naissance [30], tandis que chez l'humain elles apparaissent beaucoup plus tôt (entre les semaines 11 et 12 de la gestation [158]). Comme expliqué plus haut, les zones de prolifération sont initialement planes et confinées entre les villosités [149]. Dans les deux jours qui suivent, on note une réduction de la surface apicale des cellules en prolifération. Ce processus est dirigé par l'augmentation de la contractilité cellulaire via la myosine II. Au troisième jour, une majorité des cryptes commence à s'invaginer. La constriction

apicale des cellules conduit à l'invagination [149]. Jusqu'au sixième jour, les cryptes s'enfoncent [149]. Le septième jour, une nouvelle structure cellulaire apparaît autour des cryptes. Contrairement aux cellules de la crypte, ces cellules présentent une constriction basale et une expansion de leur surface apicale (fig I.17). Elles forment un col entre le haut des cryptes et le bas des villosités [154, 149]. Ces cellules permettent de maintenir la compartimentation de l'épithélium intestinal en cryptes et villosités [149]. Enfin, les cryptes atteignent leur taille finale de 40 μm de diamètre au bout du 14^{ème} jour après la naissance [15].

En conclusion, l'épithélium intestinal possède une architecture stéréotypée composée de cryptes et de villosités. Lors du développement l'invagination des cryptes suit la croissance des villosités.

I.2.3 L'épithélium intestinal est exposé à un environnement dynamique

Comme nous l'avons vu plus haut, l'épithélium intestinal constitue une barrière importante de l'organisme. Du côté apical, les cellules sont exposées au microbiote intestinal. Il est composé de centaines de milliards d'archées et de bactéries. Il joue un rôle symbiotique crucial dans le fonctionnement de l'intestin [62, 75, 23]. Néanmoins ce qui constitue la première barrière entre l'organisme hôte et le microbiote intestinal est une couche de mucus qui se dépose sur l'épithélium intestinal [182]. L'absence de cette couche de mucus peut rendre l'intestin sensible aux inflammations. Ces inflammations peuvent à terme occasionner des prédispositions aux cancers colorectaux. Du côté basal, les cellules reposent sur la *lamina propria*. A travers la *lamina propria*, les cellules de l'épithélium intestinal échangent avec de nombreuses cellules du stroma, dont certaines sont en mouvement dans la matrice extra-cellulaire. On y trouve des fibroblastes, des myofibroblastes, des pericytes, des telocytes, des cel-

lules endothéliales, des neurones, des cellules du système immunitaire ainsi que des cellules musculaires [15]. La *lamina propria* joue aussi un rôle important dans les échanges entre les cellules du système immunitaire et le microbiote. On trouve dans les cellules du système immunitaire en contact avec l'épithélium intestinal des macrophages, des cellules dendritiques, des lymphocytes T et B. Ces cellules sont par ailleurs importantes pour le maintien homéostatique de l'épithélium intestinal [44, 131] (fig I.18).

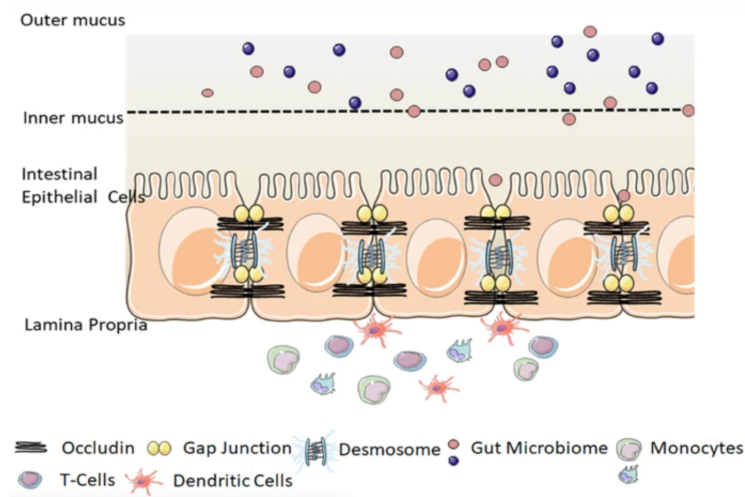


FIGURE I.18 – Schéma de l'environnement cellulaire de l'épithélium intestinal

Au niveau apical, les cellules de l'épithélium sont séparées du microbiote par une couche de mucus. Au niveau basal, les cellules de l'épithélium sont en contact avec différents types cellulaires dont les cellules du système immunitaire. Adapté de [22].

En conclusion, l'épithélium intestinal est exposé à un environnement dynamique. Du côté basal, les cellules du système immunitaire se déplacent dans la matrice extracellulaire et les cellules musculaires se contractent périodiquement afin de former les mouvements péristaltiques. Du côté apical, les cellules de l'épithélium sont exposées à un flux de nourriture sortant de l'estomac et à un microbiote en mouvement.

I.2.4 Les cellules souches de la crypte maintiennent l'homéostasie du tissu

Nous avons montré plus haut que l'épithélium intestinal était très sollicité au niveau apical à la fois par le microbiote et par le passage de la nourriture à l'intérieur du tractus intestinal. Pour répondre à ces sollicitations, l'épithélium intestinal se renouvelle très rapidement. En effet, on remarque une perte d'environ 200 g de cellules par jour chez l'humain [113]. Et un nombre important de cellules est produit chaque jour par l'épithélium intestinal afin de maintenir son homéostasie. La production de ces cellules est dirigée par les cellules souches adultes qui résident au fond de la crypte.

Un facteur important à la conservation de l'homéostasie de l'épithélium intestinal est le maintien du nombre de cellule souche. Pour cela, la niche, définie comme l'ensemble des signaux chimiques et mécaniques qui permettent de maintenir les la quantité physiologique de cellules souches, joue un rôle essentiel. La niche fournit des ligands par contact cellulaire direct et des ligands solubles (cytokines, chemikines et des facteurs de croissance). On compte parmi eux les ligands plusieurs Wnt et R-spondin qui sont nécessaires au maintien et à la prolifération des cellules souches [48, 49, 85, 46, 187]. On caractérise ainsi deux sous parties de la niche : la niche épithéliale et la niche du stroma.

A l'intérieur de la niche les cellules souches sont entourées de cellules de Paneth qui constituent la niche épithéliales. Les cellules de Paneth produisent des ligands nécessaires au maintien des cellules souches tels que Wnt3 [136], EGF et Notch [49, 116, 47]. Il a été noté qu'en l'absence de cellules de Paneth ou par inhibition du Wnt produit par les cellules épithéliales, les cellules du stroma prennent le relais pour assurer la conservation des cellules souches [4, 21]. De plus, lorsque la voie de signalisation Notch est altérée, les cellules souches prolifératives sont progressivement

perdues et se différencient principalement en cellules sécrétrices [47, 162].

De nombreux types cellulaires se trouvent dans le mésenchyme et produisent des ligands nécessaires au maintien de la population de cellules souches. On appelle cet ensemble la niche du stroma. On y trouve par exemple les myofibroblastes qui produisent des ligands Wnt [128] et des cellules mésenchymateuses qui produisent RSPO3 qui va augmenter la signalisation Wnt [61]. Par ailleurs, les cellules du stroma sont aussi une source importante de BMP. Le BMP est un ligand qui inhibe l'action de Wnt et mène les cellules souches sur la voie de la différenciation [6, 83]. On observe ainsi un gradient de BMP du bas vers le haut des villosités, avec une expression plus forte de BMP au sommet des villosités.

Lors de la division des cellules souches dans les niches d'organoïdes intestinaux, deux phénomènes se produisent simultanément. D'une part, le noyau, situé dans la partie basale de la cellule en interphase, migre vers la partie apicale lors de la mitose. Il a été suggéré que cette migration permet aux cellules en division d'avoir plus de place pour se diviser dans le plan de l'épithélium [19]. D'autre part, la cellule en division change de forme. Elle va s'arrondir et son barycentre va se déplacer vers la partie apicale l'épithélium. Tout au long de la division, la membrane cellulaire est remodelée mais la cellule reste attachée sur une très petite surface au niveau basal à la matrice extracellulaire. Cette déformation de la cellule ne va pas changer la surface de l'épithélium au niveau apical. En revanche, au niveau basal, les cellules adjacentes vont combler l'espace laissé par la cellule en division [19]. Lorsque les cellules souches se divisent, certaines cellules filles réintègrent l'épithélium à des endroits éloignés. Ainsi quelques cellules filles réintègrent le tissu dans la niche tandis que d'autres s'en éloignent. Ce processus permet aux cellules souches de sortir de la niche pour entrer dans la zone d'accroissement du tissu ("*transit amplifying zone*" ou zone TA) [19]. Atteindre la zone d'accroissement (ou zone TA) s'accompagne d'un début de la différenciation

des cellules souches.

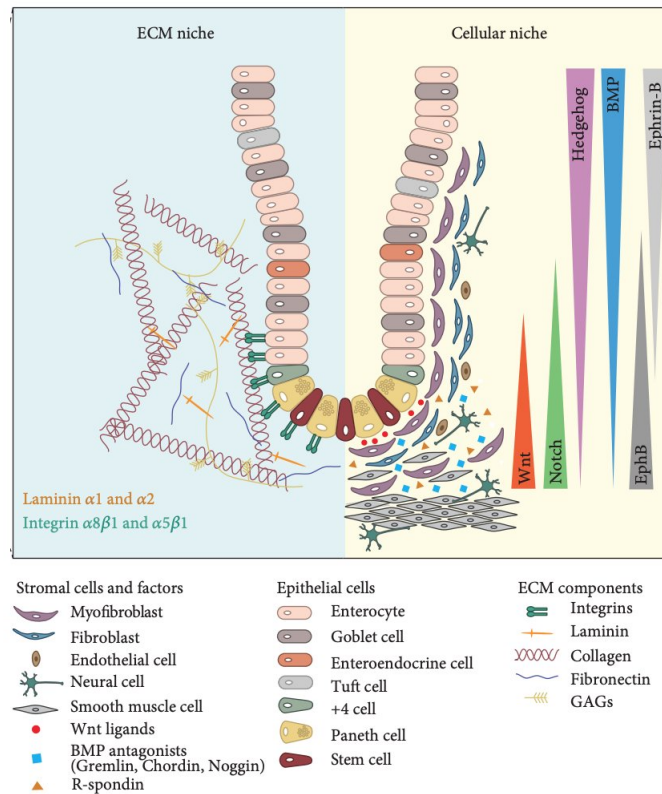


FIGURE I.19 – Schéma de la niche de l'épithélium intestinal

Les cellules souches adultes de la crypte se trouvent au fond de celle-ci, dans la niche. Chaque cellule souche est entourée de cellules de Paneth. Les cellules de Paneth présentent des ligands à leur membrane permettant aux cellules souches de ne pas se différencier. Les cellules de la crypte sont dans un environnement mécanique et biochimique spécifique. Les cellules mésenchymateuses sécrètent différents facteurs de croissance et produisent la matrice extra-cellulaire. Adapté de [104].

Plusieurs facteurs jouent un rôle important dans la prolifération de l'épithélium intestinal et le maintien de la niche. Certains facteurs mécaniques amplifient la prolifération. Cela a par exemple été montré par l'étirement d'organoïdes réimplantés *in vivo* chez la souris [121]. On trouve aussi dans la niche une composition spécifique des protéines de la matrice extra-cellulaire (différents isoformes de laminines, différents

collagènes, etc) [92, 104].

En conclusion, on voit que l'homéostasie du tissu est maintenue par les cellules souche de la crypte. L'environnement de la niche réunit un très grand nombre de conditions qui vont permettre le maintien de la population de cellules souches.

I.2.5 Les cellules de l'épithélium intestinal migrent activement du bas vers le haut des villosités

Nous avons vu plus haut que l'épithélium intestinal est un tissu qui se renouvelle en permanence à une cadence très élevée. En effet, il est entièrement renouvelé en 4 à 5 jours [50]. Ce renouvellement se fait de la manière suivante : des cellules souches au fond de la crypte vont se diviser et proliférer puis migrer pour atteindre la pointe de la villosité. Nous allons donc nous intéresser dans cette partie au déplacement des cellules à l'intérieur de l'épithélium.

Il a longtemps été admis que les cellules pour atteindre la pointe de la villosité étaient poussées par des forces de pression générées en aval par la prolifération cellulaire qui a lieu dans la crypte. Cette vision a été écartée par les travaux de D. Krndija et collègues [84]. En effet, dans cette étude les auteurs observent que la migration au niveau de la villosité continue malgré l'inhibition de la prolifération dans la crypte. De plus, des mesures de contrainte à l'intérieur du tissu sont effectuées à l'aide d'ablation laser. Les auteurs montrent que le tissu n'est pas compressé mais sous tension. En outre, cette étude met en avant la présence d'une polarité avant-arrière des cellules, en plus de leur polarité apico-basale. Les cellules forment des protrusions à l'avant dans la direction du mouvement, semblables à des lamellipodes cryptiques. Les auteurs notent qu'il existe une migration cellulaire active. D'après leur modèle, les protrusions propulsent les cellules de l'épithélium. Or les cellules sont étroitement

liées entre elles par des jonctions. De plus, les auteurs mesurent à différents points de la villosité une augmentation de la tension à l'intérieur du tissu du bas vers le haut (fig I.20).

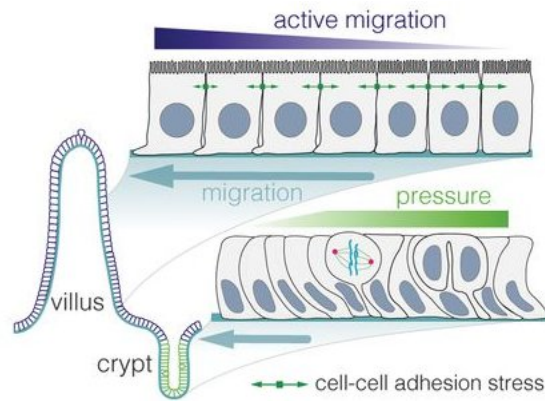


FIGURE I.20 – Schéma du modèle mécanique de la migration cellulaire de l'épithélium intestinal

Les cellules de la crypte se divisent fortement. Ces divisions engendrent une pression croissante vers le fond de la crypte. Ensuite, les cellules migrent de façon active le long de la villosité. Les jonctions entre les cellules et leur migration permettent de faire sortir les cellules de la crypte pour entrer dans la villosité. Adapté de [84].

En conclusion, l'hypothèse avancée pour l'instant est la suivante : la tension issue de la migration active des cellules dans la villosité tire les cellules en dehors de la crypte. Néanmoins de nombreuses questions restent en suspens. Il reste notamment à comprendre quels sont les principes qui dirigent le mouvement des cellules le long de la villosité. Des pistes ont été proposées : des chimio-attractants libérés par les cellules qui se déplacent dans la matrice extra-cellulaire, une différence de composition du substrat et/ou une différence de rigidité du substrat [117].

I.2.6 La compression et la contractilité cellulaires participent à l'extrusion dans l'épithélium intestinal

Nous avons vu que le renouvellement de l'épithélium intestinal suivait un parcours en trois étapes : une étape de prolifération dans la crypte, puis de migration le long de la villosité, enfin l'extrusion au sommet de la villosité. Nous nous intéresserons dans cette partie à la dernière étape de ce parcours suivie par les cellules : l'extrusion.

Dans les villosités saines, la plupart des extrusions se déroulent au sommet de celle-ci. Dans une étude menée par Bullen et collègues sur des coupes d'intestin grêle humain, les auteurs concluent que l'apoptose est liée à l'extrusion. Seulement, il n'a pas été montré si l'apoptose précédait l'extrusion [18]. Par ailleurs, on a observé que lors de l'extrusion des processus parallèles étaient à l'oeuvre dans les cellules extrudées et les cellules adjacentes. D'une part les cellules adjacentes forment des protrusions en dessous de la cellule extrudée et se joignent afin de ne pas altérer la barrière créée par la tissu. D'autre part, la cellule extrudée abaisse ses jonctions serrées au pôle baso-latéral, perd sa E-cadhérine de surface et contracte sa partie basale [171, 96]. Enfin dans l'étude de D. Krndija et collègues, les auteurs observent que les cellules lorsqu'elles atteignent le sommet de la villosité ralentissent leur migration. Cette baisse de la vitesse s'accompagne d'une augmentation de la densité cellulaire [84]. Ainsi, il est actuellement proposé que deux phénomènes sont en jeu dans l'extrusion : la compression due à l'augmentation de la densité cellulaire et l'augmentation de la contractilité cellulaire dans la cellule extrudée. Cependant, l'extrusion dans l'épithélium intestinal reste un sujet peu connu et on peut penser que bien d'autres phénomènes opèrent. En effet, T.B. Saw et collègues ont prouvé que l'apparition de défauts topologiques sur une monocouche de cellules MDCK (des cellules épithéliales canines *Madin-Darby Canine Kidney*) engendrait une augmentation de la

compression des cellules localement. L'augmentation de la compression dans ce cas-ci provoque l'extrusion des cellules épithéliales [138]. La surpopulation cellulaire peut aussi induire l'extrusion. Eisenhoffer et collègues montrent ainsi que la surpopulation cellulaire (dans ce cas des cellules humaines, de poisson zèbre ou canine) amène à l'extrusion de cellules vivantes. Cette densité cellulaire localement très élevée peut être due à la migration ou à la prolifération cellulaire. Les auteurs expliquent qu'*in vivo* les extrusions de cellules vivantes s'observent dans les zones de densité les plus élevées. Les auteurs ajoutent que ces conditions peuvent être reproduites *in vitro* et conduisent aux mêmes observations [38].

Pour conclure, nous avons vu dans cette partie que l'épithélium intestinal était un tissu avec une structure stéréotypée composée de cryptes et de villosités. On observe pendant le développement que la formation des cryptes suit celle des villosités. De plus l'épithélium intestinal est exposé à un environnement dynamique dont la réponse à cette sollicitation est le renouvellement très rapide du tissu. Le renouvellement de l'épithélium intestinal est initié par les cellules souches adultes situées au fond de la crypte. Ces cellules vont commencer à se différencier et proliférer. Ensuite, elles vont sortir de la crypte et commencer une migration active le long de la villosité. Enfin elles terminent leur parcours par leur extrusion au sommet de la villosité.

La structure stéréotypée de l'intestin et son renouvellement très rapide à partir des cellules souches de la niche en font un objet d'étude idéal pour la compréhension de l'auto-organisation et de la différenciation des cellules souches. Nous verrons ainsi dans la partie suivante les outils récemment développés afin de faciliter l'étude et de mieux comprendre le fonctionnement de l'épithélium intestinal.

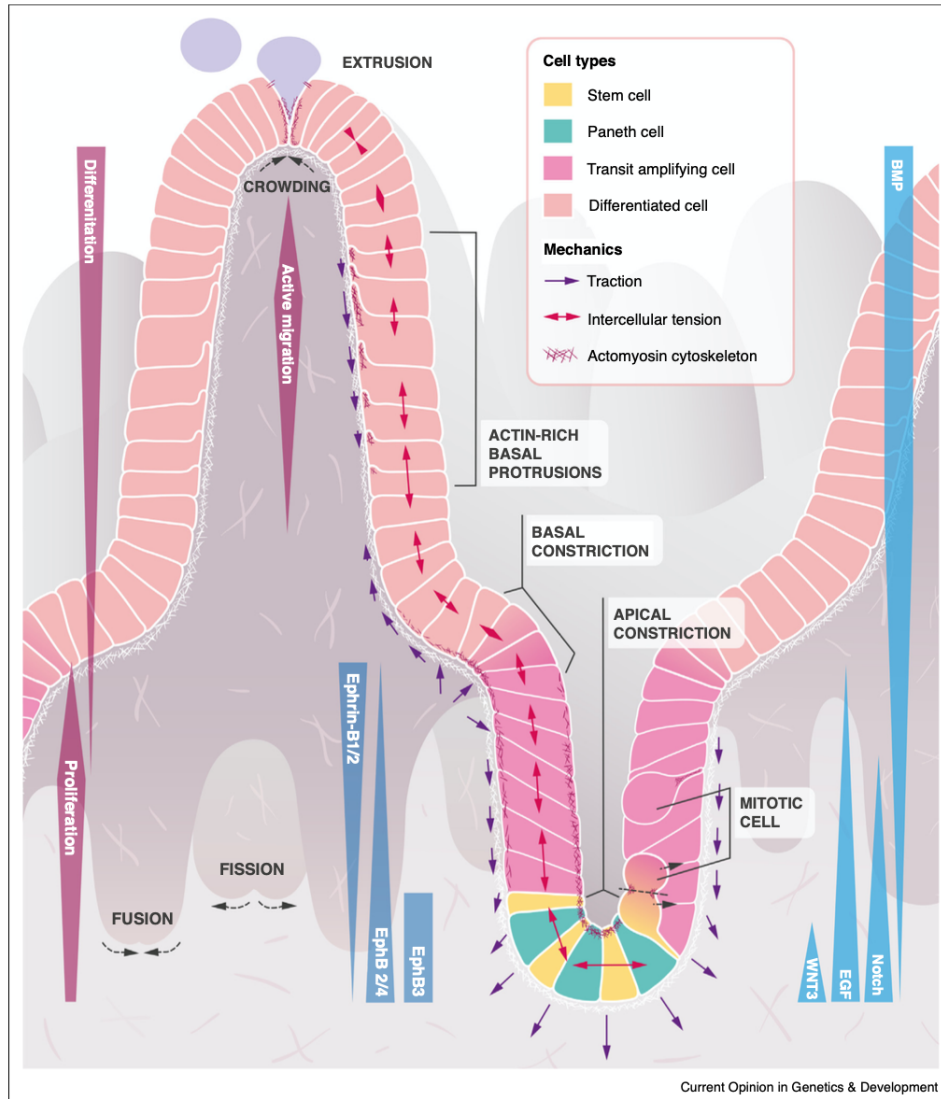


FIGURE I.21 – Schéma récapitulatif de l'organisation de l'épithélium intestinal

Les cellules souches au fond de la crypte intestinale se divisent au niveau apical. Ensuite, les cellules migrent le long de la villosité et exercent une tension sur les cellules en aval qui les fait sortir de la crypte. On observe alors une tension plus élevée entre les cellules au bas de la villosité. Enfin lorsque les cellules atteignent le sommet de la villosité, elles ralentissent leur mouvement. La compression augmente donc au sommet de la villosité. Généralement, les cellules sont extrudées dans cette zone. Adapté de [117].

I.3 Les outils d'étude de l'épithélium intestinal

Dans la section précédente nous avons vu que l'épithélium intestinal constitue un modèle idéal d'étude de l'auto-organisation et du destin cellulaire. Ainsi, ces dernières années, de nombreuses équipes de recherche ont développé des outils d'étude de l'épithélium intestinal afin de mieux comprendre le fonctionnement de celui-ci. Nous examinerons dans cette partie quelques-uns des différents outils utilisés.

Nous verrons dans un premier temps les caractéristiques des organoïdes intestinaux. Ensuite, nous étudierons les technologies développées pour diriger leur croissance en trois dimensions. Et enfin, nous examinerons les dernières études faites sur les organoïdes plans et l'avantage qu'ils confèrent par rapport aux supports en trois dimensions.

I.3.1 La culture d'organoïdes a bouleversé l'étude de l'épithélium intestinal *in vitro*

Les organoïdes, en tant qu'outils, ont bouleversé la manière d'étudier l'épithélium intestinal. Ils permettent une approche beaucoup plus physiologique dans la culture *in vitro*. Nous verrons dans cette partie ce que sont les organoïdes intestinaux, leur structure, leur composition et en quoi ils permettent d'être plus proche de la biologie de l'organe *in vivo*.

Les organoïdes sont des amas de cellules cultivés dans un gel en trois dimensions issus de cellules souches qui s'auto-organisent et se renouvellent. Ils peuvent être produits à partir de différents types de cellules souches : des cellules souches adultes, pluripotentes, pluripotentes induites ou embryonnaires [137, 135, 29, 105, 7, 102, 147, 159, 170]. Ces amas de cellules maintiennent les fonctions et l'hétérogénéité cellulaire des organes initiaux. Il est possible de cultiver des organoïdes de nombreux organes :

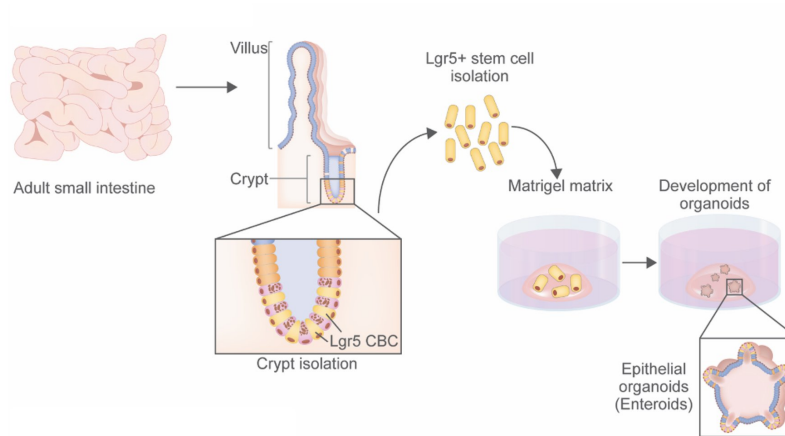


FIGURE I.22 – Schéma de la préparation originale des organoïdes intestinaux

Actuellement, la plupart des cultures d'organoides se préparent à partir de cryptes presque entières. Les cryptes juste prélevées de l'intestin sont détachées du reste de l'épithélium et de la matrice extra-cellulaire. Elles sont ensuite incluses dans du Matrigel, s'auto-organisent et forment un lumen fermé. Adapté de [124].

cerveau, rétine, foie, intestin [133, 37, 39, 71, 90, 132, 51]. Nous nous concentrerons dans cette partie sur les organoïdes intestinaux.

T. Sato et collègues ont été les premiers à développer les organoides intestinaux à partir de cellules souches intestinales de souris, LGR5+, insérées dans du Matrigel [137] (fig I.22). Dans un premier temps, il a été nécessaire d'identifier les cellules souche de l'épithélium intestinal. Le travail de N. Barker et collègues qui a permis d'identifier le gène LGR5 comme un marqueur des cellules souches de l'épithélium intestinal [10]. Dans un second temps, il a fallu reconstituer la niche comme environnement de maintien de la population des cellules souches. D'une part, les auteurs ont utilisé du Matrigel pour reproduire la matrice extra-cellulaire. Le Matrigel est un gel extrait de la membrane basale produite par des cellules cancéreuses [78]. D'autre part, les auteurs ont développé un milieu contenant les éléments chimiques nécessaires au maintien et à la prolifération des cellules souches. Le milieu comprend

les ligands EGF, Noggin et R-spondin [137]. Au début les cellules s'organisent en sphère, doté d'un lumen, puis des bourgeonnements apparaissent. On observe que les bourgeonnements reconstituent les cryptes avec des cellules souches et des cellules de Paneth, tandis que dans les espaces inter-bourgeonnements résident les cellules différenciées. On trouve dans les villosités reconstituées la plupart des cellules différenciées : les entérocytes, les cellules entéroendocrines et les cellules calciformes [133, 137, 135, 13]. On voit alors que ce système permet de reconstituer la structure de l'épithélium intestinal en cryptes et villosités. De plus, les cellules peuvent être cultivées et repiquées sur de longues périodes [137, 9]. On y observe même la conservation de fonctions physiologiques comme le transport d'ions [140, 52]. Ces études montrent qu'il est possible de reconstituer la structure et la composition cellulaire de l'épithélium intestinal en l'absence des cellules du stroma. Or ce sont ces dernières qui fabriquent la matrice extra-cellulaire et libèrent des facteurs de croissances et de différenciation pour les cellules épithéliales. Il est donc nécessaire pour la culture d'organoïdes d'être attentif à deux éléments : la matrice extra-cellulaire et les facteurs de croissances dans le milieu [135, 134]. La matrice de culture la plus utilisée pour les organoïdes intestinaux reste le Matrigel. Cependant, ce gel produit par des cellules cancéreuses, comme expliqué plus haut, varie en composition d'un lot à l'autre et reste mal défini. Pour surmonter ces difficultés, N. Gjorevski et M.P. Lotolf proposent d'utiliser un hydrogel composé de PEG (poly(ethylene glycol)) fonctionnalisé de façon minimale avec des RGD (Arg-Gly-Asp) et de la laminine 111 [57].

Par ailleurs, on peut éditer le génome des cellules d'organoïde avec notamment CRISPR/Cas9 [34, 35, 140, 101, 54]. De plus, il a été montré qu'il était possible de produire des organoïdes intestinaux à partir de nombreuses espèces : le cochon [122, 67], les bovins [123, 111], le singe [123, 67], le chien [122, 107], le rat [94], le mouton, le cheval et le chat [123].

En conclusion, les organoïdes intestinaux permettent une culture *in vitro* plus proche des conditions physiologiques en comparaison à la culture *in vitro* "classique". En effet, elle permet de garder la diversité cellulaire et la structure de l'épithélium intestinal contrairement aux lignées cellulaires. Cette culture offre aussi un accès à une quantité renouvelable et importante de cellules souches intestinales. De plus, la production d'organoïdes de nombreuses espèces différentes confirme que cet outil permet de garder caractéristiques biologiques et génétiques des individus donneurs.

I.3.2 Contrôler l'environnement pour mieux comprendre la comportement cellulaire au sein de l'épithélium intestinal

Nous avons vu plus haut que les organoïdes avaient changé en profondeur la pratique de la culture *in vitro*. Ils sont des outils beaucoup plus proches de la structure *in vivo* de l'épithélium intestinal. Ils gardent en effet la diversité cellulaire de l'organe et s'auto-organisent en cryptes et villosités. Néanmoins, pour être plus proche de l'organe *in vivo*, quelques modifications à la culture d'organoïdes peuvent être apportées. On pense par exemple au lumen clos, l'apparition aléatoire des domaines de cryptes et de villosités, l'absence de flux au niveau apical des cellules ou encore le contact avec les autres types cellulaires de l'environnement (le microbiote, les cellules mésenchymateuses, les cellules du système immunitaire, les contraction du mésenchyme, etc). Nous verrons donc dans cette partie l'ingénierie mise en oeuvre pour se rapprocher au plus près d' un modèle *in vivo*.

Tout d'abord des équipes de recherche se sont penchées sur la composition de la matrice extra-cellulaire pour mieux comprendre comment les organoïdes s'auto-organisent. Dans un article sorti en 2016, N. Gjorevski et collègues s'intéressent à l'effet de la rigidité sur le bourgeonnement des organoïdes [58]. Les auteurs montrent que les

rigidités élevées augmentent la population des cellules souches. Ce processus met en jeu la protéine YAP. Au contraire les cellules souches d'organoïdes cultivées dans des matrices plus molles se différencient plus. Les auteurs montrent aussi que la composition protéique joue un rôle dans la définition de la structure des organoïdes. Les organoïdes cultivés dans des gels de collagènes IV et de laminine 111 restent sous forme de cystes. On y observe peu de différenciation cellulaire. Dans une étude très récente sortie en 2022, N. Gjorevski et collègues montrent que l'on peut diriger la structure des organoïdes en leur imposant une certaine courbure plus ou moins forte [56] (fig I.23). Les auteurs observent que les cellules des cryptes se positionnent dans les zones de plus forte courbure. Les auteurs mesurent aussi une corrélation entre la localisation de YAP et l'étalement des cellules. Les auteurs montrent que la géométrie du tissu contrôle la localisation de YAP via l'étalement cellulaire. En effet, la translocation de YAP est beaucoup plus importante dans le cas où les cellules sont contraintes dans des puits de 100 μm comparées aux celles contraintes à des puits de 50 μm [56]. Ces études démontrent donc que les paramètres mécaniques du substrat comme la courbure ou la rigidité jouent un rôle important dans le maintien ou la différenciation des cellules souches.

L'étude écrite par Q. Yang et collègues s'intéresse à la formation des cryptes dans les organoïdes. Les auteurs montrent que le bourgeonnement des cryptes est généré par une contraction apicale dans les cryptes ainsi qu'une tension basale dans les villosités. Ce phénomène est ensuite amplifié par le gonflement des entérocytes. Les auteurs montrent en effet l'importance des forces osmotiques dans le processus de bourgeonnement des cryptes des organoïdes intestinaux. La réduction en volume du lumen ainsi que le gonflement des cellules différenciées contribuent au bourgeonnement des cryptes. On voit alors que la morphogenèse de la crypte dans les organoïdes est dépendante de la coordination des forces osmotiques et du cytosquelette. De plus,

ces deux forces sont dirigées par le destin cellulaire [176].

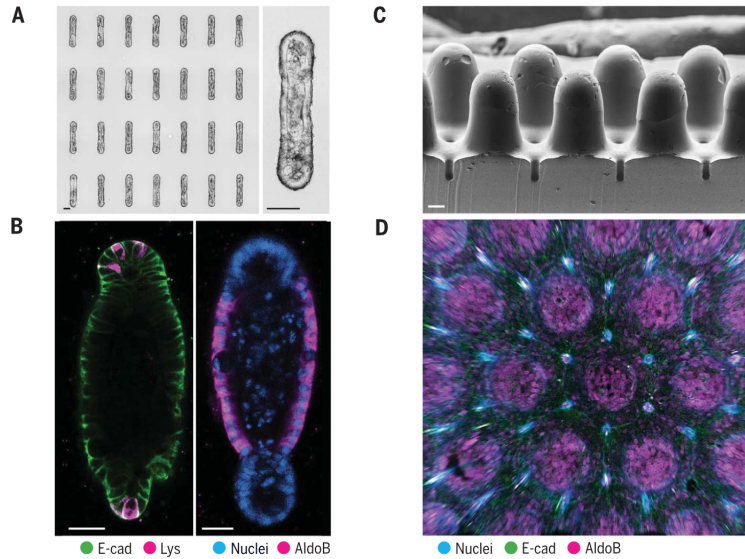


FIGURE I.23 – Contrôle de l’environnement pour diriger la structure des organoïdes intestinaux

(A) Moules contraignant la forme de croissance des organoïdes. (B) Composition cellulaire des organoïdes contraints en trois dimensions. Les cellules de la crypte (les cellules de Paneth et les cellules souches) se trouvent préférentiellement dans les zones de forte courbure. Les cellules différenciées quant à elles se trouvent dans les zones planes. (C) Support de culture des organoïdes en PDMS. (D) Composition cellulaire des organoïdes cultivés sur les supports affichés en (C). Les cellules différenciées se localisent sur les villosités. Adapté de [56].

D’autres études proposent de contraindre les organoïdes à une forme ouverte. En effet, le lumen fermé des organoïdes limite leur temps de culture. Les organoïdes doivent être repiqués régulièrement afin de vider le lumen des débris cellulaires. On trouve ainsi, toujours dans les travaux publiés en 2022 de N. Gjorevski et collègues, un substrat en PDMS (poly(dimethylsiloxane)) qui reconstitue la topologie de l’épithélium intestinal [56]. Les auteurs montrent que les cellules s’auto-organisent sur

le substrat. Les cellules souches se concentrent dans les puits, tandis que les cellules différenciées se trouvent sur les protubérances (fig I.23). On retrouve ainsi la structure de l'épithélium intestinal avec un lumen ouvert. A l'aide des connaissances en microfluidique, M. Nikolaev et collègues proposent même d'intégrer des organoïdes au lumen ouvert dans des puces microfluidiques [110]. L'ajout d'un flux permet de maintenir la culture d'organoïdes beaucoup plus longtemps en retirant les cellules mortes. Ce système permet aussi de mettre l'épithélium en contact avec les micro-organismes et d'en étudier les effets.

Par ailleurs, d'autres équipes de recherche se concentrent quant à elles sur l'influence d'un gradient de facteur de croissance, associé à une topologie imposée, dans le maintien de l'organisation cellulaire des organoïdes. Les facteurs de croissances utilisés dans cette étude sont : Wnt-3A, R-spondin et Noggin. Ainsi, Y. Wang et collègues expliquent par exemple qu'il est possible de cultiver des cellules d'organoïdes intestinaux sur un support en collagène comportant une architecture en crypte et villosité et d'y appliquer un gradient de facteur de croissance en déposant le gel sur un Transwell modifié [168]. L'application de ce gradient chimique permet le maintien des cellules indifférenciées dans la crypte et de la migration cellulaire le long de la crypte.

Pour conclure, toutes ces études effectuées en trois dimensions permettent de comprendre comment l'environnement agit sur le comportement des cellules d'organoïdes. Les études en trois dimensions permettent surtout de travailler sur la courbure. Elles permettent grâce à des moules de diriger la position des cryptes et des villosité et ainsi diminuer la variabilité des organoïdes. Cependant, ces cultures restent très complexes à mettre en place et à manipuler. Nous verrons donc ensuite les avantages de la culture plane des organoïdes.

I.3.3 Vers une culture plane des organoïdes

Nous avons vu dans les parties précédentes que les organoïdes permettent, entre autres, de conserver la diversité cellulaire de l'organe originel, contrairement à la culture de lignée cellulaire. En revanche sa croissance dans du Matrigel, la matrice couramment utilisée dans les laboratoires, laisse une grande part à l'aléatoire. En effet, on observe tout d'abord de la culture d'organoïdes en matrigel une grande variabilité de taille ; les organoïdes peuvent varier du simple au triple en volume. Le nombre de cryptes par organoïde diffère énormément d'un organoïde à l'autre ; certains ne forment pas de cryptes tandis que d'autres en forment cinq ou plus. Par conséquent, la composition cellulaire fluctue entre les organoïdes d'une même culture ; de par la différence en nombre de cryptes entre les organoïdes, la proportion de cellules souches par rapport au nombre de cellules différenciées change beaucoup. Des équipes de recherche ont donc développé des supports à la composition connue qui reproduisent l'axe crypte-villosité de l'épithélium intestinal [56, 174]. Ils ont montré que l'utilisation de ces supports permettait de mieux contrôler la croissance des organoïdes pour plus de reproductibilité. Néanmoins, la production de ces supports demande un matériel difficilement accessible (de pointe et onéreux). De plus, l'architecture de ces supports requiert une acquisition des images en trois dimensions, très longue et complexe. A la différence de la culture en trois dimensions, la culture d'organoïdes intestinaux plans est plus facile à manipuler. En outre, elle permet différentes mesures : la mesure des forces exercées par les cellules sur le substrat via la microscopie à force de traction, l'auto-organisation par l'impression de motifs sur le substrat, l'effet de la rigidité sur le comportement cellulaire, etc. Ainsi, pour plus de simplicité et dans le but d'étudier d'autres phénomènes, certaines équipes de recherche ont décidé de se concentrer sur le développement d'une culture plane des organoïdes [174, 118, 155, 79, 2].

Il est par exemple possible d'étudier l'auto-organisation des cellules primaires de co-

lon sur un substrat dont la rigidité et la porosité n'est pas homogène. Dans le travail présenté par R. Kim et collègues, les cellules primaires de colon sont cultivées sur un film imperméable recouvert de collagène [79]. Le film est au préalable percé. Les trous sont environ de la taille d'une crypte et espacés de manière périodique. Ce dispositif permet d'obtenir un substrat dont la rigidité et la porosité varient. Des milieux différents sont disposés sur la surface apicale des cellules et en dessous du substrat. En dessous du substrat, le milieu est riche en facteur de croissance. Cette structure permet la formation d'un gradient de facteurs de croissance dans l'épithélium en culture. Les auteurs observent alors des zones de prolifération là où la concentration en facteur de croissance est plus forte. De plus, ce gradient engendre la migration des cellules des zones de forte prolifération vers les zones de faible prolifération.

Une étude récente se concentre aussi sur l'effet de signaux chimiques provenant du substrat sur l'auto-organisation des cellules de l'épithélium intestinal [91]. Dans son travail de thèse, E. Larrañaga Carricajo imprime des motifs localisés de Wnt et ephrin sur des gels de polyacrylamide recouvert de Matrigel congelé et séché. Elle constate que l'impression de ces motifs dirige la compartimentation en cryptes et villosités de la monocouche de d'épithélium intestinal. Ce procédé lui permet par ailleurs de changer la forme et la distance entre les motifs, affectant la forme et la distance entre les domaines de crypte.

Par ailleurs, la culture plane d'épithélium intestinal a permis de mesurer les forces exercées par les cellules de l'épithélium intestinal sur le substrat. Ainsi, dans une étude très récente de C. Pérez-González et collègues, des cellules d'organoïdes intestinaux sont cultivées en deux dimensions sur des gels de polyacrylamide de rigidités différentes, recouvert de laminine et de collagène I [118]. Les auteurs montrent qu'en déposant des parties d'organoïde sur le substrat, les cellules vont reformer la struc-

ture de l'épithélium intestinal. Ils observent des zones de cryptes avec des cellules souches et des cellules de Paneth distinctes des zones de cellules différenciées. Avec ce dispositif, les auteurs mesurent les forces exercées par les cellules sur le gel en utilisant la microscopie à force de traction. Ils montrent alors que les cellules au centre des zones de crypte poussent sur le substrat, tandis que les cellules entre les zones de crypte et de villosité tirent sur le substrat (fig I.24). les auteurs expliquent que ce sont ces forces qui permettent de compartimenter la villosité et la crypte dans l'épithélium intestinal.

En outre, Les substrats plans permettent de jouer sur la rigidité. Ainsi, une étude examine l'effet de la rigidité du substrat sur la voie de différenciation des cellules souches de l'épithélium intestinal [65]. Pour ce faire, les auteurs utilisent des gels de polyacrylamide liés à du collagène I via le Sulfo-SANPAH. Ce procédé leur permet de faire varier la rigidité de 0.6kPa to 9.6kPa. Les auteurs montrent ainsi que la rigidité a un effet sur le destin cellulaire via la translocation nucléaire de YAP. Ils montrent, à l'aide du séquençage de l'ARN des cellules que l'augmentation de la rigidité du substrat accroît la population de cellules calciformes et diminue la population d'entérocytes. Ces observations corroborent les mesures effectuées chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin[2, 167].

En conclusion, nous avons vu dans cette section que la culture d'organoïdes avait permis de se rapprocher des conditions physiologiques dans la culture *in vitro*. Cependant, la croissance des organoïdes dans le Matrigel reste peu maîtrisée. Ainsi certaines études ont permis de mieux comprendre la croissance des organoïdes en trois dimensions afin de la diriger et de la rendre plus reproductible. Néanmoins ces techniques restent difficiles à mettre en place, à manipuler et restreignent les mesures possibles. Certaines équipes de recherche ont donc pris le parti de se concentrer sur une culture plane des organoïdes. La culture plane d'organoïdes permet notamment

de faire varier beaucoup plus largement la rigidité, et même d'appliquer des gradients de rigidité ou bien des variations locales de rigidité. La culture plane permet par ailleurs d'imprimer des motifs protéiques à la surface des gels. Enfin, la mesure des forces exercées par les cellules sur le substrat et des contraintes à l'intérieur des tissus sont possibles dans une culture plane des organoïdes intestinaux. Pour toutes ces raisons, mon travail de thèse exposera des résultats obtenus à partir d'organoïdes intestinaux plans, déposés sur des gels de polyacrylamide.

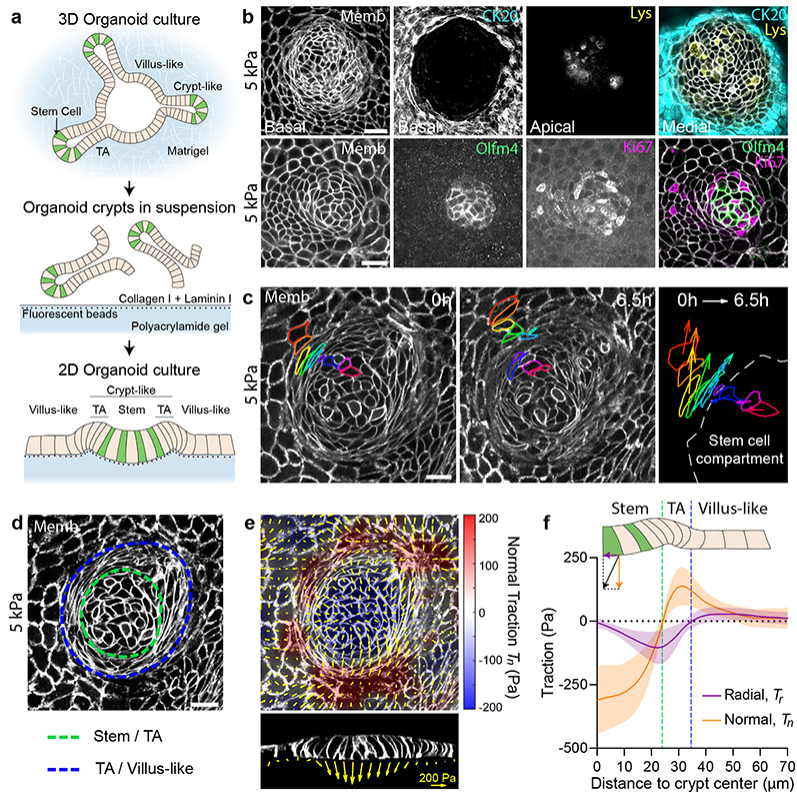


FIGURE I.24 – Les forces exercées par les cellules sur le substrat permet de maintenir la séparation entre les cellules de la crypte et les cellules différenciées

(A) Méthode de culture et de dépôt des organoïdes. (B) Composition cellulaire des monocouches. (C) Mouvement dirigé des cellules. Les cellules sortent de la crypte pour atteindre les zones de cellules différenciées. (D) délimitation des zones : zone de niche au centre, entourée de la zone TA (amplification transitoire ou *Transitory Amplifying*) elle-même entourée de la zone des cellules différenciées. (E) et (F) Répartition des forces de la crypte et des cellules différenciées environnantes. Extrait de [118].

Chapitre II

Méthodes

Pour effectuer ce travail de thèse, différentes méthodes expérimentales et d'analyse ont été utilisées. Dans ce chapitre, seront exposés en détail les protocoles de culture cellulaire, de micro-fabrication, de capture et d'analyse d'image.

II.1 Préparation et culture des organoïdes intestinaux

II.1.1 Types cellulaires

Les expériences présentées dans cette thèse ont été menées à partir de cellules d'organoïdes intestinaux de souris. Tous les organoïdes ont été cultivés dans du milieu de croissance, un milieu dont la préparation est décrite dans la section II.1.4. Les différents types d'organoïdes intestinaux utilisés sont les suivants :

- **WT (Type sauvage ou *Wild Type*** : ce sont des organoïdes intestinaux de type sauvage prélevés sur des souris mâles adultes. Ce sont des souris C57/Bl6 provenant du même stock que celui utilisé par W. Xi et collègues [174].

- **VT (Villin tomato)** : ces organoïdes intestinaux sont prélevés sur des souris génétiquement modifiées. Les cellules expriment, sous le promoteur de la villine, une protéine émettant dans le rouge proche, la protéine "tomato", à la membrane. Ce sont des cellules VillinCreERT2-tdTomato prélevées sur des souris fournies par D. Vignjevic (Institut Curie, Paris).
- **Myosine II A GFP** : ces organoïdes intestinaux sont prélevés sur des souris génétiquement modifiées. Les cellules expriment une protéine émettant dans le vert, la GFP (protéine fluorescente verte ou *Green Fluorescent Protein*), fusionnée à la protéine myosine II A. Elles ont été prélevées sur des souris Myosin-IIA-GFP-knock-in [185] fournies par A.M. Lennon-Dumesnil (Institut Curie, Paris).
- **Myosine II A KO inducible** : ces organoïdes intestinaux sont prélevés sur des souris génétiquement modifiées. Les cellules y expriment une protéine émettant dans le rouge proche, la protéine "tomato", à la membrane. La présence de tamoxifène induit à la fois le KO (invalidation génétique ou *Knock Out* génétique) de la protéine Myosine II A et l'expression d'une protéine émettant dans le vert, la GFP, à la membrane. Le KO de myosine II A peut donc être vérifié par le passage de la fluorescence des membranes du rouge au vert. Les souris Myosin-IIA-KO/mTmG [84] ont été fournies par D. Vignjevic (Institut Curie, Paris). Elles ont été obtenues à partir du croisement de souris Myosin-IIA-KO [74] avec des souris mTmG [108] .
- **H2B mCherry** : ces organoïdes intestinaux sont prélevés sur des souris génétiquement modifiées. Les cellules expriment une protéine émettant dans le rouge proche, la protéine mCherry, fusionnée à la protéine H2B (histone H2B). Ils ont été produits à partir de souris H2B-mCherry knock-in fournies par R. Basto (Institut Curie, Paris).

II.1.2 Préparation des organoïdes intestinaux

Les souris utilisées pour le prélèvement de cryptes intestinales sont âgées de 8 à 12 semaines. Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. L'intestin grêle est ensuite prélevé, rincé avec du PBS (tampon phosphate salin ou *Phosphate-Buffered Saline*) pour en vider le contenu et ouvert de manière longitudinale. Par la suite, il est découpé en petits morceaux de 3 à 5 mm et de nouveau rincé. Puis, ces morceaux sont incubés sur glace pendant 10 min dans une solution de EDTA (Éthylènediaminetétraacétique) (5mM). La solution contenant les morceaux d'intestins est passée au vortex afin d'en détacher les villosités. Après le retrait de la solution d'EDTA les morceaux sont placés dans du PBS froid et passés au vortex pendant 3 min afin d'en détacher les cryptes. Ce processus est réitéré trois fois sur le surnageant récupéré. Les surnageants de la troisième et quatrième sont regroupés et filtrés à travers un filtre de mailles de 70 μm . Les villosités sont en moyenne plus grande que les cryptes. De plus, les organoïdes intestinaux sont produits à partir des cryptes. La filtration permet donc de retirer les villosités pour ne garder que les cryptes. Le filtrat est ensuite centrifugé à 1000 RPM (Rotation Par Minute) pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et les cryptes fraîchement prélevées sont ensuite rincées dans une solution de *Advanced* DMEM/F12 puis de nouveau centrifugées. Enfin, elles sont incorporées à une solution, de ratio 1 :1, de Matrigel et de milieu *Advanced* DMEM/F12. La solution contenant les cryptes est disposée sous forme de dôme de 50 μL de volume dans une plaque 24 puits. Afin, d'obtenir des dômes de Matrigel, les plaques 24 puits sont au préalable chauffées à 37°C. De par la température des plaques et la viscosité de la solution de Matrigel, une goutte déposée au fond des puits forme spontanément un dôme. de faire polymériser le Matrigel, les dômes sont incubés pendant 20 à 30

min à 37°C. Enfin, on ajoute le milieu de culture : le milieu de croissance.

II.1.3 Culture des organoïdes intestinaux

Ces cryptes isolées sont ensuite utilisées dans la culture d'organoïdes intestinaux précédemment décrite [112]. Cette technique permet de congeler et conserver en culture pendant plusieurs semaines des organoïdes intestinaux. Les organoïdes intestinaux sont replantés une à deux fois par semaine et cultivés dans du milieu de croissance changés tous les deux jours.

II.1.4 Préparation du milieu de croissance

Le milieu de croissance est préparé selon le protocole décrit par H. Miyoshi et T. S. Stappenbeck[106]. Ce milieu est préparé à partir de cellules L-WNR. En effet, les cellules L-WNR vont conditionner le milieu primaire de culture en y sécrétant les facteurs de croissance suivants : Wnt-3A, R-Spondin et Noggin. Ces facteurs vont permettre de maintenir un réservoir de cellule souche important ainsi qu'une prolifération cellulaire élevée [134].

Tout d'abord, les cellules L-WNR sont cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de fraction volumique de FBS (sérum de veau fœtal ou *Fetal Bovine Serum*), de la pénicilline (100 unités. mL^{-1}) et de la streptomycine (0,1 mg. mL^{-1}). Après le premier jour de culture, les cellules sont sélectionnées à l'aide de généticine (500 $\mu g.mL^{-1}$) et hygromycine (500 $\mu g.mL^{-1}$). Elles sont ensuite cultivées jusqu'à confluence pendant 3 à 4 jours puis distribuées dans 5 flacons de culture de 175 cm^2 . Après 3 à 4 jours de culture, lorsque celles-ci arrivent à confluence, on remplace le milieu précédent par du milieu primaire de culture (25 mL de milieu primaire par flasque). Le milieu primaire est composé de : 20% de fraction volumique de FBS, GlutaMAX (2mM), pénicilline (100 unités. mL^{-1}) et streptomycine (0,1 mg. mL^{-1})

dilués dans du advanced DMEM/F12. Toutes les 24 heures, le milieu conditionné est récolté et mélangé dans un ratio 1 :1 à du milieu primaire de culture.

Le milieu de croissance peut-être conservé jusqu'à trois mois à -20°C. Une fois décongelé, il doit être utilisé dans les 15 jours qui suivent. Dans les travaux présentés dans cette thèse, toutes les cellules d'organoïdes intestinaux sont cultivées dans du milieu de croissance.

II.1.5 Dépôt des cellules sur gels de PAA (polyacrylamide)

Afin de cultiver des cellules d'organoïdes intestinaux en 2D sur du gel de PAA, deux techniques différentes ont été utilisées : la dissociation mécanique et la dissociation enzymatique (ou culture de cellules isolées). Nous décrivons dans cette partie les deux techniques possible d'ensemencement des cellules sur gels de PAA. Dans les deux cas, les cellules doivent avoir été repiquées au moins quatre jours avant.

- **Dissociation mécanique** : cette technique permet de déposer les cellules en fragments d'organoïdes intestinaux. Grâce à celle-ci, on obtient une meilleure survie des cellules, on a donc besoin de moins de cellules au départ. Elles sont cependant pré-organisées, comme elles le sont dans les organoïdes intestinaux cultivés en trois dimensions dans le Matrigel.

Après transfert dans un tube à centrifuger, les organoïdes intestinaux sont dissociés mécaniquement par cisaillement avec une micro-pipette. Après centrifugation pendant 5 min à 1000 RPM, on réitère la dissociation des organoïdes intestinaux dans du milieu DMEM/F12 frais. Les cellules sont de nouveau centrifugées pendant 5 min à 1000 RPM. Puis, elles sont suspendues dans du milieu de croissance contenant du Y27 (à 10 μ M, un inhibiteur de ROCK) et déposées sur le gel de PAA. On utilise du Y27 dans certaines étapes plus agressives pour les cellules, car il est connu pour augmenter la survie des

cellules d'organoïdes intestinaux. Ensuite, on laisse adhérer les cellules sur la nuit. Le lendemain, les cellules non-adhérées sont rincées dans une solution de *Advanced* DMEM/F12 avec 10% de fraction volumique de FBS. Enfin, on cultive les cellules dans le milieu de croissance. Le milieu doit être changé tous les deux jours.

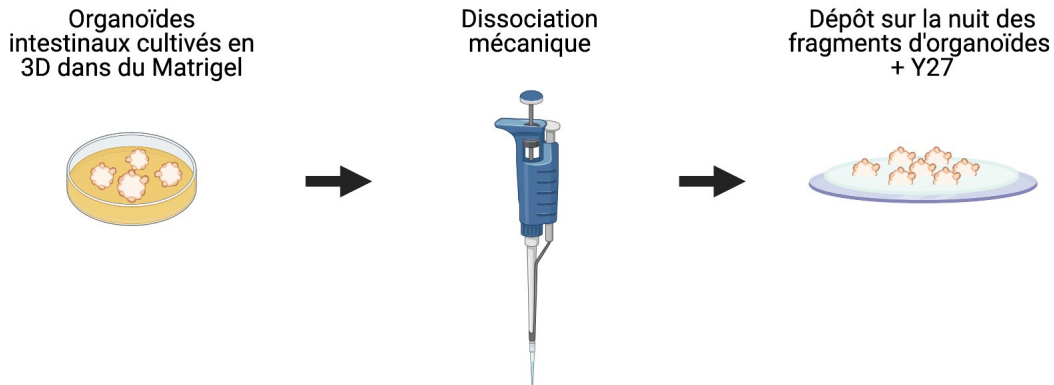


FIGURE II.1 – Schéma des étapes de la dissociation mécanique

- **Dissociation enzymatique** : cette technique permet de déposer des cellules d'organoïdes intestinaux isolées. Grâce à celle-ci, les cellules ne sont pas pré-organisées. Cependant, la survie cellulaire est plus faible, on a donc besoin de plus de cellules au départ. On utilise, en général, deux fois plus d'organoïdes au départ par rapport à la dissociation mécanique.

Pour ce faire, de la même manière que la dissociation mécanique, on dissout tout d'abord le Matrigel en ajoutant du milieu *advanced* DMEM/F12 frais et en exerçant un cisaillement à l'aide d'une micro-pipette. Après transfert dans un tube à centrifuger, les organoïdes intestinaux sont dissociés mécaniquement par cisaillement avec une micro-pipette. Après centrifugation pendant 5 min à 1000 RPM, on réitère la dissociation des organoïdes intestinaux dans du

milieu *advanced* DMEM/F12 frais. Les cellules sont de nouveau centrifugées (pendant la même durée et à la même vitesse). Par la suite, elles sont incubées dans une solution de TrypLE, un réactif cellulaire plus doux que la Trypsin, contenant du Y27 (à 10 μ M) à 37°C. Après 5 min, la réaction est arrêtée avec l'ajout de *advanced* DMEM/F12 contenant 10% de fraction volumique de FBS. Le tout est ensuite filtré, à travers un filtre d'une maille de 30 μ m afin de s'assurer qu'on ne récupère que des cellules isolées. Le filtrat est ensuite centrifugé 5 min à 1000 RPM et le culot est suspendu dans du milieu de croissance contenant du Y27 (à 10 μ M). Par la suite, les cellules sont déposées sur le gel de PAA. On laisse adhérer les cellules sur la nuit. Le lendemain, les cellules non-adhérées sont rincées dans une solution de *advanced* DMEM/F12 avec 10% de fraction volumique de FBS. Enfin, on cultive les cellules dans le milieu de croissance. Le milieu doit être changé tous les deux jours.

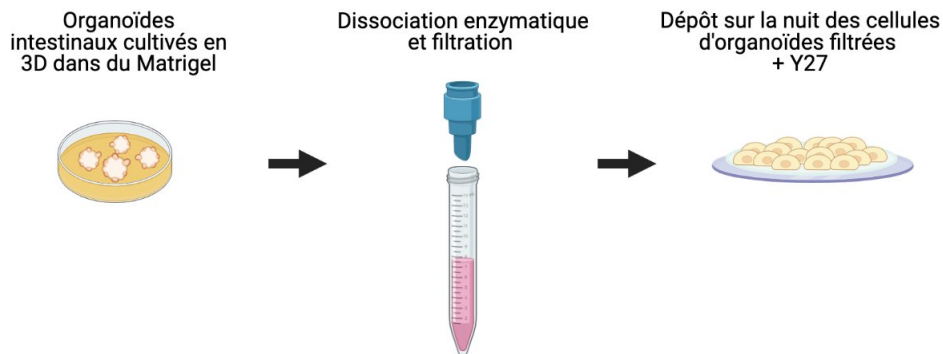


FIGURE II.2 – Schéma des étapes de la dissociation enzymatique

II.2 Préparation des substrats de culture 2D

Afin de cultiver les organoïdes intestinaux en 2D, différentes techniques de revêtement protéique développées dans ce travail seront exposées dans les sections suivantes.

II.2.1 Silanisation du verre

Les organoïdes intestinaux sont cultivés en 2D sur des gels de PAA. Afin de faciliter la manipulation de ces gels, ces derniers sont attachés à des surfaces en verre (lamelles de verre ou boîtes de pétri à fond en verre). Le gel adhère au verre silanisé. Nous exposerons dans cette partie les étapes de la silanisation du verre.

Pour ce faire, le verre est d'abord lavé dans une solution d'éthanol à 96% puis séché. Il est ensuite activé par un plasma d'oxygène et plongé dans une solution de silane pendant 10 min. La solution de silane est composée de 2% de fraction volumique de silane (3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate), 1% de fraction volumique d'acide acétique à 100% et 97% de fraction volumique d'éthanol absolu. Par la suite, le verre est rincé deux fois dans de l'éthanol à 96%. Enfin, le verre recouvert de silane est cuit pendant une heure à 120°C.

Les lamelles de verre ainsi que les boîtes de pétri à fond de verre silanisées peuvent être conservées pendant plusieurs mois dans un environnement propre et pauvre en oxygène.

II.2.2 Préparation des gels PAA sans motif

Les gels de PAA sont des gels biocompatibles dont la rigidité peut varier, dans notre cas entre 7Pa et 21kPa. Lors de ces travaux de thèse deux méthodes de culture des organoïdes intestinaux en 2D ont été développées : une méthode sans motif où

l'entièreté de la surface du gel est adhérente pour les cellules et une méthode avec motif protéiques où les colonies cellulaires sont limitées spatialement selon les formes désirées. Dans cette partie nous exposerons la première méthode.

Pour ce faire, des lamelles de verre propres sont activées avec du plasma d'oxygène puis la surface exposée est incubée pendant au moins 6h à 4°C avec une solution 10% de fraction volumique de Matrigel dans du milieu *advanced* DMEM/F12. Ensuite, on prépare une solution de PAA selon le tableau II.1. Comme exposé dans le tableau II.1, il est possible d'ajouter des billes à la solution de PAA afin de mesurer les forces exercées par les cellules à l'aide de la microscopie de force de traction. La solution bille est obtenue à partir du mélange de 1µL de Flosphères dans 4µL de PBS. On enlève l'excédant de solution de Matrigel dilué et on dépose 24µL de solution finale de gel de PAA entre la lamelle silanisée et la lamelle recouverte de protéines. On laisse polymériser la gel pendant 30 min à 25°C. Les gels sont ensuite plongés dans du PBS pendant une dizaine de minutes. La lamelle recouverte de protéines est détachée du gel avec une pince. On obtient finalement une lamelle de verre silanisée à laquelle est accrochée le gel de PAA recouvert des protéines du Matrigel, majoritairement composé de laminine et de collagène de type IV (fig II.3).

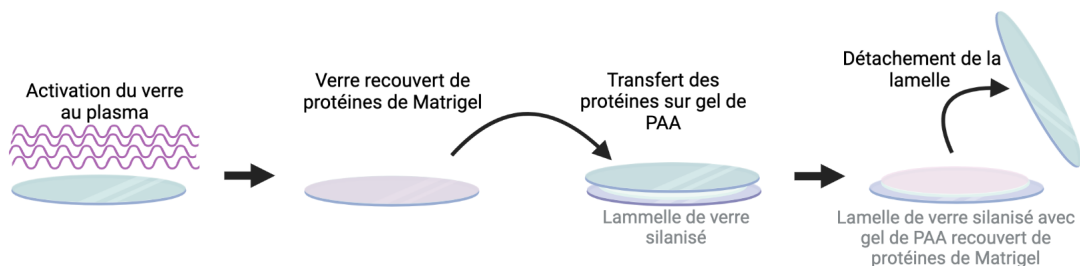


FIGURE II.3 – Schéma des étapes de préparation des gels de PAA sans motif

Les gels ainsi recouverts des protéines du Matrigel peuvent être conservés dans

du PBS pendant quelques heures à 4°C. Il reste préférable de les utiliser au plus vite car l'attachement des cellules d'organoïdes intestinaux devient plus difficile si le gel a été confectionné plus d'une journée avant utilisation.

	Sans bille				Avec billes			
Rigidité théorique (en kPa)	0.23	0.6	2.3	16.3	0.23	0.6	2.3	16.3
Rigidité mesurée (en kPa)	0.37	2.4	5.2	21.2	0.37	2.4	5.2	21.2
Solution stock :								
40% Acrylamide (en mL)	0.625	1.25	1.875	1.5	0.625	1.25	1.875	1.5
2% Bis-Acrylamide (en mL)	0.25	0.375	0.375	0.375	0.25	0.375	0.375	0.375
PBS (en mL)	1.625	0.875	0.25	0.625	1.625	0.875	0.25	0.625
Volume total (en mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Solution finale :								
PBS (en μL)	347	372	372	247	343	368	368	243
Solution stock (en μL)	150	125	125	250	150	125	125	250
Solution bille (en μL)	0	0	0	0	4	4	4	4
10 % APS (en μL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
TEMED (en μL)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Volume total (en μL)	500	500	500	500	500	500	500	500

TABLEAU II.1 – Proportions des composants des solutions de PAA

APS acronyme d'Ammonium Persulfate.

II.2.3 Préparation des gels PAA avec motifs protéiques conditionnés

Nous expliquerons dans cette partie les étapes de la méthode de préparation des gels de PAA avec motifs pour confiner les colonies cellulaires d'organoïdes intestinaux.

Dans un premier temps, il est nécessaire de former des motifs de protéines adhérentes sur les gels. Pour cela, le protocole suivi est celui présenté par les travaux de Balasubramaniam et collègues [8]. Pour ce faire, on recouvre une lamelle de verre

propre de PLL-PEG (Poly-L-lysine et polyéthylène glycole). Les lamelles sont ainsi activées à l'aide de plasma d'oxygène, puis incubées pendant une heure dans une solution de PLL-PEG à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ dilué dans une solution tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) à un pH de 7,4. Après avoir rincé à l'eau et séché les lamelles, celles-ci sont exposées à des rayons UV (ultraviolets) (dans les UV lointains) pendant 10 min sous un masque. L'exposition aux UV va permettre le détachement du PEG de la PLL laissant des acides aminés lysines libres. On incube ensuite la lamelle dans une solution de fibronectine (à $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ diluée dans de l'eau) pendant 30 min. La fibronectine va donc s'attacher aux lysines laissées libres suite à l'exposition aux UV. Le masque permettra de protéger certaines parties de la surface pour obtenir des motifs (fig II.4). On peut ajouter de la fibronectine marquée avec des fluorophores (à $25 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) afin de distinguer les motifs à la surface du gel PAA par microscopie à épifluorescence. Après un lavage à l'eau pour enlever l'excédent de fibronectine, on prépare la solution de gel de PAA selon le tableau II.1 et on la laisse polymériser entre la lamelle recouverte de motif en fibronectine et la lamelle silanisée. Enfin, le montage est plongé dans du PBS et la lamelle non silanisée est détachée avec une pince. On obtient ainsi un gel recouvert de motifs en fibronectine attaché à une lamelle de verre silanisé (fig. II.4).

Dans un second temps, afin de permettre l'adhésion des cellules d'organoïdes intestinaux aux motifs, il est indispensable de conditionner le substrat. En effet, pendant ce travail il a été remarqué que les cellules d'organoïdes intestinaux n'adhèrent pas de façon reproductible à des substrats avec motifs sur du gel de PAA sans conditionnement. Les différents essais de protéines adhérentes à disposition (fibronectine, laminine, collagène de type I et d'une solution des protéines composant le Matrigel) ont montré une adhésion et une survie des organoïdes très difficile. Le conditionnement au préalable des motifs de fibronectine par d'autres cellules plus adhésives

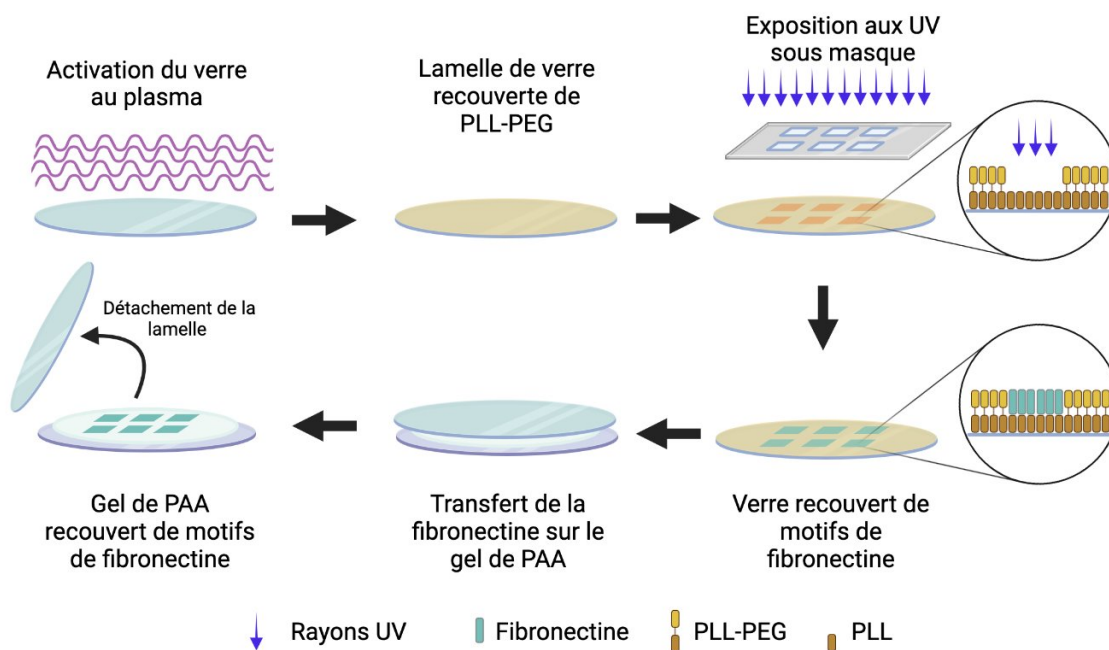


FIGURE II.4 – Schéma des étapes de reproduction de motifs sur gel de PAA

rend possible l'attachement de cellules d'organoïdes intestinaux de façon reproductible. On entend ici par conditionnement le fait de laisser pendant plusieurs heures les cellules à confluence sur les motifs protéiques. Elles peuvent ainsi remodeler les protéines adhérentes existantes et en ajouter afin d'augmenter l'attachement des organoïdes intestinaux au substrat.

On utilise ici des cellules MCF10A pour la conditionnement des motifs protéiques car elles sont connues pour déposer des composés de la matrice extra-cellulaire, comme la laminine 5 (se référer au chap. IV pour plus de détails). Ainsi, des cellules MCF10A sontensemencées sur les gels de PAA avec motifs de fibronectine. Au bout de 3 heures, les cellules non-adhérées aux motifs sont rincées avec du PBS. On laisse ensuite les cellules adhérentes coloniser et conditionner les motifs. Après 24 heures, les cellules MCF10A sont détachées à l'aide d'un chélateur, l'EDTA à 20 mM dans

une solution de PBS sans calcium ni magnésium. Après 2 heures d'incubation, les cellules MCF10A sont rincées. On obtient ainsi un gel de PAA comprenant des motifs adhérents pour des cellules d'organoïdes intestinaux (fig. II.5). Les gels une fois conditionnés peuvent être conservés pendant quelques heures à 4°C dans du PBS. Il reste préférable de les utiliser au plus vite pour les cellules d'organoïdes intestinaux.

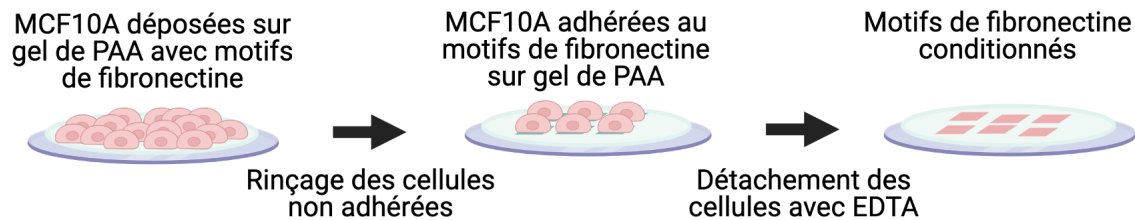


FIGURE II.5 – Schéma des étapes de conditionnement des gels de PAA à motif

Les cellules MCF10A sont cultivées dans du milieu DMEM-F12 (11039-021, Gibco) contenant 1% de penicilline-glutamine, 10 g/mL d'insuline humaine (I9278, Sigma Aldrich) et 100 ng/mL de toxine de cholera (C8052, Sigma-Aldrich), 0.5 mg/mL d'hydrocortisone (Sigma Aldrich), 5% de sérum de cheval et 20 ng/ml EGF (Pepro-Teck).

Ainsi, en utilisant la méthode de dépôt des cellules isolées décrite plus haut (section II.1.5), les cellules d'organoïdes intestinaux peuvent êtreensemencées sur le gel de PAA et être confinées dans des micro-motifs (fig. II.6).

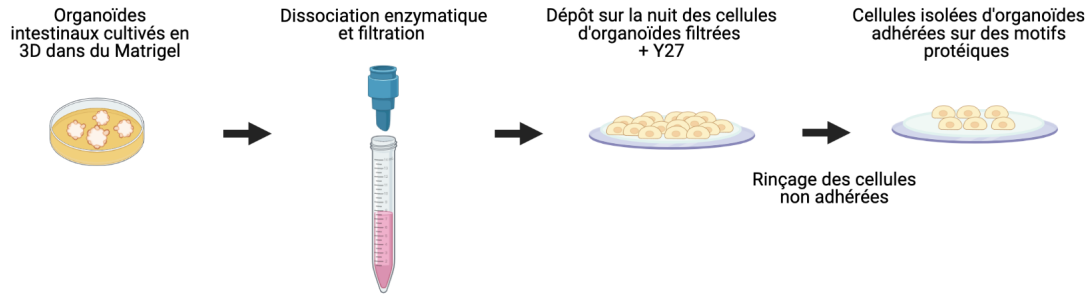


FIGURE II.6 – Schéma de dépôt des cellules isolées d’organoïdes intestinaux sur des substrats conditionnés

II.3 Marquage immunologique

Dans les travaux de cette thèse, la technique du marquage immunologique est utilisée pour pouvoir distinguer certaines populations cellulaires ou repérer certaines protéines du cytosquelette. Nous exposerons ainsi dans cette section les étapes des méthodes utilisées.

II.3.1 Fixation et Marquage

— Marquage routinier :

Après fixation des cellules dans une solution de PFA (paraformaldéhyde) (4% de fraction volumique dans du PBS) pendant 15 min, les cellules sont rincées trois fois au PBS pendant 5 min. Les cellules sont ensuite perméabilisées dans une solution de Triton X-100 (0,1% de fraction volumique dans du PBS). Les cellules sont de nouveau rincées trois fois dans du PBS, puis incubées à température ambiante dans une solution de FBS (10% de fraction volumique dilué dans du PBS). Cette étape d’incubation permet de bloquer les sites aspécifiques. Après une heure d’immersion dans la solution de blocage, les cellules sont incubées dans une solution contenant les anticorps primaires sur la nuit

à 4°C. Les différents types d'anticorps primaires utilisés ainsi que leur concentration sont indiqués dans le tableau II.2. Tous les anticorps sont incorporés dans une solution de FBS dilué à 1% de fraction volumique dans du PBS.

Dans un deuxième temps, les échantillons sont rincés trois fois dans du PBS. Puis ils sont incubés dans une solution contenant les anticorps secondaires pendant 2h à température ambiante. Le tableau II.2 indique les anticorps secondaires utilisés, leur concentration, ainsi que l'anticorps primaire avec lequel ils ont été associés. De la même manière que les anticorps primaires, les anticorps secondaires sont dilués dans une solution de FBS (1% de fraction volumique dans du PBS). Par ailleurs, à cette étape, on peut ajouter du Hoechst (dilué au 10000^{ème}) pour marquer les noyaux, ainsi que de la phalloïdine liée à un fluorophore pour marquer l'actine polymérisée. Les concentrations des différentes phalloïdines utilisées sont données dans le tableau A.2.

Enfin, les échantillons sont rincés de nouveau trois fois dans du PBS puis montés dans du Prolong ou du Vectashield. Le montage se fait sur une lamelle de microscopie de manière à imager les échantillons à l'envers sans passer à travers le gel de PAA. Après polymérisation du milieu de montage à température ambiante sur la nuit, les échantillons doivent être conservés 4°C. Ils peuvent être imagés jusqu'à plusieurs mois après le marquage.

— Marquage Edu :

Ce travail de thèse mesure les cellules en phase S grâce au kit de prolifération Click-iT EdU Alexa Fluor.

Les cellules sont tout d'abord incubées avec l'EdU pendant 30 min. Pour cela, on introduit 2 μ L de solution de EdU (à 2,5 $mg.ml^{-1}$ dans du DMSO) dans

Protéine d'intérêt	Espèce	Dilution	Emission
Ecadherine	rat	1/100	
villin	souris	1/100	
lysozym	lapin	1/100	
Ecadherine	souris	1/100	
LGR5	lapin	1/100	
Phalloïdine		1/100	647
anti-rat	chèvre	1/100	647
anti-souris	chèvre	1/100	488
anti-souris	chèvre	1/100	568
anti-lapin	chèvre	1/100	488
anti-lapin	chèvre	1/100	568

TABLEAU II.2 – Liste des anticorps utilisés

Les références et fournisseurs de chaque anticorps sont exposés dans le tableau A.1.

1 mL de milieu, puis on ajoute cette solution au 1 mL de milieu déjà présent sur les cellules en culture. Après 30 min d'incubation, on rince une fois les cellules au PBS et on fixe avec une solution de PFA à 4%. Après 15 min d'incubation, on rince une fois l'échantillon au PBS, et on perméabilise pendant 10 min dans une solution de Triton X-100 (0,1% de fraction volumique dans du PBS). Pendant ce temps, on prépare la solution cocktail comme indiqué dans le tableau II.3. On rince l'échantillon une fois au PBS, puis on incube les échantillons pendant 30 min à température ambiante avec la solution cocktail. Il est préférable d'utiliser 500 μ L de solution par échantillon. On rince de nouveau les échantillons une fois avec du PBS. Si on désire compléter ce marquage EdU avec d'autres marquages, il suffit de reprendre les étapes exposées dans la section II.3.1 ci-dessus à partir du blocage.

Enfin, de la même manière que pour les marquages classiques, les échantillons sont montés dans du Prolong ou du Vectashield. Ils peuvent être conservés à 4°C pendant plusieurs mois.

Cocktail	500μl	200μl	100μl
D= 1x Click-iT solution tampon de réaction (4°C)	430	172	86
CuSO ₄ (4°C)	20	8	4
B= Alexa Fluor (-20°C)	2	1	0.5
F=Solution tampon additive (-20°C)	50	20	10

TABLEAU II.3 – Proportion des différents composants de la solution cocktail pour le marquage EdU

II.4 Microscopie

II.4.1 Imagerie des monocouches fixées

L'acquisition d'image des échantillons fixés a été effectuée soit sur une microscope confocal LSM780 (de Zeiss, installé avec le logiciel Zen), soit sur un microscope confocal à disque rotatif CSU-X1 (de Zeiss, installé avec le logiciel Zen). Les objectifs utilisés sont les suivants : objectif x10/0,45NA Plan-Apochromat immersion à air, objectif x25/0.8NA Plan-Apochromat immersion à huile, objectif $\times 40/1.3\text{NA}$ Plan-Apochromat immersion à huile et objectif $\times 63/1.4\text{NA}$ Plan-Apochromat immersion à huile.

II.4.2 Imagerie des monocouches vivantes

Les cellules d'organoïdes H2B-mCherry ont été imagées à l'aide d'un microscope confocal à disque rotatif CSU-W1 (Leica, installé avec le logiciel MetaMorph). Les images sont effectuées avec un objectif x10/0,45NA Plan-Apochromat immersion à air. Les cellules d'organoïdes Villin-tomato ont été imagées quant à elles à l'aide d'un microscope confocal à disque rotatif CSU-X1 (de Zeiss, installé avec le logiciel MetaMorph) et un objectif x25/0.8NA Plan-Apochromat immersion à huile.

II.5 Analyse d'images

Dans cette partie nous décrirons comment les mesures sur les images des cellules fixées ou en mouvement ont été effectuées. Hormis les analyses effectuées de manière automatisée décrite dans les sous-sections qui suivent, les mesures ont été réalisées à la main à l'aide de Fiji. Par ailleurs, les tests statistiques ont été exécutés sur Prism (du logiciel GraphPad, San Diego, CA, USA, version 7.0).

II.5.1 Mesure de la proportion de cellules positives LGR5 et EdU

Afin de mesurer la quantité de cellules souches LGR5+, et de cellules en prolifération, positives au marquage EdU, un grand nombre d'images des monocouches cellulaires à faible grossissement a été effectué. Par échantillon, 10 à 15 champs positionnés de façon aléatoire à l'objectif 10x ont été imagés.

Ensuite, la quantité de cellules est mesurée à partir du marquage des noyaux au Hoechst en suivant la méthode utilisée dans les travaux de d'Alessandro et collègues [28] ainsi que Golé et collègues [59]. De la même manière, le nombre de cellules en prolifération ou de cellules souches est mesuré à partir d'un marquage EdU du noyau ou d'un marquage LGR5 avec des anti-corps (fig. II.7).

II.5.2 Analyse des vitesses moyennes des cellules à l'aide de la PIV

L'analyse de la vitesse des cellules par PIV (vélocimétrie par images de particules ou *Particle Image Velocimetry*) a été effectuée sur le mouvement des noyaux des cellules. Pour ce faire, des cellules H2B mCherry était imagées toutes les 30 min. Avant de réaliser la PIV, les images ont été rapidement traitées sur Fiji afin de faire

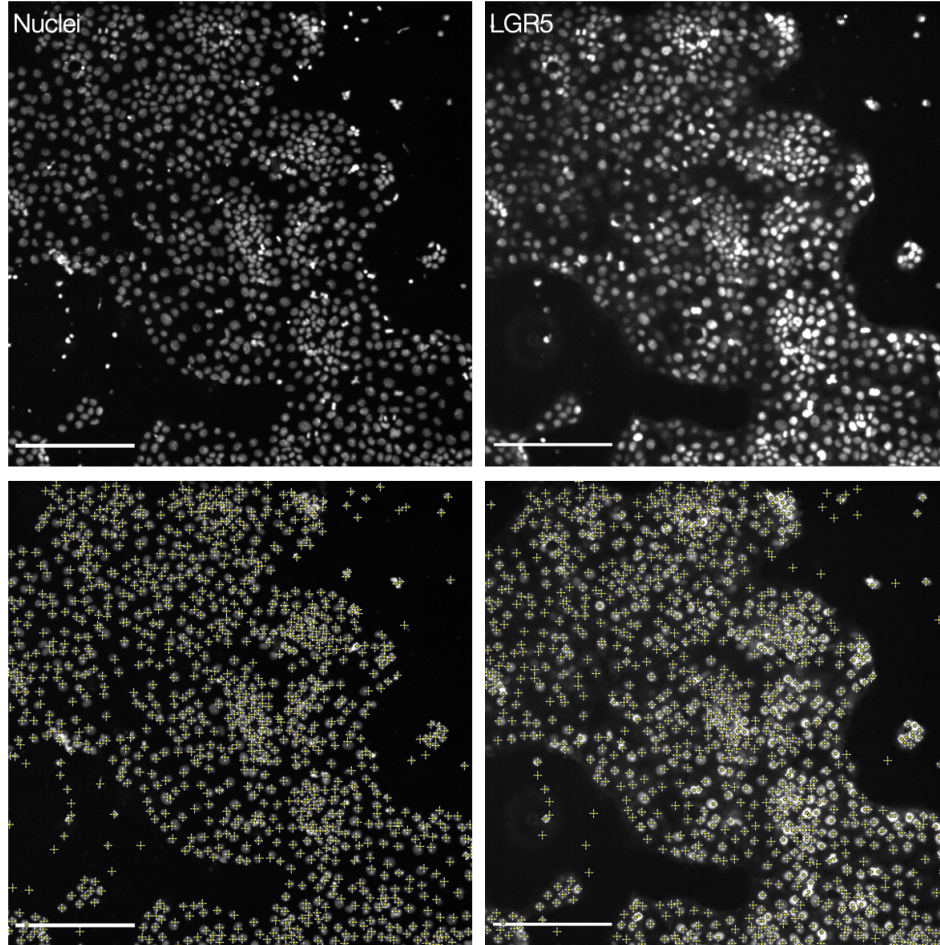


FIGURE II.7 – Exemple de cellules repérées automatiquement

A gauche : l'ADN marqué au Hoechst permet de repérer le nombre total de cellule. **A droite** : le marquage LGR5 permet de quantifier le nombre de cellules souches. Chaque cellule repérée automatiquement est marquée d'une croix jaune. Barre d'échelle : 200 μm .

ressostir le signal des noyaux et atténuer le bruit de fond. Pour la PIV, la méthode exposée dans le travail de Peyret et collègues a été utilisée [119]. MatPIV (du logiciel MatLab version 2021a) a été utilisé avec une fenêtre de 58 pixels.

La PIV a été utiliser afin de mesurer plusieurs choses : la vitesse moyenne à l'intérieur et à l'extérieur des cryptes ainsi que le champ des vitesses dans et autour des crypte.

Nous décrirons dans cette partie comment ces deux analyses ont été effectuées.

— **Mesure des vitesses moyennes à l'intérieur et à l'extérieur des cryptes :**

la PIV a été effectuée sur 4 champs pour 2,4 kPa et 6 champs pour 21 kPa. Les vitesses sont moyennées sur 18h pour les deux rigidités, qui correspond au temps de vie le plus court des cryptes. Les moyennes sont calculées à partir de 36h après le dépôt des cellules pour 2.4 kPa et 56h après le dépôt des cellules pour 21 kPa. Ces temps de départ ont été choisis pour pouvoir capturer le mouvement cellulaire dans le plus de cryptes possible. En effet, ils correspondent au temps moyen d'apparition des cryptes sur chaque rigidité. Ensuite, les régions cryptes, dont le centre a été préalablement repéré à la main, sont définies dans un carré de 360 μm pour 2,4 kPa et un carré de 300 μm pour 21 kPa autour de chaque crypte (fig. II.8). 360 μm et 300 μm correspondent au diamètre moyen des cryptes sur 2,4kPa et 21 kPa respectivement. La vitesse moyenne à l'extérieur des cryptes est calculée sur le reste de la monocouche.

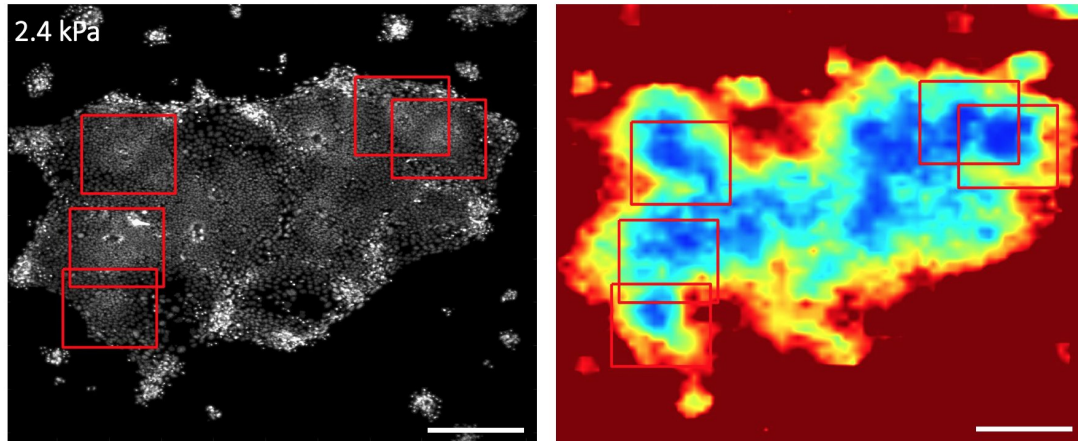


FIGURE II.8 – Exemple de cryptes repérées et encadrées sur des monocouches de 2,4 kPa.

A gauche, image en fluorescence des cellules H2B mCherry. **A droite**, norme des vitesses moyennes des cellules extraites à partir de la PIV. Barre d'échelle : 360 μm .

- **Champs des vitesses autour et dans les cryptes :** Le centre des cryptes a tout d’abord été suivi à la main au cours du temps. 15 cryptes sur les substrats de 2.4 kPa et 23 cryptes sur les substrats de 21 kPa ont été suivies à la main. Ensuite, pour chaque crypte et à chaque pas de temps, la PIV est extraite dans un carré de 600 μm de côté centré sur la crypte. Les vitesses sont ensuite moyennées sur le temps pendant toute la durée de vie de la crypte. Afin de connaître la direction de l’écoulement des cellules, un angle α est défini comme l’angle direct que forme le vecteur moyen avec l’axe des abscisses (fig. II.9). Les champs de vitesses moyennés dans le temps sont ensuite pivotés de cet angle α pour que le sens de l’écoulement des cellules soit le même pour toutes les cryptes (fig. II.9). Après la rotation, le vecteur moyen d’écoulement est parallèle et orienté dans le même sens que l’axe des abscisses. Enfin, les champs de vitesse sont moyennés sur toutes les cryptes pour chaque rigidité.

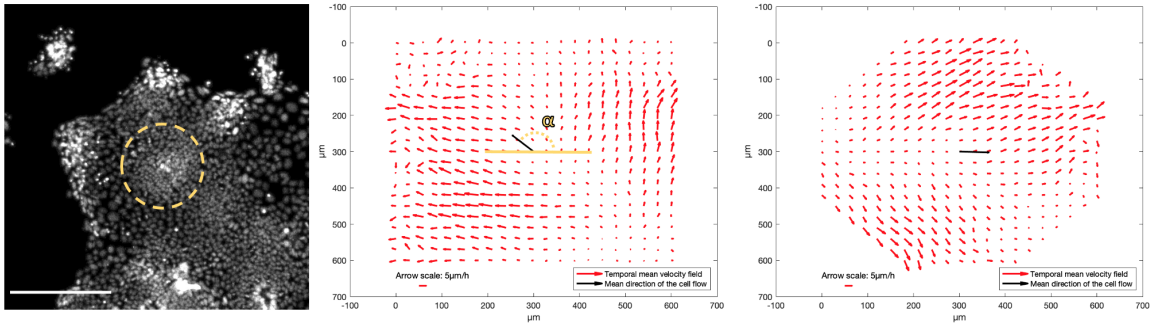


FIGURE II.9 – Exemple de rotation du champ de vitesse d’une crypte selon l’écoulement moyen sur un gel de 2.4 kPa.

A gauche, image des noyaux cellulaires de la crypte étudiée et entourée en jaune. Barre d’échelle : 200 μm . **Au centre**, en rouge, champ des vitesses moyennées sur le temps pendant toute la durée de vie de la crypte. En noir, vecteur montrant l’écoulement moyen sur le temps et l’espace. En pointillés jaunes, l’angle α , l’angle direct que forme le vecteur de l’écoulement moyen sur le temps et l’espace avec l’axe des abscisses. **A droite**, rotation des vitesses de α .

II.5.3 Segmentation et suivi des cellules

Afin de suivre les cellules des domaines de crypte et à proximité, une méthode de segmentation et de suivi des cellules a été mise en place.

Avant de segmenter les cellules, une projection moyenne en z sur 3 μm a été effectuée sur la partie basale des cellules à l'aide de Fiji (fig. II.10). Ces images ont ensuite été utilisées en entrée dans l'algorithme de "*deep learning*" permettant la segmentation : Cellpose [148]. Afin d'obtenir une segmentation optimale, les paramètres ont été établis de la manière suivante : "*cell probability threshold*" était fixé à -6, "*flow probability threshold*" était fixé à -6 et la diamètre à 12,74 μm . Ce procédé a permis d'obtenir en sortie un masque indiquant le contour des cellules.

Par la suite, TrackMate a été utilisé afin de suivre les cellules dans le temps et l'espace [45, 156] avec comme image d'entrée le masque produit par Cellpose. Le mode de détection utilisé était "*Mask detector*". Les objets trop petits ou les traces suivies pendant moins de 14 heures ont été exclues (fig. II.10).

Enfin, la crypte est délimitée à la main en utilisant Fiji. Puis les données produites en sortie par TrackMate ont été analysées à l'aide de Python.

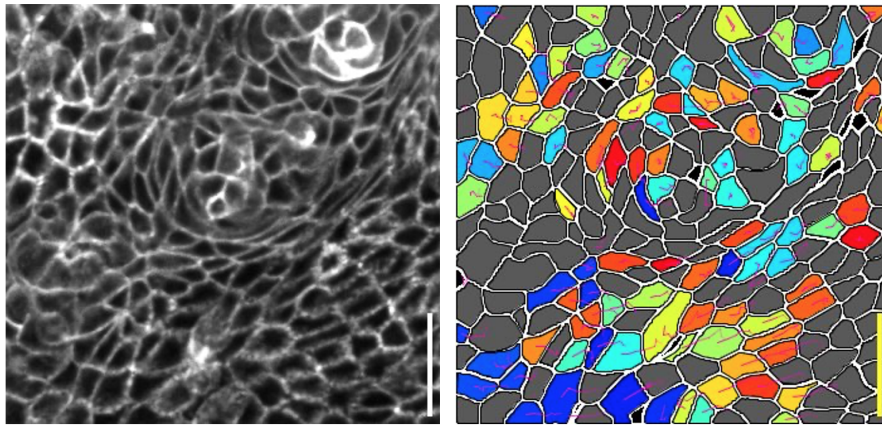


FIGURE II.10 – Exemple de segmentation et de suivi de cellules villin-tomato centré sur un domaine de crypte.

A gauche : image de la projection moyenne du signal des membranes au niveau basal sur $3\mu\text{m}$. Cette image a été prise 64 heures environ après le dépôt des cellules. **A droite** : segmentation et suivi des cellules sur quelques pas de temps. Les couleurs indiquent les différentes cellules suivies dans le temps. Les traînées en magenta indiquent le chemin parcouru par chaque cellule pendant un peu moins d'une heure. Barre d'échelle : $30\mu\text{m}$.

Chapitre III

Auto-organisation des cellules de l'épithélium intestinal en domaines de crypte sur des gels plans de PAA

Pendant mon travail de thèse, je me suis intéressée à essayer de comprendre comment à partir d'un épithélium homogène (ici intestinal) les cellules se différencient et s'auto-organisent pour former un tissu complexe. Par exemple, lors du développement, une cellule oeuf engendre des milliards de cellules qui s'organisent en un embryon. La très grande reproductibilité de la forme des tissus observés lors de ce processus complexe suggère l'existence d'un flux d'informations produites, lues et interprétées par les cellules. Les flux d'informations peuvent être structurés de manière auto-organisée ou programmée. Nous intéresserons dans ce travail plus particulièrement à l'auto-organisation des cellules entre-elles.

D'un point de vue physique, à partir d'un ensemble d'objets homogènes présentant des fluctuations aléatoires par rapport à la moyenne, l'auto-organisation explique comment des structures complexes émergent d'interactions locales (ici entre cellules).

Par exemple, dans le travail de A.E. Shyer et collègues exposé plus haut, les auteurs montrent comment *in vivo* des follicules de plumes émergent de l'épithélium de poulet originellement homogène [143]. Les auteurs expliquent que les fluctuations mécaniques engendrent l'apparition d'amas auto-organisés de cellules du mésenchyme. Ces amas poussent sur les cellules de l'épiderme et entraînent leur différenciation en follicule de plume. De la même manière *in vitro*, Q. Smith et collègues montrent que les cellules souches humaines pluripotentes induites s'auto-organisent lorsqu'elles sont contraintes spatialement sur des motifs de protéines adhérentes. Les auteurs expliquent qu'une tension précoce, ressentie par les cellules en périphérie des motifs, les dirige vers une voie de différenciation endothéliale [144]. De plus, la rigidité du substrat influence le destin cellulaire des cellules souches mésenchymateuses uniques [43]. Cependant l'impact de la rigidité du substrat sur l'auto-organisation des cellules souches reste peu connu.

Pour aborder cette question, notre tissu modèle est l'épithélium intestinal. C'est un tissu épithélial qui forme une frontière entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme. D'une part, il possède une architecture stéréotypée en cryptes et villosités. D'autre part, il se renouvelle très rapidement, en 3 à 5 jours chez l'humain, pour répondre aux nombreuses stimulations auxquelles il est exposé. Le renouvellement du tissu se fait à partir des cellules souches LGR5+ qui se trouvent dans la niche au fond des cryptes intestinales. Ces dernières vont se diviser, sortir de la niche pour entrer dans une zone dite TA. Dans cette zone TA, les cellules prolifèrent et commencent à se différencier. Elles vont ensuite sortir de la zone TA et migrer activement le long de la villosité. Au cours de cette migration, les cellules se différencient et donnent tous les types cellulaires nécessaires au bon fonctionnement de l'organe. Enfin, les cellules sont extrudées au sommet de la villosité. La structure crypte-villosité avec la présence de différents types cellulaires, en particulier la population de cellules souches

adultes font de l'épithélium intestinal un modèle idéale d'étude de l'effet de l'environnement mécanique, en jouant sur la rigidité du substrat, sur l'auto-organisation et la différenciation cellulaire. De plus, la culture d'organoïdes intestinaux développée ces dernières années apporte un outil précieux et puissant à l'étude de ce tissu.

Ainsi, ce travail propose d'étudier l'effet de la rigidité du substrat sur la formation et le maintien des domaines de prolifération d'organoïdes intestinaux plans. Pour ce faire, une méthode de culture des organoïdes en 2D sur gels plans de PAA a été développée. Les fragments d'organoïdes déposés sur les gels se déplient et colonisent la surface. Des domaines de densité cellulaire plus élevée se distinguent. Ils sont peuplés de cellules de crypte (cellules de Paneth et cellules LGR5+) dont certaines sont prolifératives. Les domaines de cryptes sont séparés des cellules différenciées par de longs câbles d'acto-myosine supracellulaires. Ce travail montre que l'augmentation de la rigidité du substrat réduit la hauteur, la densité et la prolifération cellulaire des domaines de crypte.

J'ai voulu par la suite étudier la capacité des cellules souches intestinales à se différencier et à s'organiser à partir d'une population homogène. Pour cela, j'ai utilisé des cellules d'organoïdes intestinaux dissociées entièrement. C'est une population cellulaire homogène majoritairement constituée de cellules souches. J'ai montré que les cellules d'organoïdes intestinaux complètement dissociées s'auto-organisent en domaines de crypte et différenciés à partir d'une population cellulaire homogène et riche en cellules souches. La prolifération cellulaire et la population de cellules souches LGR5+ est maintenue dans les domaines de crypte; tandis que la prolifération et la quantité de cellules souches LGR5+ diminuent autour des domaines de crypte. L'augmentation de la rigidité du substrat diminue significativement la prolifération cellulaire. Sur les substrats rigides, les domaines de crypte possèdent une taille réduite et constante au cours du temps. Par ailleurs, la réduction de la contrac-

tilité via le KO de la myosine IIA affecte le maintien des domaines de crypte et la prolifération cellulaire. En conclusion, ces résultats démontrent que des domaines prolifératifs et différenciés s'auto-organisent à partir d'une population homogène de cellules d'organoïdes intestinaux sur des gels plans de PAA en l'absence de cellules mésenchymateuses et de courbure.

Ces travaux se présentent sous forme d'article dans la section suivante. L'article est encore en préparation et n'a pas encore été soumis. En effet, pour des raisons techniques certains marquages de cellules souches n'ont pas pu être effectués. De plus, la mesure des forces exercées par les cellules sur le substrat sont en cours d'analyse et devraient être ajoutées par la suite.

III.1 Les cellules d'organoïdes intestinaux s'auto-organisent en domaines de crypte et domaines différenciés sur des gels plans

Spontaneous intestinal crypt domain auto-assembly on planar compliant substrates

Mercier Barbara, Xi Wang, Frenoy Olivia, Anger Lucas, d'Alessandro Joseph, Saleh Jad,
Ladoux Benoit, Delacour Delphine and Mège René Marc

Université Paris Cité, CNRS, Institut Jacques Monod, F-75013 Paris, France

Abstract

Morphogenesis and tissue homeostatic renewal result from a complex crosstalk between genetic regulation programs, and cellular self-organization processes which are in part controlled by physical parameters such as cell and tissue mechanics. However, the impact of mechanics on homeostatic tissue renewal and tissue stem cell niche maintenance remains poorly understood. Here we addressed this question using the intestinal epithelium cultured on 2D surfaces as a model system. The single layered intestinal epithelium comprises different cell types issued from a single lineage whose spatial distribution follows the crypt/villus axis in function of their birth date and differentiation status. Stem cells which allow a rapid renewal of the epithelium are located in the crypts. Cells committed to differentiate exit the crypt to proliferate in the transitory amplifying zone from where they further migrate actively along the villus as differentiated cells. To question the role of mechanical constraints on the self-organization and maintenance of intestinal crypts, the niche of stem cells, we cultured mouse intestinal organoid cells on 2D Matrigel-coated polyacrylamide gels of controlled stiffness. We observed the emergence of crypt-like domains containing Paneth cells and LGR5⁺ stem cells, comparable to the crypt domains found in intestinal organoids in three dimensions *in vitro* as well as *in vivo*. Crypts were characterized by a very high density of cells that are more columnar than the surrounding differentiated cells. The height, density and proliferation of crypt cells decrease with increasing substrate stiffness. The crypts are surrounded by highly elongated cells aligned tangentially to the cryptic domains forming a boundary between the two domains. This boundary is characterized by tangentially aligned supra-cellular acto-myosin cables. By plating fully dissociated cells, we further showed that crypts emerge in two to three days out of an initially homogeneous monolayer of cells rich in LGR5⁺ cells. During this process, proliferation was maintained and cell density increased in the cryptic domains, while LGR5⁺ cells density and proliferation decreased in area around, populated of differentiated cells, recalling the scenario observed during the development of the intestinal epithelium *in vivo*. An increased substrate rigidity impaired this process, due to a drastic reduction of precursor cell proliferation. In addition, the knock-out of myosin IIA strongly impaired both precursor cell proliferation and crypt-domain maintenance. These results therefore suggest that crypts can be formed and maintained without curvature of the epithelium by a joint contribution of proliferation pressure and the formation of a myosin IIA-dependent boundary between the proliferative and differentiated cell domains. Altogether, they contribute to a better understanding of the cellular mechanisms related to the development and homeostatic renewal of the intestinal epithelium.

Introduction

Morphogenesis and tissue homeostatic renewal result from a complex crosstalk between genetic regulation programs and self-organization processes at subcellular and cellular level (Collinet and Lecuit, 2021). During these processes, cell differentiation, cell shape adaptation, cell sorting, cell populations self-organization and boundary formation are highly dependent on the mechanical properties of cell themselves and of their environment (tissue stiffness, adhesion energy, cell contractility, cortical tension, internal stiffness, cell crowding) (Collinet and Lecuit, 2021; Gomez-Galvez et al., 2021). *In vitro*, the mechanical properties of the substratum such as its compliance and geometry have been shown to impact cell proliferation and extrusion, as well as stem cell fate determination and epithelial integrity (Engler et al., 2006; Le et al., 2021; Nelson et al., 2005) (BioRxiv Doi.org/10.1101/2022.03.10.483785). However, the impact of the mechanical cues on tissue stem cell niche maintenance and homeostatic tissue renewal remains poorly understood.

The single layered intestinal epithelium (IE) is an attractive model system in order to study auto-organization of complex cell populations, tissular compartmentalization and the influence of mechanics these processes. The adult IE is maintained under dynamic equilibrium of cell proliferation, migration, differentiation and cell extrusion (van der Flier and Clevers, 2009; Wells and Spence, 2014). It comprises different cell types issued from a single lineage whose spatial distribution follows the crypt/villus axis in function of cell birth date and differentiation status. The rapid (a few days) IE homeostatic renewal relies on the continuous proliferation/self-renewal of stem cells that reside in tissue invaginations known as crypts (Barker et al., 2007; Clevers, 2013; Gehart and Clevers, 2019). Stem cells generate transit-amplifying (TA) cells that, after several rounds of division while migrating along the crypt-villus axis, differentiate mainly in absorptive enterocytes and in minor proportions of secretory cells. One of these type of secretory cells, the Paneth cells however stay in the crypt where they contribute to the stem cell niche. Altogether, these stem, proliferating and differentiated cells form a continuous cohesive monolayer that lines all the inner surface of the intestine. The apparently homeostatic IE cells are thus submitted to a continuous tread milling with constant addition of new cells in the crypt and TA zone, active migration of differentiated cells along the villus and extrusion of apoptotic cells at the tip of the villus (Krdinija et al., 2019; van der Flier and Clevers, 2009).

The situation is somehow different during IE developmental stages. The distribution and proliferation of precursor cells is initially uniform along a pseudostratified epithelium layering the gut tube (Spence et al., 2011; Sumigray et al., 2018; Wells and Spence, 2014). Villi

progressively form in response to the appearance of underlying mesenchymal cell clusters. Then, proliferation is restricted to inter villi regions prefiguring crypt domain that further invaginate to form crypts where proliferation is sustained (Kwon et al., 2020). The formation of crypt domains is under the control of Turing chemical instabilities involving growth factor and paracrine cues produced by the underlying mesenchymal cells, as well as epithelial cells themselves (Spence et al., 2011; Sprangers et al., 2021; Wells and Spence, 2014). The emergence of crypt domains is initiated by the underlying mesenchyme followed by their invagination initiated by apical constriction of cells present in these zones (Sumigray et al., 2018; Yang et al., 2021). The maintenance of IE stem cells (LGR5⁺ cells) and their companion cells (Paneth) in the adult crypt is controlled by a similar production of niche factors (WNT3, DLL4, EGF and Noggin) by epithelial (Paneth cells) and mesenchymal cells (Barker, 2014; Sprangers et al., 2021; Tan and Barker, 2014; van der Flier and Clevers, 2009). During intestinal repair or regeneration, the reformation of the niche follows a different route where TA cells and even differentiated cells may convert in LGR5⁺ stem cells (Barker, 2014; Sumigray et al., 2018; Tan and Barker, 2014).

However, crypt domains can form, and stem cells maintained, in 3D organoids in absence of mesenchymal cells, in the presence of soluble growth factors added to the culture medium (Kwon et al., 2020; Sato and Clevers, 2013; Sato et al., 2009). Crypt domains containing LGR5⁺ stem cells and Paneth cells spontaneously bud out of the closed cystic structures forming IE organoids that may recapitulate the regeneration/repair processes observed *in vivo* (Serra et al., 2019; Sprangers et al., 2021; Wang et al., 2019). Liberali and colleagues have shown that crypt bud out of organoids generated by single cells through a rupture of symmetry initiated by the appearance of a cell differentiating in a Paneth cell (Serra et al., 2019). In 3D organoids, a contribution of apical construction and mechano-osmotic forces has been proposed to initiate crypt formation (Yang et al., 2021). By culturing organoids cells on 2D surfaces, Trepap and colleagues have shown that crypt domain cells apply forces on the underlying matrix that may contribute also to crypt invagination (Perez-Gonzalez et al., 2021). In another study, Lutolf and colleagues have shown that crypt budding can be induced in 3D organoids by softening of the 3D matrix (Gjorevski et al., 2016) and tissue geometry (Gjorevski et al., 2022).

However, it remains unclear how crypt domains are initiated and maintained *in vitro* and their exact inter-relation with the invagination process. Thus, we initiated the analysis of crypt formation on 2D surfaces. Various studies have reported the formation of crypt domains in 2D (Altay et al., 2019; Kim et al., 2018; Perez-Gonzalez et al., 2021; Wang et al., 2019), but

however failed to clearly answer this question. In a previous study we analyzed the importance of substrate elasticity in guiding planar IE growth, focusing on the organization of villus like domains containing differentiated cells we call here differentiation domains (Xi et al., 2022). In the present study, using similar approaches, we analyze the formation and maintenance of crypt-like domains and the impact of substrate rigidity on these processes.

Material and methods

Reagents and chemical

To constitute the expansion medium, DMEM (#31966021, with high glucose, GlutaMAX™ Supplement and pyruvate), GlutaMAX™ (#35050061), penicillin-streptomycin (#15140122), Geneticin™ (#10131035), hygromycin B (#10687010) and Advanced DMEM/F-12 (#12634010) were from Thermo Fischer Scientific, the fetal bovine serum (# S1810) was from Biowest and the L-WRN cells (#CRL-3276) were from ATCC.

Before the seeding of the cells on the polyacrylamide, the intestinal organoids were cultured in Matrigel® Basement Membrane Matrix (#CLS354234) from Corning. During the seeding of the intestinal organoid cells, we used TrypLE™ Express Enzyme (#12605010) from Thermo Fischer Scientific, for the enzymatic dissociation, and a selective ROCK inhibitor Y-27632 dihydrochloride (#72304) from StemCell. Myosin II KO was induced using 4-Hydroxytamoxifen Ready Made Solution (#SML1666-1ML) from Sigma-Aldrich.

To prepare the polyacrylamide gels, TMED (#17919) and DPBS (#14190094) were from Thermo Fischer Scientific, the 40% acrylamide solution (#1610140), 2% bis-acrylamide Solution (#1610142) and ammonium persulfate (#1610700) were from Bio-Rad, and the 3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate (#440159) was from Sigma-Aldrich. Additionally, the gel protein coating was performed with either Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix (#CLS354230) or Matrigel® Basement Membrane Matrix (#CLS354234) from Corning.

Finally, immunostainings were performed using Triton™ X-100 (#X100-100ML) from Sigma-Aldrich and formaldehyde (#28908) from Thermo Fischer Scientific. Samples were mounted either in VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium (#H-1000-10) from Vector Laboratories or in ProLong™ Diamond Antifade Mounting Medium (#P36961) from Thermo Fischer Scientific. To stain the nuclei, we used Hoechst 33342 (#H3570) from Invitrogen. To measure the proliferation, we used Click-iT™ EdU cell proliferation kit for imaging either conjugated with Alexa Fluor™ 488 dye (#C10337) or Alexa Fluor™ 647 dye (#C10340) from Invitrogen. Monoclonal anti-uvomorulin/E-cadherin antibody produced in rat (#U3254) and anti-laminin antibody produced in rabbit (#L9393) were from Sigma-Aldrich. LGR5 (GPR49 or GPR67) rabbit polyclonal antibody (#50630) was from BiCell. Lysozyme EC 3.2.1.17 polyclonal rabbit antibody (#A0099) and villin mouse monoclonal (1D2 C3) antibody (#M3637) were from Dako. Myosin phospho S19/phospho S20 rabbit polyclonal antibody

(#600-401-416) was from Rockland. F-actin was stained with Alexa Fluor™ 647 Phalloidin (#A22287) from Thermo Fischer Scientific. Rabbit polyclonal anti-collagen IV antibody (ab19808) was from Abcam.

Maintenance culture of mouse intestinal organoid

Intestinal organoids have been isolated from isolated mouse crypts as reported previously (Miyoshi and Stappenbeck, 2013), then frozen, expanded and passed as described in (Mizutani and Clevers, 2020; Xi et al., 2022). Briefly, thawed pieces of organoids are embedded in a 1:1 ratio of Advanced DMEM/F12 (basal media), plated as 50 µL domes in a 24-well plate and incubated at 37 °C for 20 to 30 min for the Matrigel to polymerize before adding 500µL of the expansion medium (EM). Media was changed every 2 days. The organoids were sub-cultured twice a week and used for seeding on polyacrylamide gels after 4 days of culture. Wild type organoids (issued from C57/Bl6 mice) used here are from the same stock than in (Xi et al., 2022).

H2B-mCherry organoids were generated from H2B-mCherry knock-in mice provided by Renata Basto (Institut Curie, Paris). VillinCreERT2-tdTomato organoids were generated from mice provided by Danijela Vignjevic (Institut Curie, Paris) (Krndija et al., 2019). Myosin-IIA-GFP-knock-in mice (Zhang et al., 2012) were provided by Ana-Maria Lennon-Dumesnil (Institut Curie, Paris). Myosin-IIA-KO/mTmG mice (Krndija et al., 2019) were kindly provided by Danijela Vignjevic (Institut Curie, Paris) and generated by crossing Myosin-IIA-KO (Jacobelli et al., 2010) and mTmG mice (Muzumdar et al., 2007). Cre recombinase for Myosin-IIA-KO was induced with 200 nM of 4-hydroxytamoxifen for 24 h before cell seeding.

Expansion medium

The intestinal epithelial cells Expansion Medium (EM) used for organoids and 2D monolayers cultures was prepared from L-WRN cells grown in advanced DMEM/F12 supplemented with penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 µg/mL), GlutaMAX (2 mM) and FBS (20% v/v) as described in (Miyoshi and Stappenbeck, 2013; Xi et al., 2022). The L-WRN cells conditioned medium containing Wnt-3A, R-Spondin and Noggin produced by the L-WRN cells was collected every 24 h and mixed with fresh advanced DMEM/F12 medium at a 1:1 ratio to make EM.

Preparation of Matrigel-coated PAA gels of controlled stiffness

Matrigel-coated PAA gels were prepared as described in (Xi et al., 2022). Briefly, autoclaved glass coverslips ($\varnothing = 18$ mm) were treated with oxygen plasma for 3 min. A diluted Matrigel solution in Advanced DMEM/F12 (1:10, v/v) was placed on the coverslips and incubated overnight at 4 °C. The remaining solution was then discarded. The acrylamide, bis-acrylamide and PBS stock solutions were degassed in a vacuum chamber for 15 min. The polymerization solutions were quickly prepared and mixed by vortexing for a few seconds, and a 35 μ L drop was then placed on a silanized glass coverslip ($\varnothing = 14$ mm) and sandwiched by a Matrigel-coated coverslip. The set-up was left 25°C for 30 min to allow PAA polymerization before peeling off the Matrigel coated coverslip from the PAA gel. As-fabricated Matrigel-coated PAA substrates were then soaked in PBS for 2 hours to remove the unreacted chemicals.

2D culture of mechanically and enzymatically dissociated organoid cells

Mechanically dissociated intestinal organoid cells were prepared and seeded as reported in (Xi et al., 2022). Briefly, the organoids routinely cultured in Matrigel domes were suspended in 3 mL cold Advanced DMEM/F12 and mechanically broken by repeatedly pipetting using 200 μ L tips. The broken organoids were suspended in EM containing 10 μ M ROCK inhibitor Y-27632 and directly seeded on Matrigel-coated PAA gels. These cells were allowed to attach in the incubator at 37 °C for 18 h, then unattached cells were washed off and fresh EM was added to the culture. The EM medium was renewed every two days.

Alternatively, intestinal organoids were enzymatically dissociated to produce single cell preparations that were then seeded on the Matrigel-coated PAA substrates. Mechanically broken organoid pieces were incubated for 5 min at 37°C in advanced DMEM/F12 containing TrypLE solution in presence of 10 μ M Y-27632. The reaction was then stopped by adding advanced DMEM/F12, 10% FBS. The solution was then filtered through 30 μ m filters (CellTrics™, # 04-004-2326, from Sysmex) and centrifuged at 1000 rpm for 5 min. The isolated cell pellet was then resuspended in EM containing 10 μ M ROCK inhibitor Y-27632 and directly seeded on Matrigel-coated PAA substrates.

Immunostainings and image acquisition

Cell culture samples were fixed using 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized using 0.1% Triton X-100 in PBS, then blocked for 30 min in PBS-10% FBS before proceeding to incubation with the primary antibodies diluted in PBA-1% FBS at 4 °C overnight. After three washing steps in PBS, the preparations were incubated for 2 h with secondary antibodies diluted in PBA-1% FBS at RT, in the presence or the absence of Hoechst (dilution 1/10000) or labelled phalloidin (dilution 1/100). After three additional washing steps, samples were mounted in Prolong or Vectashield mounting media.

EdU pulses were performed as described in (Xi et al., 2022). Briefly, 10 μ M EdU in EM was incubated for 30 min. After removal of EdU containing medium and PBS wash, cells were fixed in 4 % PFA and permeabilized using 0.5% Triton X-100. Then, EdU signal was detected using the Click-iT Alexa Fluor 488 Imaging kit (Thermo Fisher Scientific), before proceeding with immunolabelling protocols described above.

Immunostained samples were Image acquisition was performed on a confocal LSM780 microscope (Zeiss, Zen software) or a spinning disk CSU-X1 (Zeiss, Zen software) with x10/0,45NA Plan-Apochromat air-immersion objective, x25/0.8NA Plan-Apochromat, x40/1.3NA Plan-Apochromat and x63/1.4NA Plan Apochromat oil-immersion objectives.

Live cell imaging

Live cell imaging of the H2B-mCherry organoids were achieved on a spinning disk CSU-W1 microscope (Leica and MetaMorph software) with x10/0.40NA Plan-Apochromat air-immersion objective. Live cell imaging of the VillinCreERT2-tdTomato organoids were executed on a spinning disk CSU-X1 microscope (Zeiss and MetaMorph software), equipped with 25x/0.8 NA Plan-Apochromat oil-immersion objective.

Cell segmentation and cell tracking

Cell were segmented using Cellpose, a deep learning based segmentation algorithm (Stringer et al., 2021). The output, a mask with the outline of the cells, was then used for the tracking. We used as input the mean projection over 3 μ m of the villin-tomato cell membrane near the substrate. Images were preprocessed on Fiji. To capture a more accurate segmentation, Cellpose parameters were set as follows: cell probability threshold was -6 flow probability threshold was -6 and diameter was 12.74 μ m.

The mask extracted from Cellpose was then used as an input for the tracking step on TrackMate (Tinevez et al., 2017)(BioRxiv: doi:10.1101/2021.09.03.458852). Mode detection was set on mask detector. We excluded tracks shorter than 14 hours and small objects. The output file was analyzed on python. Crypt domains were manually circled on Fiji.

Quantification of EdU⁺ and LGR5⁺ cells

The proportion of LGR5⁺ cells and EdU⁺ cells was measured thanks to the method described previously (d'Alessandro et al., 2017; Gole et al., 2011). This method allowed to estimate the total number of cells by spotting the local maxima on each nucleus stained with LGR5 or EdU.

Quantification of cell velocity

Cell velocities were measured using MatPIV (MatLab software 2021a) as described in (Peyret et al., 2019) on live recordings of the H2B-mCherry nuclei signal. The mean values were calculated for each rigidity on 4 to 6 fields of view. To obtain mean cell velocity in the crypt and differentiation domains PIV was measuring along 18 h started at 36 h after cell seeding on 2.4 kPa and 56 h after cell seeding on 21 kPa. The crypt positions were spotted for all the fields of view. Then, the velocity inside the crypt was measured in a 360 μm square for 2.4 kPa and a 300 μm square for 21 kPa centered on the crypts. The mean velocity of the differentiated cells was measured on the rest of the monolayer.

To obtain the velocity fields inside and around the crypts, for each crypt and for each time point, we extract the velocity field given by the PIV in a 600 μm square centered on the crypt. The velocity fields were then averaged over time during the crypt lifetime. To obtain the mean direction of the cell flow, we define α , the direct angle between the spatial mean vector of the temporal mean velocity field and the horizontal axis (**Suppl. Fig. 4**). For each crypt, the velocity field was rotated of $-\alpha$. Finally, the rotated velocity fields were average over the number of crypts for each rigidity.

Statistics

The statistical analysis were all accomplished using Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, version 7.0).

Results

Mechanically broken intestinal organoids are able to unfold in monolayers on Matrigel-coated PAA substrates

In order to culture IE cells in 2D monolayers, established mouse intestinal organoids were dissociated mechanically by pipetting as described in Material and Methods and seeded on Matrigel-coated PAA gels. PAA gels of calibrated stiffness's were prepared as described in (Xi et al., 2022) (**Suppl Fig.1**). The quality of the coating of Matrigel proteins on the PAA surfaces was verified by immunostaining for the two major Matrigel components, collagen IV and laminin. Imaging of the immunostainings revealed a homogeneous distribution of the two matrix components (**Suppl Fig. 1**). Intestinal epithelial pieces deposited on PAA-Matrigel surfaces adhered within the first day and spread during the following days in large areas, up to day three (**Suppl Fig. 2**). At later stages, massive cell detachment was observed (data not shown). We thus systematically analyzed the 2D epithelia behavior at day three, varying the substrate stiffness from 80 Pa to 21 kPa. At the lowest rigidity, 80 Pa, the organoids had difficulties to adhere and unfold and very often formed cysts on top of the gel (data not shown). In a range of higher stiffnesses (0.37, 2.4 and 5.2 kPa), EI cells formed large areas of monolayered epithelial sheets and co-staining of laminin revealed that the monolayers were well spread and attached to the substratum (**Suppl. Fig. 3**). Altogether, above 80 Pa IE organoids unfold as a monolayer fully adhering to the PAA-Matrigel surfaces.

While in a previous study we analyzed the impact of substrate stiffness on the morphology of differentiated intestinal epithelial cells (Xi et al., 2022), here we analyzed the behavior of the whole monolayers. At day three, besides large areas formed of cuboidal cells with a moderate packing density corresponding to areas populated of differentiating cells as those described in (Xi et al., 2022), we observed circular areas of high cell packing of $17\,707 \pm 911 \mu\text{m}^2$, containing approximately 50 to 100 cells, likely corresponding to crypt-like domains (**Fig. 1**). The nature of these domains as crypts, i.e. the niche of intestinal epithelial stem cells was further demonstrated by immunostaining that revealed the presence of LGR5⁺ stem cells as well as of Lysozyme⁺ Paneth cells (**Fig. 1A, B**). Immunostainings with anti-CEBP α , a marker of transitory amplifying (TA) cells, indicated that these zones of high cell packing likely also contain TA cells. Immunostaining of Villin, an apical marker acquired by intestinal epithelial cells during their differentiation, indicated that the crypt-like domains are not populated by differentiating cells but surrounded by them. The distribution of transitory amplifying cells is promiscuous with crypt domain. These observations demonstrate that IE cells cultured on

planar compliant surfaces develop a compartmentation of the monolayers in villi-like and crypt-like domains.

Cells in the crypt domains and at the boundary with the villus domains have a peculiar cellular and subcellular organization

We then focused on cell organization in crypt domains and at the interface between the crypt and villus like domains (**Fig. 2**). Beside the high cell density in the crypt domain, nuclei staining revealed the presence of a few rows of elongated nuclei whose long axis was tangential to the crypt domain boundary. E-cadherin immunostaining revealed that these nuclei belong to cells encircling the crypt domains that were very elongated basally (**Fig. 2A**). By contrast, crypt-domain cells appeared more isotropic from their basal to their apical planes, with a reduced projected area compared to cells in differentiated domains (**Fig. 2A-C**). To quantify this, we segmented villin-tomato IE cells in the crypt domains and surroundings and measured the area of these cells (**Fig. 3B**). The cells inside the crypt domains had a significant smaller projected area than the cells surrounding these domains. Live imaging focused on the crypt domains performed from day 2 to day 3 followed by cell segmentation and tracking revealed a significant difference in velocity between the cells in the crypt domains and surrounding cells. Mean cell velocity over time is higher in the surroundings than in the crypt domains (**Fig. 3C**). Additionally, cells in crypt domains displayed a reduced Mean Square Displacement (MSD) than the surrounding cells indicating that cells inside the crypt explore a more restricted area than the surrounding cells. This difference in cell displacement behavior between the two domains can be linked to the existence of a boundary region, formed of elongated, tangentially oriented cells around crypts, that would limit cell movements in the crypt domains. Interestingly, cells that change compartment during the entire imaging displayed intermediary characteristics in terms of cell shape and displacement.

To further characterize this boundary, we analyzed F-actin and myosin IIA distribution in Myosin IIA-GFP expressing IE monolayers. F-actin and myosin IIA were accumulated at lateral cell-cell contacts together with E-cadherin in all IE cells (**Fig. 2A-B**). F-actin and myosin were also accumulated in the apical domain of differentiated cells as reported previously (Xi et al., 2022) and of crypt cells (**Fig. 2C, E**). A major difference in actomyosin distribution was observed however basally. Indeed, basal actomyosin was accumulated at the center of differentiated cells. It was organized in tangentially oriented supracellular cables in the

elongated cells forming the margin region of the crypt-like domains (**Fig. 2A, D**) as previously described (Perez-Gonzalez et al., 2021). This peculiar organization of the acto-myosin network in margin cells suggest that these elongated cells contribute to establish a mechanical barrier between the crypt-like and the villi-like domains.

Substrate stiffness affects the morphology, density and proliferation of cells in 2D crypt domains

We then analyzed the impact of the stiffness on these crypt domains in the 0.37 to 5.2 kPa range. x-z optical sections revealed that cells in the crypt-like domains were more columnar than in differentiating domains (**Fig. 2E**). Cells were taller at the center of the crypt domain forming a dome in the monolayer. We then analyzed the impact of substrate stiffness on the height of these crypt domains. The maximum height of cells in the crypt domains decreased with increasing substrate stiffness (**Fig. 4A, B**). However, for a given stiffness, crypts always formed a dome where cells were significantly taller than those in differentiating zones around. For example, on 0.37 kPa substrates crypt cells had a height of $20 \pm 1 \mu\text{m}$, while differentiated cells have been reported to have a height of around $12 \mu\text{m}$ (Xi et al., 2022); for 5.2 kPa, the heights were $13.6 \pm 0.9 \mu\text{m}$ (this study) and of around $5 \mu\text{m}$ (Xi et al., 2022) for crypt and villus areas, respectively. Above 5.2 kPa of substrate stiffness the height of the crypt did not decrease further (data not shown).

In a previous work, it was reported that on the softest substrates (0.2 to 1.5 kPa) cells in the crypt domains apply a pushing force in z inducing the ingression of crypt domains in the underlying PAA gel, mimicking the developmental folding of crypt in the underlying mesenchyme *in vivo* (Perez-Gonzalez et al., 2021). However, although we noticed that the basal surface of the crypts was often wavy, with in some cases a slit indentation of the PAA gel at the center of the crypt, in our hands this ingression was not systematically observed and with no obvious relation with substrate stiffness.

Since substrate stiffness affect the columnar organization of crypt cells, we further analyzed its impact on crypt cell packing. Substrate stiffness also affected the density cells in crypt domains; the packing cell density in crypt domains decreasing with increasing substrate stiffness (**Fig. 4 B, C**). This may be due to a lower proliferation rate at higher substrate stiffnesses. Thus, we next analyzed the impact of substrate stiffness on cell proliferation (**Fig. 4 D, E**). EdU⁺ staining revealed that the areas of higher cell density, containing LGR5⁺ cells and Paneth cells, defined

above as crypt-like domain were as expected areas of cell high cell proliferation (**Fig. 4 D**). Quantification of the ratio of EdU⁺ cells on total cell number in crypt domains indicated that cell proliferation was high on the softest substrates (0.37 kPa), but strongly reduced on 2.4 and 5.2 kPa substrates (**Fig. 5E**). Altogether, these data show that crypt domains containing stem cells and Paneth cells are maintained when organoids unfold on 2D substrates and that the substrate stiffness impact crypt cell height, packing and proliferation.

Dissociated IE cells spontaneously self-organize in crypt-like domains on 2D substrates

So far these data show that crypt-like domains and differentiated cell domains can be maintained in 2D cultures of IE organoids in the absence of monolayer folding. However, this does not prove that these domains can self-assemble and segregate spontaneously in 2D. To address this question, we then dissociated IE cells to single cells by enzymatic means (see methods) before seeding them on PAA-Matrigel substrates. At the lowest stiffness tested (0.37 kPa), dissociated IE cells barely attached on the 2D surfaces and were not able to form a monolayer (data not shown). We thus performed these experiments on two stiffnesses (2.4 and 21 kPa). **Figure 5** shows the typical organization of crypt domains formed by IE cells grown for 3 days on 2.4 kPa and 21 kPa gels. On 2.4 kPa gels, these domains of packed cells were clearly limited by a belt of elongated cells (**Fig. 5A**) similar to what is observed after 3 days of cultures for mechanically dissociated organoids. Immunostaining indicated that those zones host LGR5⁺ cells and are surrounded by villin⁺ differentiated cells (**Suppl Fig. 4**). Thus, on 2.4 kPa substrates, crypt-like domains form that are very similar to those formed by mechanically dissociated IE cells (**see Fig. 2**). However, when grown three days on 21 kPa substrates, IE cells formed less organized and smaller crypt-like domains (**Fig. 5B**). To quantitatively determine the impact of substrate stiffness on crypt formation, we analyzed the dynamics of crypt formation by live imaging of H2B mCherry IE cells on 2.4 kPa and 21 kPa substrates. Increasing the stiffness from 2.4 kPa to 21 kPa almost doubled the time needed for crypt appearance (**Fig. 5C**). The increase in stiffness was further associated to a decrease in crypt domain size (**Fig. 5C**). Altogether these data show that fully dissociated IE cells can self-organize in 2D into crypt-like domains and that their formation and stability depend on substrate stiffness.

Dynamics of crypt domains and surrounding regions in function of substrate rigidity

In order to have some hints on the dynamics of crypt domain we applied Particle Imaging Velocity (PIV) on time laps of nuclei labelled IE monolayers grown on both substrates allowing to quantify local cell velocities in crypt domains and in surrounding regions (**Fig. 6A**). Extracting the mean velocities revealed that IE cells had a much lower velocity in crypt domains than around. However, this trend was less prominent on 21 kPa substrate than on 2.4 kPa substrate, in accordance with the reduced radius and increased formation delay of crypt domains on the stiffest substrate. In addition, the overall cell velocity in the monolayer was increased on the stiff substrate, suggesting that the overall displacement velocities in the monolayer together with the differential cell motility in crypt domains and surrounding regions may be involved in the formation of crypt domains. We then further extracted the velocity maps of the crypt domains and their surrounding region as shown in a **supplementary figure 5**. To extract more general trends on these displacement fields, we extracted the mean velocity fields by averaging heap maps and vector fields over regions centered on individual crypts. However, for each individual crypt analyzed we observed a bias of the overall cell displacement in one direction. Thus, we decided, before averaging, to re-orient all the maps along their main displacement direction (**Fig. 6B**). These averaged maps revealed a global centrifuge gradient of velocity vectors which increase from the crypt centers to their periphery, that was the most evident for 2.4 kPa conditions. Cell displacement were reduced toward the center of the crypts in accordance of mean velocities reported in **Fig. 6A**. They revealed also an asymmetric distribution of cell flows as if the cells were moving out of crypt in a preferential direction. All these trends were also observed for 21 kPa substrates with however a global increase in velocities in both crypt and inter crypt domains, together with a non-significant difference of velocities in crypt domains and outside.

Crypt self-organize and segregate from differentiating regions by global decrease and local accretion of LGR5⁺ cells

To further address how these domains form we followed the distribution of IE cell nuclei as well as of LGR5⁺ stem cells from day 1 to day 3 of culture (**Fig. 7A, C**). At day 1, on both stiffnesses, LGR5⁺ cells were representing more than half of the total number of cells attached to the substratum and forming monolayers, likely because after total dissociation only stem cell-like cells were able to adhere or survive on these 2D surfaces. For both stiffnesses, the proportion of LGR5⁺ cells strongly decreased at day 2 then further at day 3 (**Fig. 7B, D**). This decrease in the proportion of LGR5⁺ cells could be due to the natural process of differentiation

of EI precursors. Interestingly, starting at day 4, we observed massive cell detachment that could be understood as cells reaching their final state of differentiation (cell extrusion). Altogether, this indicates some kind of synchronization of these IE cell population enriched at seeding in proliferative LGR5⁺ cells. Beside this, we observed an evolution of the relative distribution of cell nuclei that were almost homogeneously distributed at day 1, then condensed in crypt-like domains at day 2 (**Fig. 7A, C**). At day 3, on 2.4 kPa gels, the crypt-like domains continued to grow in size and to acquire a high cell packing density while the internuclei distance further decreased in regions in between crypt domains. At the same time, remaining LGR5⁺ cells were mostly found in crypt-like domains (**Fig. 7A**). In contrast, on 21 kPa substrates, the difference in cell packing density between crypt-like domains and the other regions of the monolayer vanished at day 3 (**Fig. 7C**). In addition, at day 3 the overall density of cells was lower in 21 kPa than on 2.4 kPa substrates. Thus, the major difference between soft and stiff substrate conditions is not the evolution of the ratio of LGR5⁺ cells in the monolayer but the capacity of cells to pack in crypt-like domains over time.

High substrate stiffness as well as loss of Myosin IIA activity impair IE cells proliferation

To further determine how crypt-domains arise out of a salt-and-pepper population a IE cells enriched in LGR5⁺ cells, we further analyzed the distribution of proliferating cells thanks to EdU staining. At the global monolayer level, the ratio of EdU⁺ cells was very high (close to 40 %) on both substrates at day 1 as expected for a population of cells enriched in stem cells (**Fig. 8A, B, D**). On both substrates this ratio decreased at day 2, and remained significant at day 3 for the soft substrate while it dropped to close to zero on the stiff substrate. Thus, the impairment of crypt domains formation on stiff substrates could be caused, not by a depletion in LGR5⁺ stem cells but by a strong inhibition of cell proliferation.

The stiffness sensitivity of crypt formation may be mediated by cell contractility. Indeed, inhibition of Myosin II activity by blebbistatin has been reported previously to destabilize crypt domains (Perez-Gonzalez et al., 2021). We made similar observations in mechanically dissociated EI monolayers treated with blebbistatin (data not shown). To further determine if internal cell contractility was involved in this substrate stiffness response, we cultured enzymatically dissociated Myo IIA KO cells on the 2.4 kPa substrate, permissive for IE cell proliferation and crypt formation (**Fig. 8C**). Interestingly, while the proportion of EdU⁺ cells was not affected in Myo IIA KO cells at day 1 on 2.4 kPa, the proportion of proliferating cells

was strongly decreased at day 2 and day 3 compared to WT IE cells on the same stiffness (**Fig. 8D**), indicating that the loss of Myosin IIA activity strongly decreases the proliferation capability of IE cells. Altogether these results indicate that both the stiffness of the substrate and cell contractility strongly regulate the capability of LGR5⁺ cells to proliferate and the subsequent formation and maintenance of crypt domains independently of crypt folding.

Discussion

The study of IE development and self-renewal in adult is highly informative for understanding complex biological phenomena that involve stem cell behavior, epithelial cell sorting, dynamics, organization and homeostasis. Previous studies focusing on *in vitro* growth and differentiation of 3D mouse IE organoids have allowed to propose various scenarios for crypt genesis, folding and maintenance (see Introduction). However, these *in vitro* investigations do not directly address how this stem cell niche emerges out of an initially flat and un-patterned epithelium as observed during development (Spence et al., 2011; Sumigray et al., 2018; Wells and Spence, 2014). We show here that crypt domains can spontaneously reform from a population of adult mouse IE cells and segregate out of differentiated cell domains in the absence of mesenchyme as *in vivo*, of a local source of morphogens, as reported in (Kim et al., 2018), luminal osmotic pressure (Yang et al., 2021), curvature (Gjorevski et al., 2022; Yang et al., 2021) or substrate softening (Gjorevski et al., 2016). To do this, we developed a method to culture intestinal organoids on planar substrates made of Matrigel-coated PAA gels of controlled stiffness, very similar to the one used in (Perez-Gonzalez et al., 2021).

We show that the IE cells either mechanically dissociated (pieces of organoids) or even fully dissociated IE cells colonize Matrigel-coated gels over 2 to 4 days with the rapid emergences of two domains with very distinct cell phenotypes. A first type of domain corresponds to circular zones populated by highly packed columnar cells. The zones in between these circular zones are populated by more spread and squamous cells which correspond to differentiated cells as reported in (Perez-Gonzalez et al., 2021; Xi et al., 2022) and confirmed by villin expression. Thanks to immunofluorescent staining, we identified the areas of very high cell density as crypt-like domains containing Paneth cells and LGR5⁺ stem cells, comparable to the crypt domains found in intestinal organoids in three dimensions *in vitro* as well as *in vivo*. Accordingly, these domains are areas of high proliferation as revealed by EdU staining.

We found that these crypt-like domains were composed of isotropic cells of lower projected area in the center surrounded by highly elongated cells at their periphery, aligned tangentially to the cryptic domains, and forming a boundary of a few cells row between the crypt domains and the differentiated cells domains. This boundary is not associated with differential expression or localization of the adhesion molecule E-cadherin, ruling out boundary maintenance by differential intercellular adhesion. However, these boundary cells possess at their ventral face long tangentially aligned supra-cellular actomyosin cables. We can thus suspect that these cells that are highly contractile cells maintain a boundary between the zones

of proliferation and the zones of differentiated cells and thus the shape of the crypt domains. The fact that blebbistatin treatment (Perez-Gonzalez et al., 2021) as well as MyoIIA KO destabilize these domains supports this hypothesis. However, it is not clear to what extent cell contractility is required to initiate crypt domain building.

We also observed an apical accumulation of actomyosin in crypt cells. The analysis of cell velocity by PIV, single cell tracking and MSD indicate that cells within crypt are significantly less motile than surrounding cells. These observations are consistent with those of (Perez-Gonzalez et al., 2021) in the absence however of major invagination of the crypt domains into the underlying substrate. Further TFM measurements will allow us to determine the pattern of forces and tissue stress around crypt domains and their contribution to boundary formation in the absence of monolayer bending. It is to notice that in our hand the crypt boundaries were very often anisotropic, especially when starting from fully dissociated cells, indicating that as suggested by PIV analysis TA or differentiating cells may flow out of crypts preferentially in direction of weaker boundary organization. Along this line, TA cells labelling indicated a promiscuous distribution of these cells, suggesting that crypt domains may further need curvature to be properly stabilized. Despite this, our study shows that crypt-like domains are able to self-organize in the absence of epithelium curvature.

To question the role of mechanical constraint on the self-organization and maintenance of intestinal crypts, the niche of stem cells, we cultured IE cells on 2D Matrigel-PAA gels of various stiffnesses. We observed that the height of the crypt domain cells decreases significantly with increasing stiffness with a sharp decrease between 0.37 and 2.4 kPa. This effect is not specific of crypt domains as we reported it also for the differentiated IE cells in similar conditions (Xi et al., 2022). It may not even be specific of intestinal epithelial cells as it has been reported also for MDCK cell cultures (Hagelaars et al., 2022; Kaliman et al., 2021). These studies show that matrix stiffness more ubiquitously can control squamous to columnar cell shape, cell polarity and cell density which affect also cell motility. However, if this process may explain the combined response to stiffness of IE monolayers, it does not explain the differential cell height adaptation of crypt versus differentiation domains. Alternatively, a difference in crypt cells anchorage to the substratum (integrin-mediated adhesion) contractility, or cortical tension may control these differences that may be of first importance for differential cell motility and proliferation as well as for boundary formation.

The height, density and proliferation of crypt cells decrease with increasing substrate stiffness. By plating fully dissociated cells, we further showed that crypts emerge in two to three days

out of an initially homogeneous monolayer of cells rich in LGR5⁺ cells. During this process, proliferation was maintained and cell density increased in the cryptic domains, while LGR5⁺ cells density and proliferation decreased in area around populated of differentiated cells, recalling the scenario observed during the development of the intestinal epithelium *in vivo* (Spence et al., 2011; Sumigray et al., 2018; Wells and Spence, 2014). An increased substrate rigidity impaired this process, likely due to a drastic reduction of precursor cell proliferation, since while decreasing the number of LGR5⁺ progenitors was not as strongly affected. Notice that at seeding, the enrichment of the cell population in LGR5⁺ cells was very high. This likely results from the culture medium used for organoid expansion that favors stem cell maintenance as well as from a selection of LGR5⁺ cells at seeding that may be more prone to adhere and/or survive compared to differentiating cells. Alternatively, we do not know if this LGR5⁺ cells are bona fide stem cells or TA cells or even more differentiated cells that de-differentiate during the cell dissociation/seeding procedure recalling regenerative processes (Barker, 2014; Sumigray et al., 2018; Tan and Barker, 2014). In line with this hypothesis, notice that LGR5⁺ cells as well as dividing cells keep accumulating at the edges of IE monolayers. Surprisingly, an increase in substrate stiffness which is expected to be associated to an increase in cell contractility was associated to a decrease in cell proliferation. Accordingly, the knock-out of myosin IIA strongly impaired both crypt domain formation and precursors proliferation.

We unravel here a major effect of rigidity on IE stem cell niche maintenance in 2D. We think that cell spreading plays a role on this process. IE cells are more columnar and less spread on softer substrates and this favors the formation and maintenance of crypts. It is known that one of the important signaling factors for the niche, Notch, is cell membrane anchored and needs direct cell-cell contacts with neighboring cells bearing its ligand Delta (Shaya et al., 2017). We can therefore think that more columnar cells will favor this signaling by increasing the surface of cell-cell contact. The increase in cell packing could go in the same direction and reinforce this signaling by a positive feedback loop. Finally, as suggested in (Gjorevski et al., 2022), curvature could further push toward an increase in cell density and a rearrangement of more columnar cell-cell contacts, and thus reinforce the process initiated here in 2D configuration.

These results therefore suggest that crypts can be formed and maintained without curvature of the epithelium by a joint contribution of proliferation pressure and the formation of a myosin IIA-dependent boundary between the proliferative and differentiated cell domains. Altogether, they contribute to a better understanding of the cellular mechanisms related to the development and homeostatic renewal of the intestinal epithelium. Remarkably, they illustrate how a balance

between cell proliferation and contractility contributes to the formation of a boundary between cells of the same lineage, a rare process in both vertebrates and invertebrates.

References

- Altay, G., E. Larranaga, S. Tosi, F.M. Barriga, E. Batlle, V. Fernandez-Majada, and E. Martinez. 2019. Self-organized intestinal epithelial monolayers in crypt and villus-like domains show effective barrier function. *Sci Rep.* 9:10140.
- Barker, N. 2014. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15:19-33.
- Barker, N., J.H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haegebarth, J. Korving, H. Begthel, P.J. Peters, and H. Clevers. 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature.* 449:1003-1007.
- Clevers, H. 2013. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell.* 154:274-284.
- Collinet, C., and T. Lecuit. 2021. Programmed and self-organized flow of information during morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 22:245-265.
- d'Alessandro, J., A.P. Solon, Y. Hayakawa, C. Anjard, F. Detchenerry, J.P. Rieu, and C. Riviere. 2017. Contact enhancement of locomotion in spreading cell colonies. *Nature Physics.* 13:999-1005.
- Engler, A.J., S. Sen, H.L. Sweeney, and D.E. Discher. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 126:677-689.
- Gehart, H., and H. Clevers. 2019. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 16:19-34.
- Gjorevski, N., M. Nikolaev, T.E. Brown, O. Mitrofanova, N. Brandenberg, F.W. DelRio, F.M. Yavitt, P. Liberali, K.S. Anseth, and M.P. Lutolf. 2022. Tissue geometry drives deterministic organoid patterning. *Science.* 375:eaaw9021.
- Gjorevski, N., N. Sachs, A. Manfrin, S. Giger, M.E. Bragina, P. Ordonez-Moran, H. Clevers, and M.P. Lutolf. 2016. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature.* 539:560-564.
- Gole, L., C. Riviere, Y. Hayakawa, and J.P. Rieu. 2011. A quorum-sensing factor in vegetative Dictyostelium discoideum cells revealed by quantitative migration analysis. *PLoS One.* 6:e26901.
- Gomez-Galvez, P., S. Anbari, L.M. Escudero, and J. Buceta. 2021. Mechanics and self-organization in tissue development. *Semin Cell Dev Biol.* 120:147-159.
- Hagelaars, M.J., F.A. Yousef Yengej, M.C. Verhaar, M.B. Rookmaaker, S. Loerakker, and C.V.C. Bouten. 2022. Substrate Stiffness Determines the Establishment of Apical-Basal Polarization in Renal Epithelial Cells but Not in Tubuloid-Derived Cells. *Front Bioeng Biotechnol.* 10:820930.
- Jacobelli, J., R.S. Friedman, M.A. Conti, A.M. Lennon-Dumenil, M. Piel, C.M. Sorensen, R.S. Adelstein, and M.F. Krummel. 2010. Confinement-optimized three-dimensional T cell amoeboid motility is modulated via myosin IIA-regulated adhesions. *Nat Immunol.* 11:953-961.
- Kaliman, S., M. Hubert, C. Wollnik, L. Nuic, D. Vurnek, S. Ghrer, L. Lovric, D. Diudziak, F. Rehfeldt, and A.-S. Smith. 2021. Mechanical Regulation of Epithelial Tissue Homeostasis. *Physical Review X.* 11.
- Kim, R., Y. Wang, S.J. Hwang, P.J. Attayek, N.M. Smiddy, M.I. Reed, C.E. Sims, and N.L. Allbritton. 2018. Formation of arrays of planar, murine, intestinal crypts possessing a stem/proliferative cell compartment and differentiated cell zone. *Lab Chip.* 18:2202-2213.
- Krndija, D., F. El Marjou, B. Guirao, S. Richon, O. Leroy, Y. Bellaiche, E. Hannezo, and D. Matic Vignjevic. 2019. Active cell migration is critical for steady-state epithelial turnover in the gut. *Science.* 365:705-710.
- Kwon, O., T.S. Han, and M.Y. Son. 2020. Intestinal Morphogenesis in Development, Regeneration, and Disease: The Potential Utility of Intestinal Organoids for Studying Compartmentalization of the Crypt-Villus Structure. *Front Cell Dev Biol.* 8:593969.
- Le, A.P., J.F. Rupprecht, R.M. Mege, Y. Toyama, C.T. Lim, and B. Ladoux. 2021. Adhesion-mediated heterogeneous actin organization governs apoptotic cell extrusion. *Nat Commun.* 12:397.
- Miyoshi, H., and T.S. Stappenbeck. 2013. In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture. *Nat Protoc.* 8:2471-2482.

- Mizutani, T., and H. Clevers. 2020. Primary Intestinal Epithelial Organoid Culture. *Methods Mol Biol.* 2171:185-200.
- Muzumdar, M.D., B. Tasic, K. Miyamichi, L. Li, and L. Luo. 2007. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis.* 45:593-605.
- Nelson, C.M., R.P. Jean, J.L. Tan, W.F. Liu, N.J. Sniadecki, A.A. Spector, and C.S. Chen. 2005. Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:11594-11599.
- Perez-Gonzalez, C., G. Ceada, F. Greco, M. Matejic, M. Gomez-Gonzalez, N. Castro, A. Menendez, S. Kale, D. Krndija, A.G. Clark, V.R. Gannavarapu, A. Alvarez-Varela, P. Roca-Cusachs, E. Batlle, D.M. Vignjevic, M. Arroyo, and X. Trepast. 2021. Mechanical compartmentalization of the intestinal organoid enables crypt folding and collective cell migration. *Nat Cell Biol.* 23:745-757.
- Peyret, G., R. Mueller, J. d'Alessandro, S. Begnaud, P. Marcq, R.M. Mege, J.M. Yeomans, A. Doostmohammadi, and B. Ladoux. 2019. Sustained Oscillations of Epithelial Cell Sheets. *Biophys J.* 117:464-478.
- Sato, T., and H. Clevers. 2013. Primary mouse small intestinal epithelial cell cultures. *Methods Mol Biol.* 945:319-328.
- Sato, T., R.G. Vries, H.J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D.E. Stange, J.H. van Es, A. Abo, P. Kujala, P.J. Peters, and H. Clevers. 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 459:262-265.
- Serra, D., U. Mayr, A. Boni, I. Lukonin, M. Rempfler, L. Challet Meylan, M.B. Stadler, P. Strnad, P. Papasaikas, D. Vischi, A. Waldt, G. Roma, and P. Liberali. 2019. Self-organization and symmetry breaking in intestinal organoid development. *Nature.* 569:66-72.
- Shaya, O., U. Binshtok, M. Hersch, D. Rivkin, S. Weinreb, L. Amir-Zilberstein, B. Khamaisi, O. Oppenheim, R.A. Desai, R.J. Goodyear, G.P. Richardson, C.S. Chen, and D. Sprinzak. 2017. Cell-Cell Contact Area Affects Notch Signaling and Notch-Dependent Patterning. *Dev Cell.* 40:505-511 e506.
- Spence, J.R., R. Lauf, and N.F. Shroyer. 2011. Vertebrate intestinal endoderm development. *Dev Dyn.* 240:501-520.
- Sprangers, J., I.C. Zaalberg, and M.M. Maurice. 2021. Organoid-based modeling of intestinal development, regeneration, and repair. *Cell Death Differ.* 28:95-107.
- Stringer, C., T. Wang, M. Michaelos, and M. Pachitariu. 2021. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nat Methods.* 18:100-106.
- Sumigray, K.D., M. Terwilliger, and T. Lechler. 2018. Morphogenesis and Compartmentalization of the Intestinal Crypt. *Dev Cell.* 45:183-197 e185.
- Tan, D.W., and N. Barker. 2014. Intestinal stem cells and their defining niche. *Curr Top Dev Biol.* 107:77-107.
- Tinevez, J.Y., N. Perry, J. Schindelin, G.M. Hoopes, G.D. Reynolds, E. Laplantine, S.Y. Bednarek, S.L. Shorte, and K.W. Eliceiri. 2017. TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods.* 115:80-90.
- van der Flier, L.G., and H. Clevers. 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 71:241-260.
- Wang, Y., I.L. Chiang, T.E. Ohara, S. Fujii, J. Cheng, B.D. Muegge, A. Ver Heul, N.D. Han, Q. Lu, S. Xiong, F. Chen, C.W. Lai, H. Janova, R. Wu, C.E. Whitehurst, K.L. VanDussen, T.C. Liu, J.I. Gordon, L.D. Sibley, and T.S. Stappenbeck. 2019. Long-Term Culture Captures Injury-Repair Cycles of Colonic Stem Cells. *Cell.* 179:1144-1159 e1115.
- Wells, J.M., and J.R. Spence. 2014. How to make an intestine. *Development.* 141:752-760.
- Xi, W., J. Saleh, A. Yamada, C. Tomba, B. Mercier, S. Janel, T. Dang, M. Soleilhac, A. Djemat, H. Wu, B. Romagnolo, F. Lafont, R.M. Mege, Y. Chen, and D. Delacour. 2022. Modulation of designer biomimetic matrices for optimized differentiated intestinal epithelial cultures. *Biomaterials.* 282:121380.

- Yang, Q., S.L. Xue, C.J. Chan, M. Rempfler, D. Vischi, F. Maurer-Gutierrez, T. Hiiragi, E. Hannezo, and P. Liberali. 2021. Cell fate coordinates mechano-osmotic forces in intestinal crypt formation. *Nat Cell Biol.* 23:733-744.
- Zhang, Y., M.A. Conti, D. Malide, F. Dong, A. Wang, Y.A. Shmist, C. Liu, P. Zerfas, M.P. Daniels, C.C. Chan, E. Kozin, B. Kachar, M.J. Kelley, J.B. Kopp, and R.S. Adelstein. 2012. Mouse models of MYH9-related disease: mutations in nonmuscle myosin II-A. *Blood.* 119:238-250.

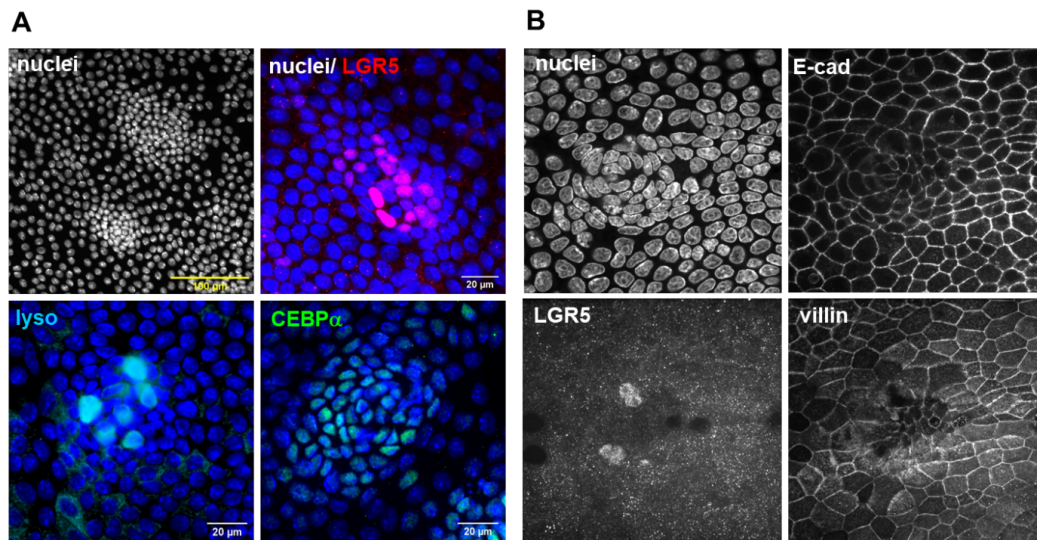


Figure 1: Organoids unfolded on PAA-Matrigel substrates show compartmentalization of crypt-like and villus-like domains

A: Mechanically broken intestinal organoids were grown on 2.4 kPa PPA-Matrigel substrates for three days, fixed and imaged for nuclei, LGR5, Lysozyme and CEBP α , markers of stem cells, Paneth cells and Transitory Amplifying cells, respectively. Scale bars: 100 μ m and 20 μ m. B: Preparations were stained for nuclei, E-cadherin, LGR5 and villin. Scale bar: 20 μ m.

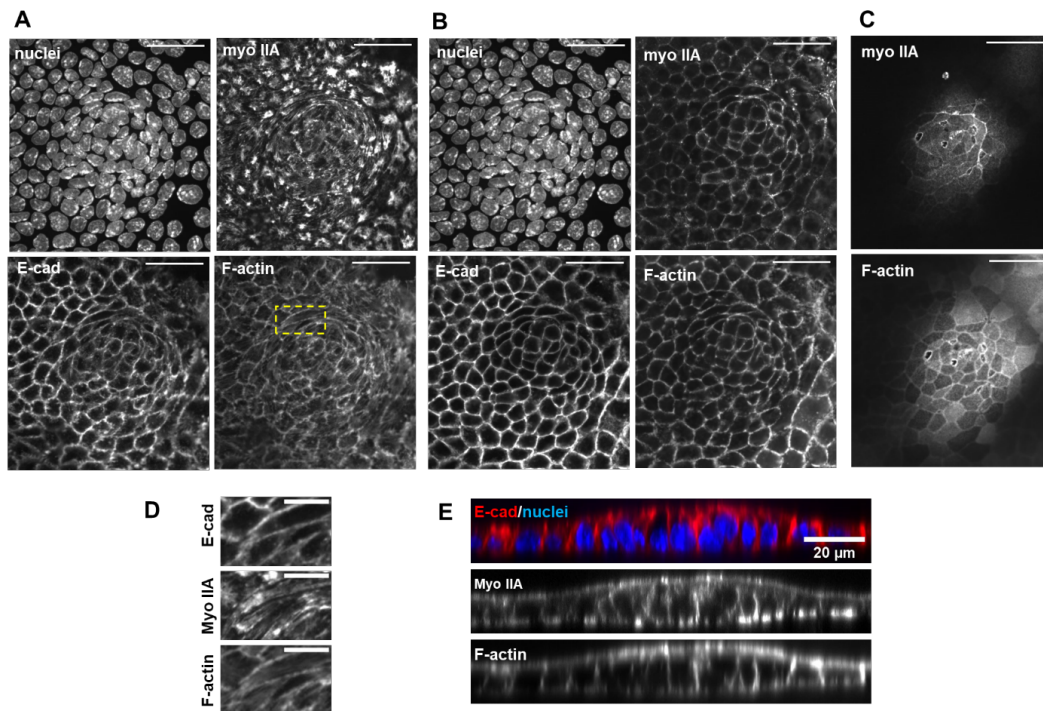


Figure 2 : Actomyosin organization in the crypt domains and at boundary with the villus domains

Mechanically broken Myosin IIA-GFP organoids were grown on 2.4 kPa substrates for three days, fixed and imaged for nuclei, E-cadherin, and F-actin and imaged with confocal microscopy. Panels in **A**, **B** and **C** are projections of 1.45 μm thick z projection taken at the basal, middle and upper planes of the crypt domain, respectively, except for nuclei staining that is displayed as a total z planes projection. Scale bars: 30 μm . **D**: Zoomed view of the basal organization of actomyosin in a region containing elongated cells at the crypt border (boxed area in **A**). Scale bars: 10 μm . **E**: x-z optical sections taken across the center of the crypt. Scale bar: 20 μm .

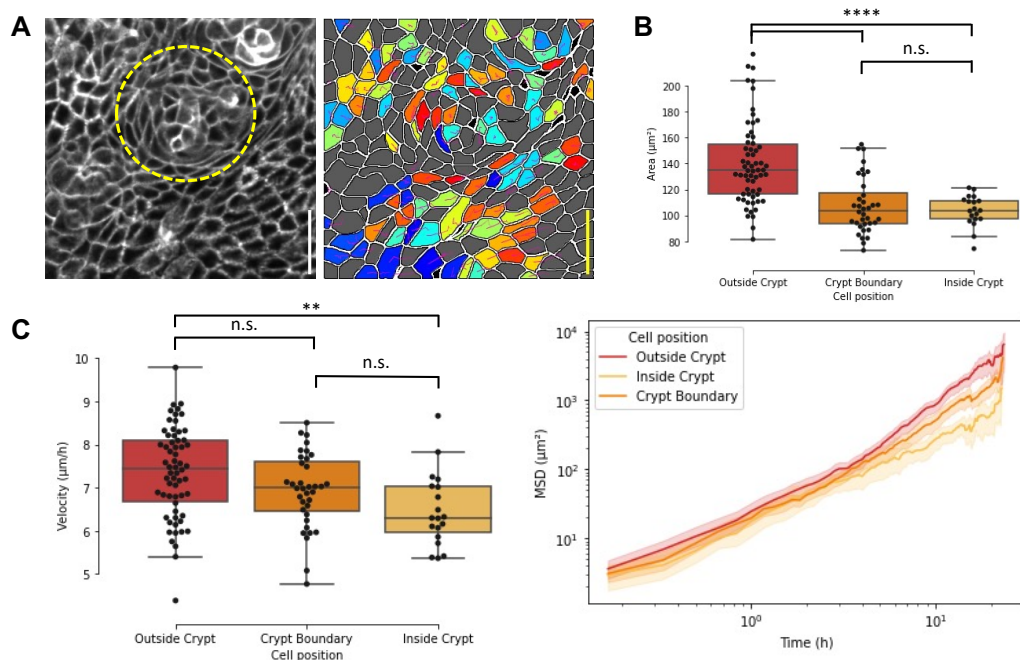


Figure 3: Morphology and dynamic of the domains and surroundings

Mechanically broken Villin-tomato organoids were grown on 2.4 kPa substrates for three days. Live imaging focusing on the crypt domains was performed from day2 to day 3. Cells were then segmented and tracked over time. Crypt domain were manually circled over time. We distinguished three cell positions: crypt boundary, outside and inside the crypt. Outside and inside crypts represent the cells that stays outside or inside the crypt during the entire imaging (24 hours). Crypt boundary represents the cells that change position (from inside to outside and vice versa) at least once during the entire imaging. **A:** Example of crypt domains and surroundings 64h after seeding. Average projection over 3 μm on the basal side of the cell membrane signal. Crypt domain is circled in yellow (**left**). Cell segmentation and cell tracking over few time frames of the crypt domain presented on the left (**right**). Scale bar: 30 μm . **B:** Cell area as a function of the position. Cells inside the crypt have a smaller projected area compared to the cells in the surrounding. **C:** Cell mean velocity and MSD (mean square displacement) over time as a function of the cell position. Mean cell velocity is higher outside than inside the crypt. MSD slope is higher outside than inside the crypt. Cells outside the crypt domain explore a greater area and have a more directed movement than cells inside. The first time point on the MSD plot corresponds to the first detection of each cell. ANOVA statistical test: ****: $p < 0.00001$, **: $p < 0.01$, $N = 1$ and 117 cells were tracked during at least 13 hours.

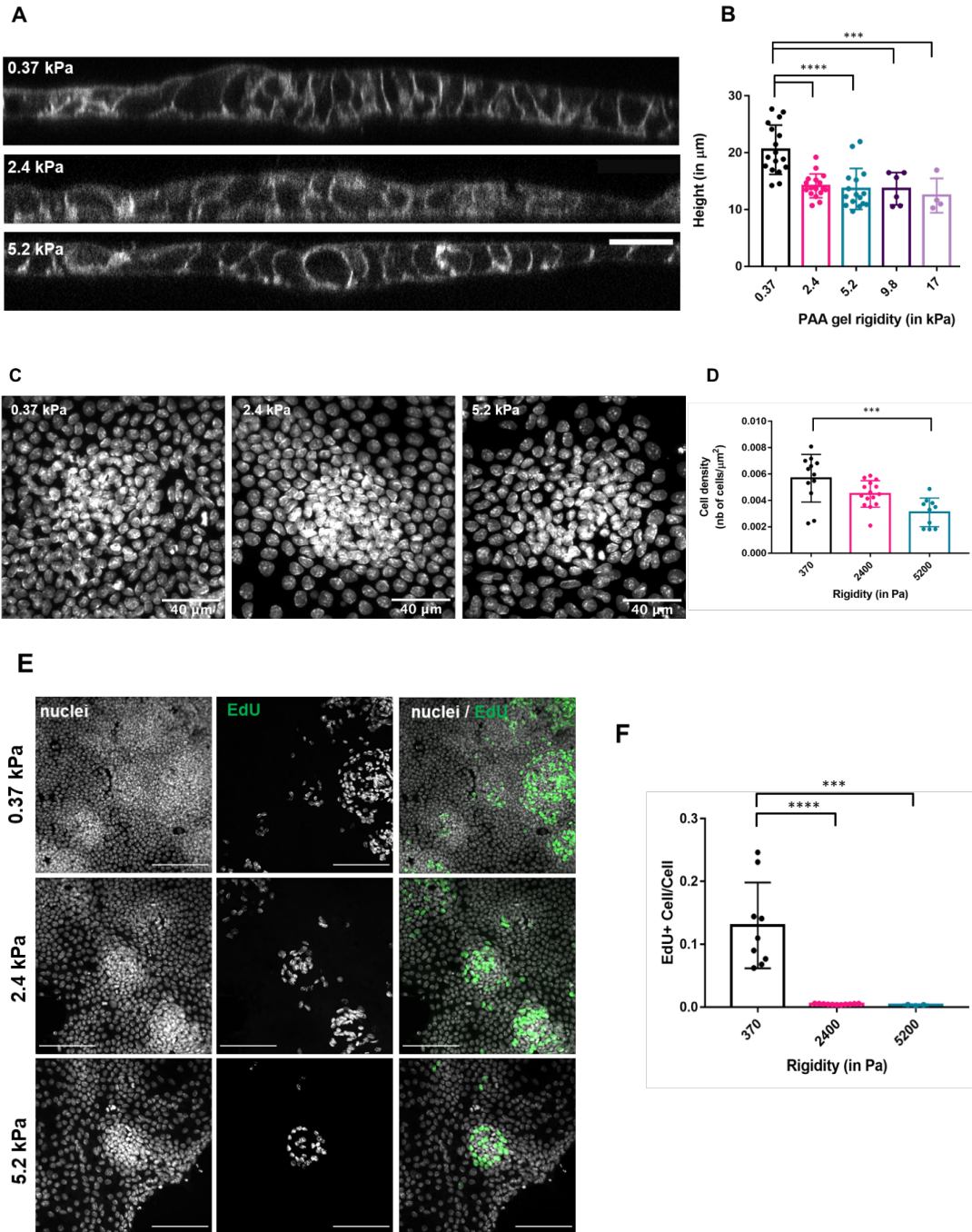


Figure 4: Impact of substrate rigidity on the cell height and density in crypt-like domains

Broken organoids either *WT* or villin tomato were grown for 3 days on 0.37, 2.4 and 5.2 kPa PAA-Matrigel substrates, fixed, immunostained for *E-cadherin* (*WT*) and imaged by confocal microscopy. **A:** *x-z* optical sections of crypt domains. Scale bar: 20 μm . Cells in these domains are taller at the center of the crypt domains. **B:** Quantification of the maximum height of crypt domains in function of substrate stiffness. Cells in the crypt-like domains are higher on soft substrates. ANOVA statistical test: ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$. $N = 26, 21$ and 36 crypts, respectively, in 2 independent experiments. **C:** Nuclei staining of broken organoids grown for 3 days on 370, 2400 and 5200 Pa PAA-Matrigel substrates. Scale bars: 40 μm . **D:** Quantifications of the cell packing in crypt domains as a function of substrate stiffness. ANOVA statistical test: ***: $p < 0.001$. $N = 12, 15$ and 10 crypts, respectively, in 2 independent experiments. **E:** Mechanically broken intestinal organoids were grown for three days on 370, 2400 and 5200 Pa PAA-Matrigel substrates, pulsed with EdU for 10 minutes, then immediately fixed and processed for labelling. Scale bars: 100 μm . **F:** Quantification of the ratio of cells EdU positive on the total number of cells present in crypt domains. ANOVA statistical test: ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$. $N = 9, 11$ and 3 crypts, respectively, in 2 independent experiments.

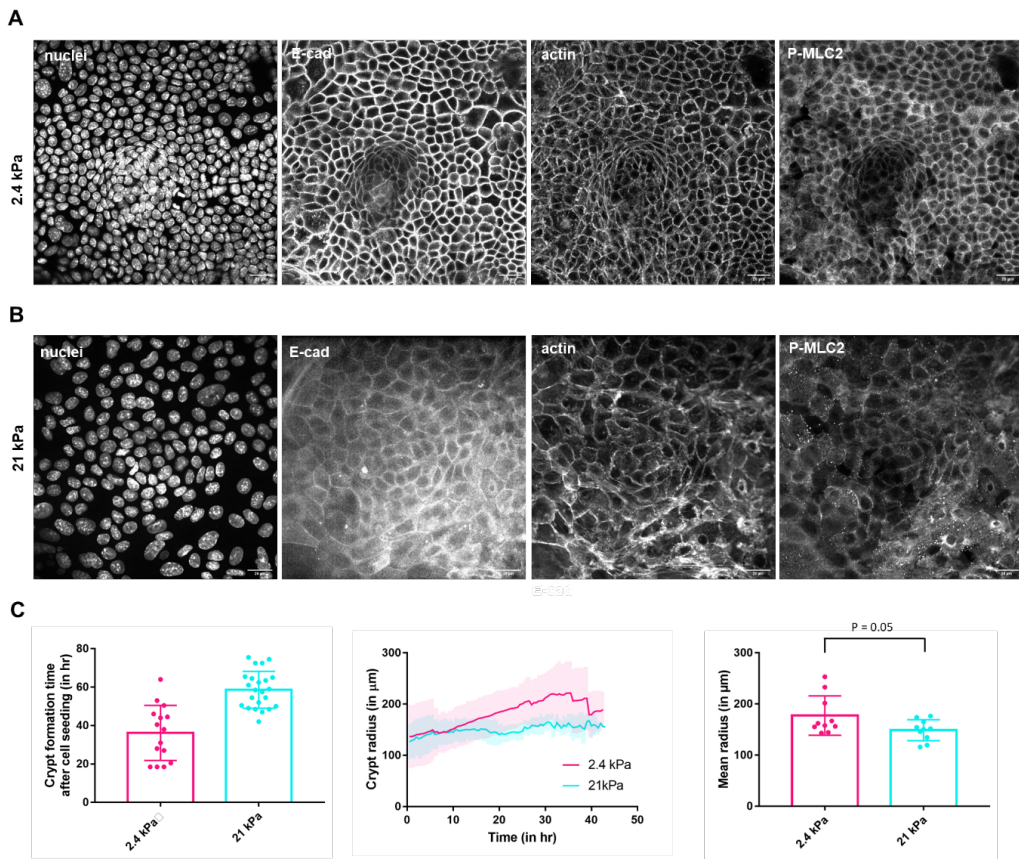


Figure 5: Dissociated organoid cells self-organize in 2D into crypt-like domains

Enzymatically dissociated IE cells were seeded on 2.4 kPa (A) or 21 kPa (B) PAA-Matrigel substrates, grown for 3 days, fixed and stained for nuclei, E-cadherin, F-actin and M-MLC2 or nuclei, LGR5 and villin. Crypt-like domains were formed at day 3 that are very similar to those formed by mechanically dissociated IE cells. Scale bars: 20 μm . C: IE cells were enzymatically dissociated out of H2B mCherry organoids, seeded either on 2.4 kPa or on 21 kPa PAA-Matrigel substrates and followed by live cell imaging of nuclei over 3 days, starting 18 hours after seeding the cells. The delay in appearance (left), as well as the evolution of the radius over time (middle) and mean radius of the crypt-like domains (right) were manually quantified. T test: ****: $p < 0.0001$. $N = 15$ and 21 crypt domains. middle: T test: $P = 0.019$. $N = 15$ and 23 crypts. C: $N = 10$ crypts for each condition. right: T test: $p = 0.05$, $N = 10$ crypts for each condition.

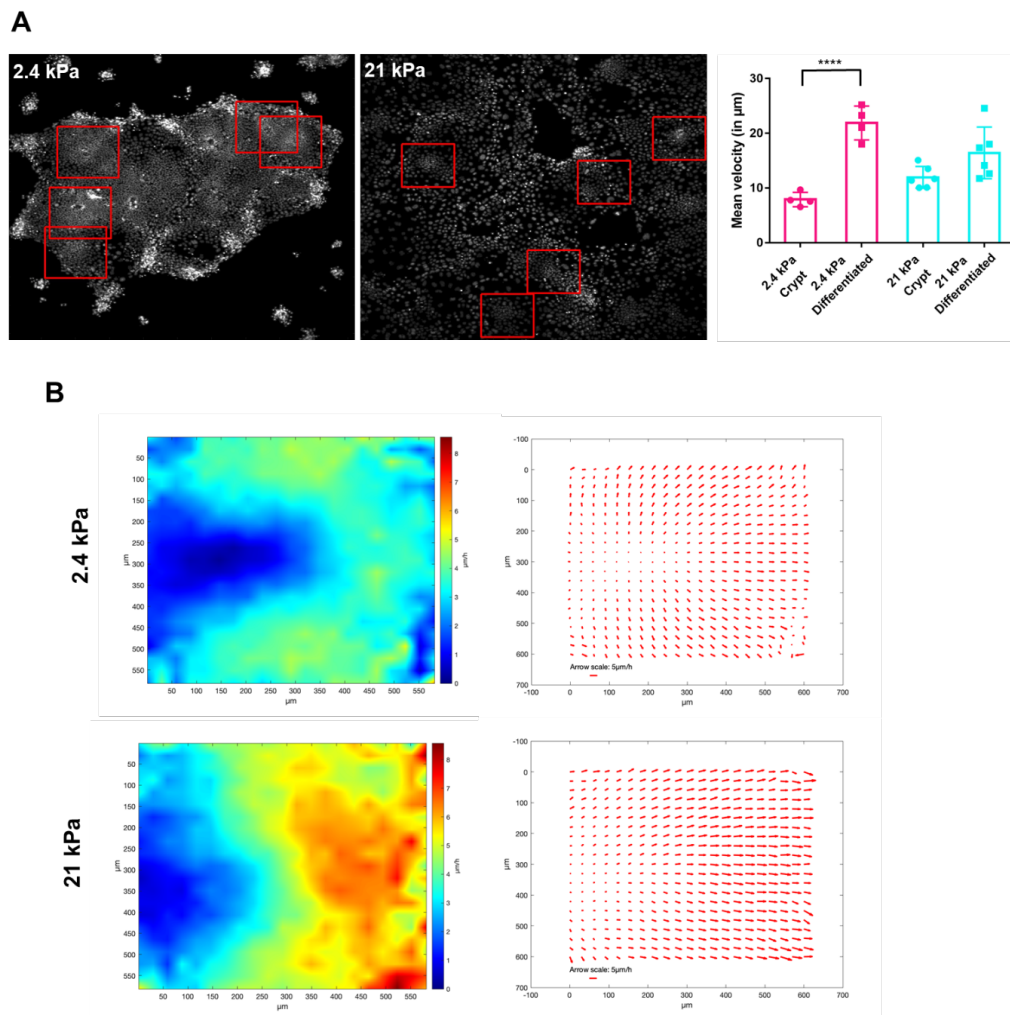


Figure 6: Dynamics of crypt domains and surrounding regions in function of substrate rigidity

Enzymatically dissociated H2B mCherry IE cells were seeded on 2.4 kPa (A) or 21 kPa (B) PAA-Matrigel substrates, imaged every 30 minutes for 3 days. PIV was then performed on the nuclei images to extract velocity maps as described in Methods. **C:** Velocity for crypt-like domains were averaged in a 360 μm square around the spotted crypts on soft substrates and in a 300 μm square around the spotted crypts for stiff substrates. Examples of spotted crypts on soft and stiff substrates are indicated by red boxes in A and B, respectively. Velocities for differentiated areas were averaged of the rest of the monolayer. Mean velocities were calculated over 18 h, starting 34 h after cell seeding on 2.4 kPa substrates and 56 h after cell seeding on stiff substrates, respectively. ANOVA statistical test: ****: $p < 0.0001$. $N = 4$ on soft and $N = 6$ on stiff. Cell mean velocity was significantly higher in differentiated area compared to crypt-like domains on soft substrates. **D:** Mean velocity maps in the crypt domains and their surrounding region as shown in a *suppl. Fig. 4*. Velocity field were measured using MatPIV on the H2B-mCherry nuclei signal. For each crypt and for each time point, the velocity field

was extracted by PIV in a 600 μm square centered on the crypt. The velocity field was then averaged during the crypt lifetime, then averaged over all crypts analyzed for each rigidity. $N= 15$ crypts for 2.4 kPa and $N= 23$ crypts for 21 kPa, respectively.

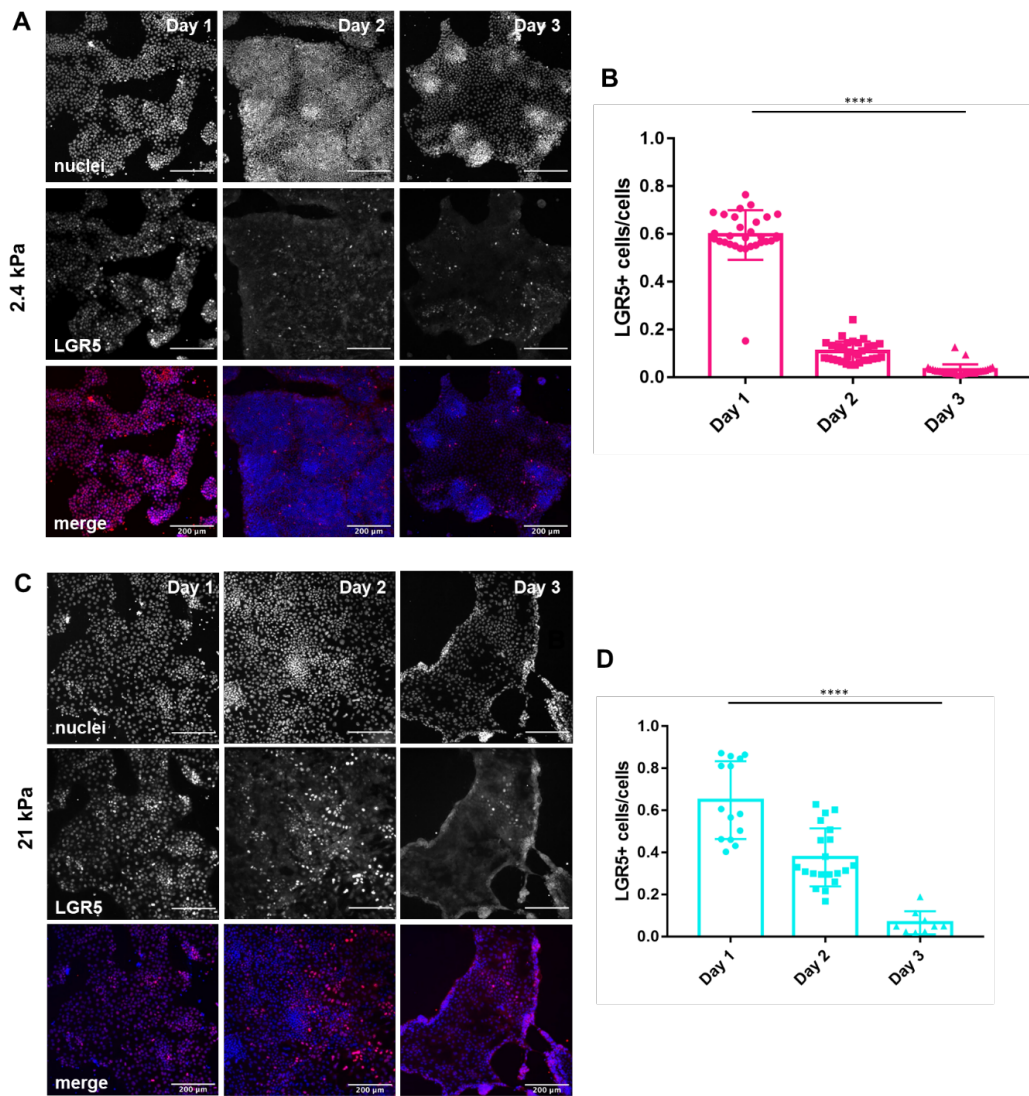


Figure 7: Dissociated IE cells auto-organization is associated to a decrease over time of the population of LGR5⁺ cells

Enzymatically dissociated IE cells were seeded on 2.4 kPa (A) or 21 kPa (C) PAA-Matrigel substrates, fixed on day 1, 2 and 3, and stained for nuclei and LGR5. C, D: Quantification of the ratio of LGR5⁺ over total cell population on 2.4 kPa and 21 kPa substrates, respectively. Scale bars: 200 μ m. ANOVA statistical test: ****: $p < 0.0001$. $N \geq 30$ fields for each condition in C; $N = 14, 20$ and 9 fields for Day 1, Day 2 and Day 3, respectively in D.

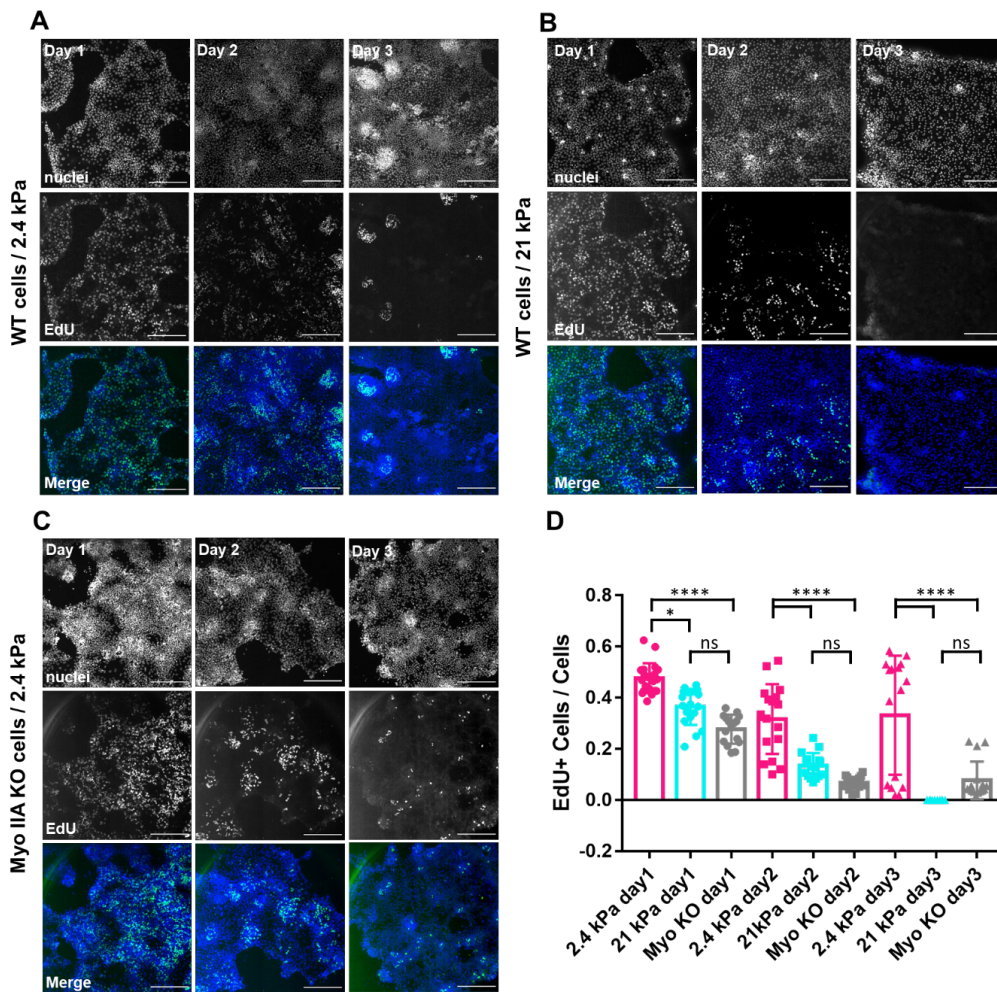
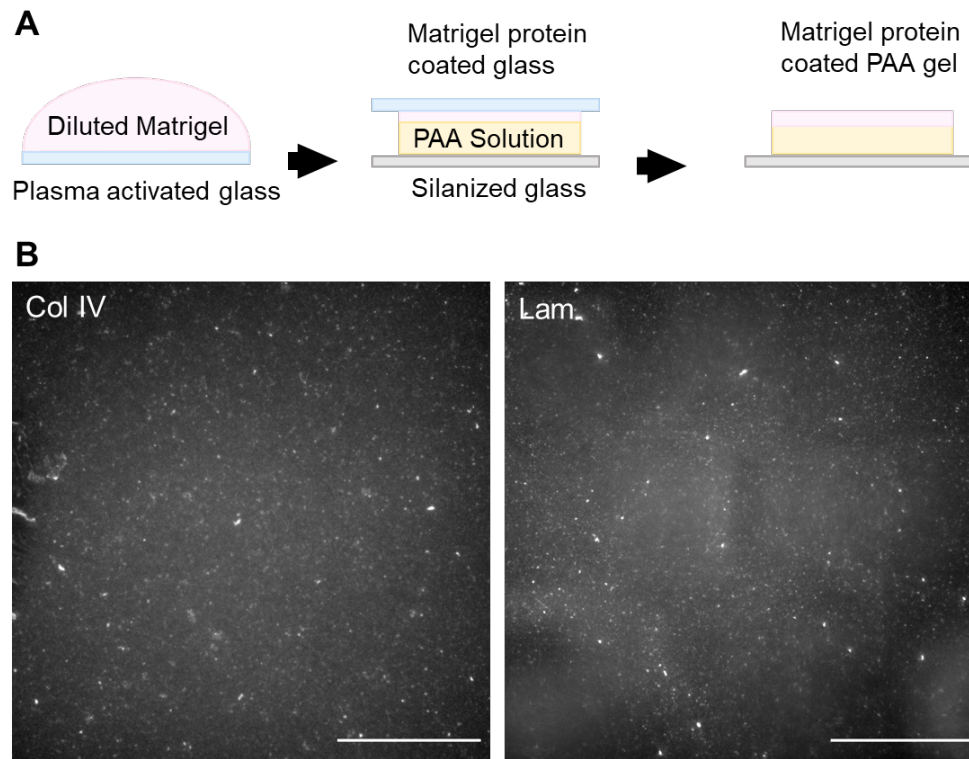


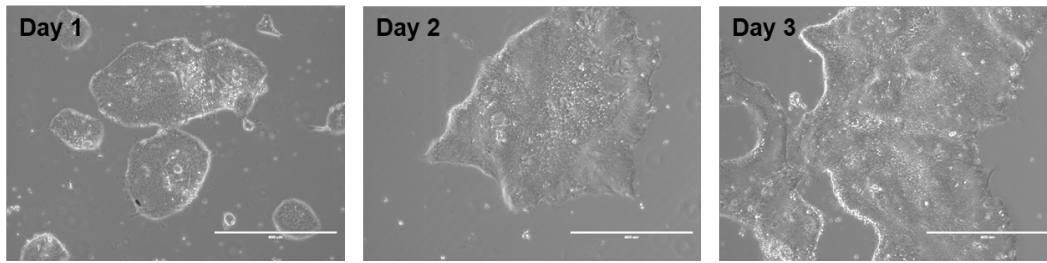
Figure 8: Proportion of EdU⁺ cells in the monolayer over time in function of substrate rigidity

Enzymatically dissociated WT IE cells were seeded on 2.4 kPa (A) or 21 kPa (B) PAA-Matrigel substrates. C: Alternatively, Myo IIA KO IE cells were seeded on 2.4 kPa substrates. Cultures pulsed with EdU for 30 min as described in Methods on day 1, day 2 and day 3, then stained for nuclei and EdU incorporation (see methods). Scale bars: 200 μ m. D: Graphs showing the quantification of the ratio of EdU⁺ cells over total cell numbers for each condition respectively. ANOVA statistical test. **** $p < 0.0001$, * $p = 0.0181$. $N \geq 16$ fields view.



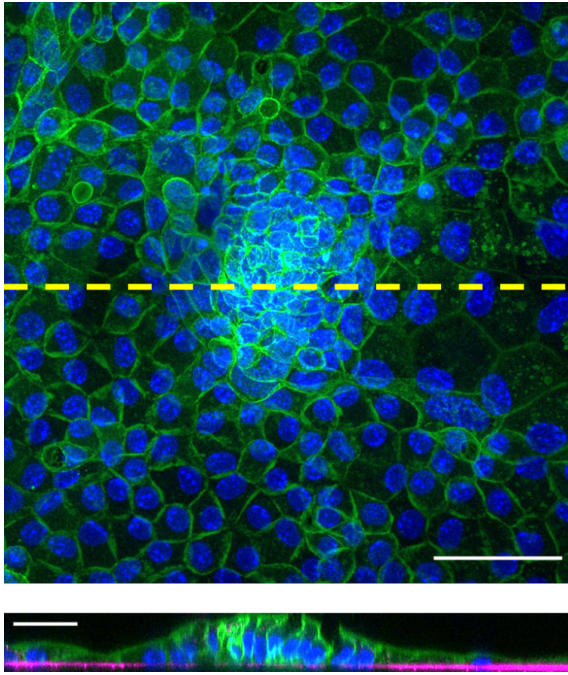
Supplemental Figure 1: Preparation and validation of Matrigel-coated PAA gels

A: Schematics of the method of Matrigel-coated PAA gels preparation. The use of diluted Matrigel allow to coat the glass coverslip with Matrigel proteins without jellification (left). The proteins are transferred to PAA during PAA polymerization (center) B: Anti-collagen IV (Col IV) and anti-laminin (Lam) immunostaining of these Matrigel coated PAA gels as obtained in A (right). Scale bar: 100 μ m.



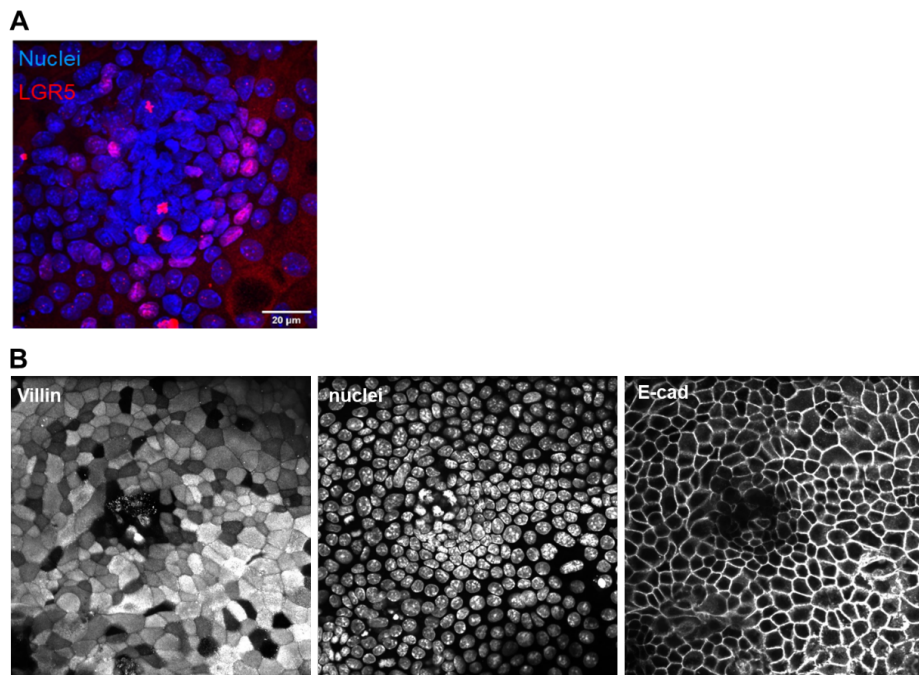
Supplemental Figure 2: Mechanically dissociated mouse intestinal organoids unfold on Matrigel coated polyacrylamide gels

Mouse intestinal organoids were mechanically broken (see Material and Methods) and seeded on 5.2 kPa Matrigel coated polyacrylamide gels and phase contrast imaged at day 1, day 2 and day 3 of culture. Scale bars: 400 μ m. Pieces of organoid attached on the substrate, unfolded and colonized the substrate.

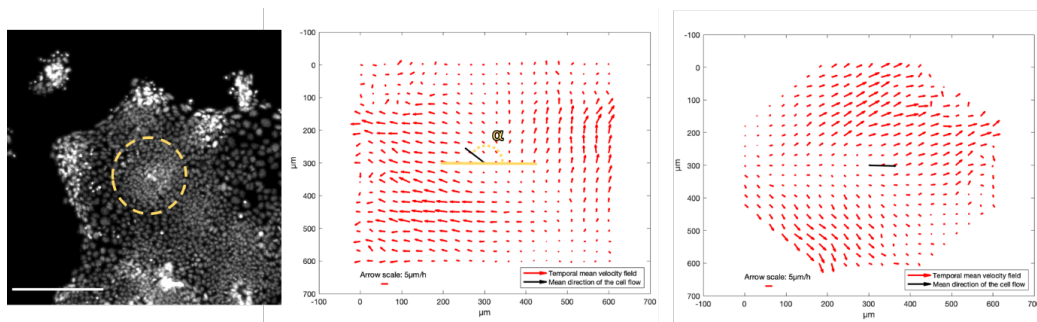


Supplemental Figure 3: Example of a crypt-like domain on 21 kPa gels

Intestinal organoid pieces were cultured on a 21 kPa gels for 3 days and stained for nuclei (blue), membrane (green) and laminin (magenta). Total z projection (top) and z side view corresponding to the yellow line on top image of a crypt-like domain. Scale bars, top: 50 μm , bottom: 25 μm . Cells inside the crypt-like domain, despite their difference in height with the surrounding cells are attached on the substrate.



Supplemental Figure 5: Characterization of crypt domains formed out of dissociated IE cells
 Enzymatically dissociated IE cells cultured for 3 days on 2.4 kPa PAA-Matrigel substrates were stained for nuclei and LGR5 (A) or nuclei, E-cadherin and villin (B).



Supplemental Figure 6: Generation of average velocity fields in crypt domains and their vicinity

Example of the velocity field around a crypt on 2.4 kPa. **Left:** snapshot of the nuclei signals of the cells 36 h after cell seeding. Crypt circled in yellow. Scale bar: 200 μm . **Middle:** temporal mean velocity field around the crypt. In yellow, angle α defined as the direct angle between the spatial mean vector of the temporal mean velocity field and the horizontal axis. **Right:** - α rotation of the temporal mean velocity field around the crypt.

III.2 Discussion

En résumé, ce travail montre qu'à partir de cellules d'organoïdes intestinaux isolées, homogènes et majoritairement souches, des domaines prolifératifs et des domaines différenciés se reforment spontanément en l'absence de courbure et de cellules mésenchymatauses.

En premier lieu, ce travail a permis de développer une méthode permettant de cultiver des organoïdes intestinaux sur des substrats plans de rigidité variable. Les substrats utilisés sont des gels de PAA recouverts de Matrigel. Les fragments d'organoïdes déposés se déplient et colonisent la surface des gels. Deux zones se distinguent alors : une première zone de cellules denses et cylindriques ; une seconde zone de cellules moins denses et plus étalées. Les marquages immunologiques révèlent que ces zones de densité cellulaire élevée sont composées de cellules de crypte (de cellules souches LGR5+ et de cellules de Paneth) dont certaines sont prolifératives. Ce travail se concentre par la suite sur ces domaines prolifératifs nommés ici domaines de crypte. Les domaines de crypte sont composés au centre de cellules isotropes avec une aire projetée plus faible, et en périphérie de cellules plus grandes et très allongées. Les cellules en périphérie présentent au niveau basal de longs câbles d'acto-myosine supra-cellulaires. Au niveau apical dans les domaines de crypte, la myosine II A et l'actine sont accumulées à la membrane cellulaire. Les câbles supra-cellulaires d'acto-myosine participent de façon mécanique au maintien de la forme des domaines de crypte et de la frontière entre ces derniers et les domaines de cellules différenciées.

Il existe donc une ceinture contractile d'acto-myosine qui sépare les domaines de crypte des domaines différenciés. Par la suite, le suivi du mouvement cellulaire dans le temps révèle d'une part une vitesse plus faible pour les cellules de la crypte par rapport aux cellules des domaines différenciés. D'autre part, la mesure du déplacement quadratique moyen indique que les cellules des domaines différenciés possèdent

un mouvement plus dirigé que les cellules des domaines de crypte. Ces résultats confirment la présence d'une frontière restreignant le déplacement des cellules des domaines de crypte. Comme présenté dans l'introduction, le cytosquelette d'actomyosine se réarrange en fonctions de la rigidité ressentie par les cellules [93, 40, 145, 64, 180]. Ce qui suggèrent qu'en modifiant la rigidité du substrat, la ceinture d'actomyosine par conséquent la frontière entre les domaines pourrait être affectée.

Dans ce travail, j'ai montré qu'en augmentant la rigidité du substrat, la hauteur, la densité et la prolifération cellulaire des domaines crypte diminuent significativement. Ces résultats montrent que les fragments d'organoïdes intestinaux déposés sur des gels de PAA s'étalent et présentent des domaines de crypte et différenciés. Une frontière se dessine entre les domaines affectés par la rigidité du substrat. Ces observations rejoignent ce qui a été montré par C. Pérez-González et collègues [118]. En effet, les auteurs montrent, grâce à des mesures de forces par TFM (microscopie à force de traction ou *Traction Force Microscopy*), que les cellules au centre exercent des forces sur le substrat orientées vers l'intérieur de la crypte tandis que les cellules en périphérie exercent des forces dans la direction opposée. Par la suite, les auteurs examinent les forces exercées par les cellules orthogonalement au plan du substrat. Les cellules du centre des domaines de crypte poussent sur le substrat, tandis que les cellules en périphérie tirent sur celui-ci. Les auteurs conjecturent que cette répartition des forces participe au maintien de la compartimentation et à l'initiation de l'invagination des cryptes dans l'épithélium intestinal. On peut alors se demander si ces domaines s'auto-organisent et comment la rigidité peut influencer cette auto-organisation.

Ainsi, dans ce travail, j'ai également mis au point un protocole permettant de cultiver des cellules entièrement dissociées d'organoïdes intestinaux. J'ai observé que les cellules souches avaient la capacité de se différencier et de s'auto-organiser. Après 2-3

jours de culture, des domaines de crypte se forment sur des substrats mous (2,4 kPa) comme rigides (21 kPa). La formation des domaines de crypte est plus rapide sur les substrats mous par rapport au substrats rigides. Le diamètre des domaines de crypte est aussi plus petit sur les substrats rigides par rapport au substrats mous. De plus, la taille des domaines de crypte augmente tout au long de leur vie sur les substrats mous; tandis que les cryptes une fois formées sur les substrats rigides gardent une taille constante.

La PIV nous a permis de mesurer une différence de vitesse des cellules entre l'intérieur et l'extérieur des domaines de crypte. Ces résultats corroborent les résultats obtenus sur les fragments d'organoïdes étalés. La vitesse des cellules est plus faible à l'intérieur qu'à l'extérieur des cryptes. De plus, les domaines de crypte se déplacent plus sur les substrats rigides que sur les substrats mous. Par ailleurs, le champ des vitesses montre un mouvement de l'intérieur vers l'extérieur des domaines de crypte avec des vitesses presque nulles au centre de ceux-ci.

En ce qui concerne l'évolution de la population de cellules souches au cours du temps, ce travail montre une diminution de la proportion de cellules LGR5+ sur les deux rigidités. Et elle diminue de façon plus rapide sur les substrats mous que sur les substrats rigides. Ces résultats corroborent les résultats obtenus par N. Gjorevski et collègues sur les organoïdes en 3D [58]. Les auteurs montrent que les cellules des organoïdes intestinaux cultivés en 3D dans des gels mous se différencient plus. En outre, les auteurs montrent que les gels plus rigides permettent un maintien plus long de la population de cellules souches LGR5+. En revanche, nos résultats montrent que la proportion de cellules en phase S diminue plus vite sur les substrats rigides que sur les substrats mous. Cette observation corrobore les mesures effectuées par S. He et collègues qui montrent que la proportion de cellules en prolifération diminue avec l'augmentation de la rigidité [65]. Les études de N. Gjorevski et collègues

et S. He et collègues expliquent ces résultats par la translocation de YAP dans le noyau. De la même manière, la diminution de la contractilité cellulaire par le KO de la myosine II A engendre une baisse de la proportion de cellules en phase S. Il serait donc intéressant d'étudier dans notre système la translocation de YAP lors de l'auto-organisation des domaines de cryptes en fonction de la rigidité mais aussi de la contractilité cellulaire.

En conclusion, ce travail met en évidence la formation spontanée sur des gels plans de domaines de crypte à partir de cellules d'organoïdes intestinaux homogènes et majoritairement souches (LGR5+) en l'absence de cellules mésenchymateuses. A partir d'une population homogène de cellules majoritairement souches, les instabilités mécaniques dirigent l'auto-organisation des cellules pour former des domaines de crypte et des domaines de cellules différenciées. Ce phénomène rappelle les observations faites au cours du développement de l'épithélium intestinal. En effet, l'épithélium est initialement plan et constitué de cellules indifférenciées. Puis, les villosités apparaissent poussées par des amas de cellules mésenchymateuses sécrétant des facteurs de différenciation (BMP) [88]. Ainsi, plus largement, les travaux de recherches exposés ici révèlent l'importance de la part mécanique impliquée dans le développement et le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

Chapitre IV

Effet des contraintes géométriques sur l'auto-organisation des cellules de l'épithélium intestinal

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les cellules souches intestinales s'auto-organisaient sur un gel en 2D pour reformer des domaines de crypte et des domaines de cellules différenciées. De plus, ce processus est dépendant de la rigidité du substrat. Cependant, les caractéristiques mécaniques de l'environnement dans lequel sont cultivées les cellules ne se résument pas à la rigidité. En effet, comme on peut le constater à travers l'architecture en crypte et villosités de l'épithélium intestinal, les cellules sont aussi contraintes spatialement et adaptent leur forme.

Contraindre spatialement les cellules épithéliales influence leur comportement collectif, notamment lors de la migration [33], la prolifération [109] ou encore l'extrusion [138]. De la même manière, comme nous l'avons vu dans l'introduction, contraindre spatialement les cellules souches dirige l'auto-organisation de celles-ci. Nous exposons ici trois études majeures révélant différents aspects de l'impact de la géométrie

sur l'auto-organisation de cellules souches cultivées à plat en 2D.

La première étude est celle de B. Sorre et collègues [169]. Dans cette étude, les auteurs cultivent des cellules souches embryonnaires humaines sur des micro-motifs de laminine-521 ou de Matrigel adhésif pour les cellules. Après 42 heures de culture en présence de BMP4, les auteurs constatent l'apparition de feuillets de différenciation concentriques : ectoderme (SOX2+, NANOG-, BRA-, SOX17-), ligne primitive-mésoderme (BRA+, NANOG+, SOX17-, SOX2-), endoderme (SOX17+, NANOG+, SOX2-), trophoctoderme (CDX2+, BRA-, SOX17-, SOX2-). Cette étude se concentre plus particulièrement sur la diffusion de des signaux chimiques. En effet, les auteurs cultivent les cellules dans des micro-puits de PDMS et observent la disparition des feuillets de trophoctoderme et mésendoderme. Dans ce cas-ci, la diffusion de BMP4 par la face latérale des cellules en périphérie de la colonie est nécessaire à la formation des différents feuillets.

Une deuxième étude, présentée par X. Xue et collègues, s'est concentrée quant à elle à la part mécanique dans l'auto-organisation des cellules souches contraintes géométriquement [175]. Dans cette étude, les auteurs déposent des cellules souches humaines pluripotentes sur des micro-motifs et observent l'auto-organisation des cellules en deux régions concentriques. Les cellules du centre se différencient en cellules de la plaque neurale et les cellules en périphérie se différencient en cellules du bord de la plaque neurale. Les auteurs montrent d'une part que les forces de traction exercées par les cellules en périphérie sont beaucoup plus fortes. D'autre part, la réduction de la contractilité cellulaire à l'aide de la blebbistatine inhibe la formation des deux régions de différenciation (la plaque neurale et le bord de la plaque neurale). Par ailleurs, les auteurs présentent un dispositif permettant d'étirer les cellules du centre de l'îlot cellulaire. Les auteurs montrent que l'étirement des cellules inhibe la formation des deux régions de différenciation. Les auteurs expliquent ce phénomène par

la phosphorylation de SMAD 1/5. L'étirement différentiel des cellules contraintes géométriquement peut influencer la voie de différenciation des cellules souches.

Enfin, une troisième étude de Q. Smith et collègues, quant à elle, se concentre sur le lien entre la tension du cytosquelette d'actomyosine, la densité cellulaire, la contrainte géométrique des cellules et leur différenciation [144]. Dans cette étude, les auteurs confinent spatialement des cellules souches humaines pluripotentes induites sur des motifs de différentes formes et tailles. Les auteurs observent que les cellules en périphérie des motifs se différencient vers des cellules vasculaires. Les auteurs expliquent qu'une tension précoce des cellules les mène vers une voie de différenciation de cellule vasculaire.

Ainsi, la voie de différenciation des cellules souches peut être influencée par des contraintes géométriques que ce soit à travers des signaux chimiques et/ou mécaniques. Cependant, l'impact des contraintes géométriques sur le maintien et l'auto-organisation des cellules souches adultes de l'épithélium intestinal reste peu connu. Pour aborder cette question, nous avons établi dans un premier temps une méthode originale développée lors de ma thèse afin de confiner spatialement des cellules d'organoïdes sur des gels plans. Ces résultats ont été obtenus très tardivement au cours de ma thèse, ils restent donc préliminaires mais seront poursuivis par la suite au sein du laboratoire. Nous verrons donc dans un second temps les perspectives qu'apportent cette méthode.

IV.1 Méthode de culture de cellules d'organoïdes intestinaux contraints géométriquement en 2D sur des gels plans de PAA

Afin de mettre au point cette technique de culture, une grande quantité d'essais dans différentes conditions a été effectué. Pour chaque essai, que ce soit l'impression sur PDMS sur verre ou l'exposition aux UV, la présence du revêtement protéique était vérifié à l'aide de marquage immunologique.

La pratique couramment utilisée au sein du laboratoire est l'impression de protéines adhérentes sur du PDMS préalablement activé aux UV. Un des premiers essais fût donc d'imprimer des motifs de fibronectine et de Matrigel sur du PDMS. La fibronectine a été choisie car elle est une protéine constitutive de la matrice extra-cellulaire. Elle est aussi la protéine d'adhésion la plus utilisée dans le laboratoire, dont la manipulation est la plus maîtrisée. Ensuite, le choix s'est porté sur le Matrigel, composition proche de la membrane basale, substrat physiologique de l'épithélium intestinal. Dans le cas de la fibronectine, les cellules d'organoïdes intestinaux n'adhèrent pas de façon reproductible, parfois quelques cellules adhèrent parcimonieusement, parfois aucune n'adhère. Dans le cas du Matrigel, quelques cellules d'organoïdes intestinaux adhèrent et se détachent rapidement, en moins de 24 heures.

Une deuxième tentative fût alors engagée sur des surfaces de verre. De la même manière, le verre est activé préalablement aux UV, puis imprimé avec différentes protéines : la fibronectine, du Matrigel, de la laminine, du collagène I et un mélange de laminine et de collagène I. La laminine, le collagène I et le mélange de laminine et de collagène I avaient été ajoutés à la liste des essais car ce sont aussi des composés de la matrice extracellulaire, et qu'ils sont utilisés de façon courante dans des techniques d'impression. Dans tous ces cas, et de la même manière que sur du PDMS les

cellules d'organoïdes n'adhèrent pas de façon reproductible.

Il existe une autre manière de produire des motifs protéiques sur du verre à l'aide d'UV. Pareillement à ce qui est décrit dans la figure II.4, le verre est d'abord recouvert de PLL-PEG. Puis, le PEG est retiré localement par exposition aux UV sous un masque. La PLL libre se lie aux protéines d'adhésion choisies : de la fibronectine, du Matrigel, de la laminine, du callagène I et un mélange de laminine et de collagène I. De la même manière que sur le verre imprimé, les cellules d'organoïdes n'adhèrent pas de façon reproductible.

Pensant qu'il s'agissait de surfaces trop rigides, des essais furent alors engagés sur des gels de PAA. La technique utilisée est identique à celle exposée dans la figure II.4. Les motifs de protéines adhérentes sont d'abord apposés sur le verre, après libération des PLL par le détachement du PEG dû à l'exposition aux UV. Ensuite, les protéines adhérentes sont transférées sur le gel de PAA. Identiquement aux essais précédents, plusieurs revêtements protéiques différents ont été utilisés : de la fibronectine, du Matrigel, de la laminine, du callagène I et un mélange de laminine et de collagène I. Pour tous les revêtements protéiques, les cellules d'organoïdes intestinaux n'attachent pas de manière reproductible.

Suite à tous ces essais infructueux, une autre orientation des essais a été prise. En effet, au sein du laboratoire, J. d'Alessandro et collègues ont montré que les cellules modifient le substrat sur lequel elles migrent [27]. Ces modifications entraînent un changement drastique du comportement cellulaire, en particulier en terme de mobilité. Les cellules sont attirées par l'empreinte que les cellules précédentes laissent sur le substrat [27]. On parle de substrats conditionnés pour des substrats qui ont été colonisés au moins une fois par des cellules.

Successivement à ces résultats, une tentative de conditionnement des substrats a été menée. Pour cela, nous avons utilisé des cellules MCF10A. Ce sont des cellules qui

adhèrent sur des motifs de fibronectine transférés sur des gels de PAA. Ensuite, elles sont connues pour déposer de la laminine 5 (fig.IV.1). Les cellules MCF10A sont tout d'abord déposées pendant quelques heures sur les gels de PAA présentant des motifs de fibronectine. Les cellules n'ayant pas adhéré sont ensuite rincées II.5. Puis, les cellules MCF10A sont laissées sur la nuit afin de les laisser coloniser toute la surface des motifs pour les conditionner. Le lendemain, les cellules MCF10A sont décollées à l'aide d'EDTA. L'EDTA est utilisé ici car il permettra de décoller les cellules sans affecter les protéines de la matrice extra-cellulaire qui composent les motifs adhérents [27]. Enfin, les cellules d'organoïdes intestinaux sont déposées à la façon de ce qui est décrit dans la figure II.6. Après le conditionnement des substrats par les cellules MCF10A, les cellules d'organoïdes intestinaux adhèrent enfin aux motifs de fibronectine sur gel de PAA. De plus les cellules, restent adhérentes au substrat jusqu'à trois jours de culture au moins (fig. IV.2).

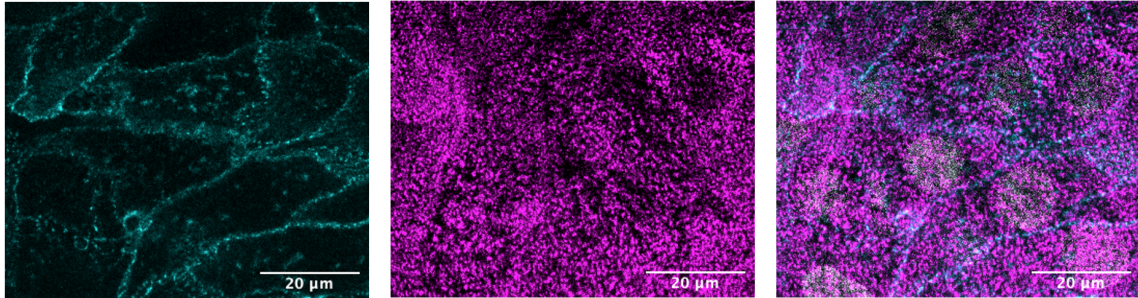


FIGURE IV.1 – Les cellules MCF10A déposent de la laminine 5 sur les substrats.

Cellules MCF10A déposées sur du verre fixées et marquées pour la E-cadhérine (**A gauche**) et la Laminine (**aumilieu**). **A droite** : composite des deux marquages immunologiques. Projection au niveau basal sur 1.5µm.

Après trois jours de culture, les cellules recouvrent entièrement la surface des motifs. L'image des noyaux des cellules fixées après trois jours révèle des domaines plus

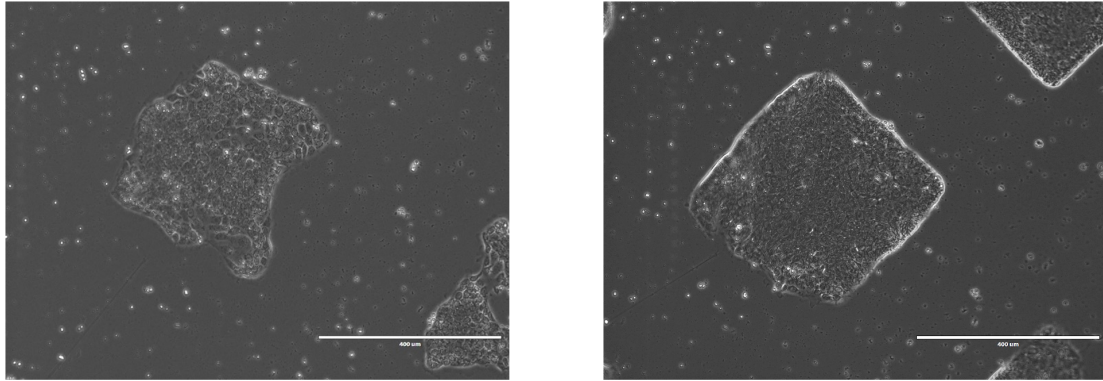


FIGURE IV.2 – Les cellules d’organoïdes intestinaux adhèrent et colonisent les gels de PAA (de 2,4 kPa) avec des motifs conditionnés de fibronectine.

A gauche : cellules d’organoïdes intestinaux au jour 1, 18 heures après leur dépôt sur des motifs conditionnés. **A droite** : cellules d’organoïdes intestinaux au jour 2 sur des motifs conditionnés. Bar d’échelle : 400 μm .

denses et moins denses, à la manière de ce qui est observé sur les cellules cultivées sur des gels sans motif IV.3. Identiquement à ce qui est mesuré dans les expériences sans contrainte géométrique, dans les domaines à la densité plus élevée, les cellules sont aussi plus hautes. Dans les domaines à la densité plus faible, les cellules sont plus étalées. De plus, les domaines de densité cellulaire plus élevée semblent se concentrer sur la périphérie des motifs.

A la manière de ce qui est décrit plus haut, sur des substrats sans motifs, les cellules d’organoïdes intestinaux entièrement dissociées et déposées sur des motifs adhérents semblent s’auto-organiser en domaines de crypte et domaine de cellules différenciées. Les domaines de crypte, riches en cellules souches (LGR5+) semblent se répartir préférentiellement en périphérie des motifs (fig. IV.4).

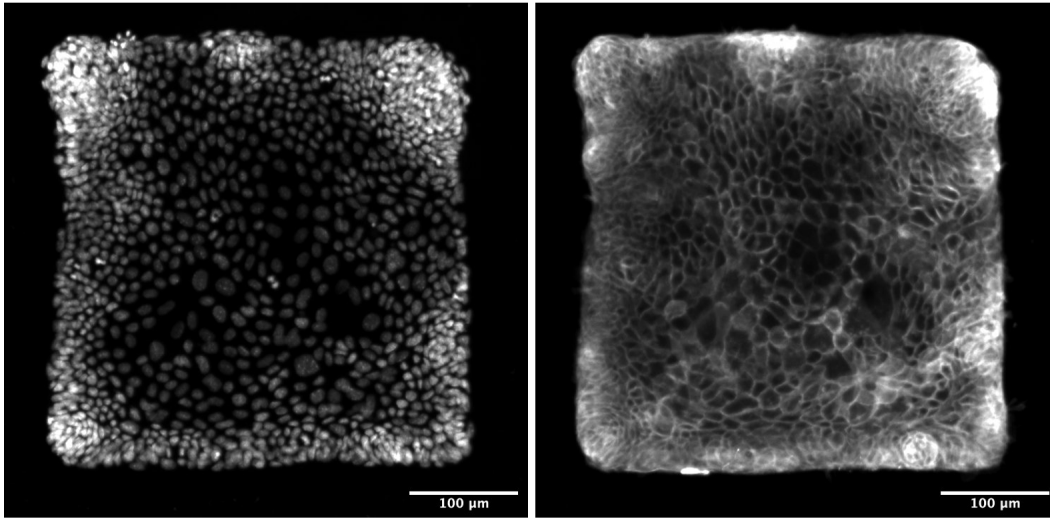


FIGURE IV.3 – Les cellules d’organoïdes intestinaux se répartissent de façon inhomogène à la surface des motifs conditionnés de fibronectine.

Cellules isolées d’organoïdes intestinaux cultivées sur des carrés de fibronectine conditionnés de 500 μm de côté. Les cellules ont été fixées trois jours après leur dépôt. **A gauche** : les noyaux. **A droite** : les membranes.

IV.2 Conclusion et perspectives

En conclusion, nous avons établi dans ce chapitre une nouvelle méthode permettant de cultiver des organoïdes intestinaux en 2D sur des motifs de fibronectine. Le conditionnement des motifs permet aux cellules d’organoïdes intestinaux d’adhérer de manière reproductible à la surface de ces derniers. De plus les cellules adhérentes semblent se ségréger en domaines de crypte et de cellules différenciées, à la manière de ce qui est observé sur les monocouhes d’organoïdes intestinaux sans contrainte géométrique. De plus, sur les expériences d’organoïdes intestinaux plans non-contraints géométriquement, de grandes aires riches en cellules en phase S et en cellules souches (LGR5+) sont visibles en bordure de la monocouche. Identiquement, lorsque les cellules sont contraintes géométriquement, les domaines de crypte semblent se posi-

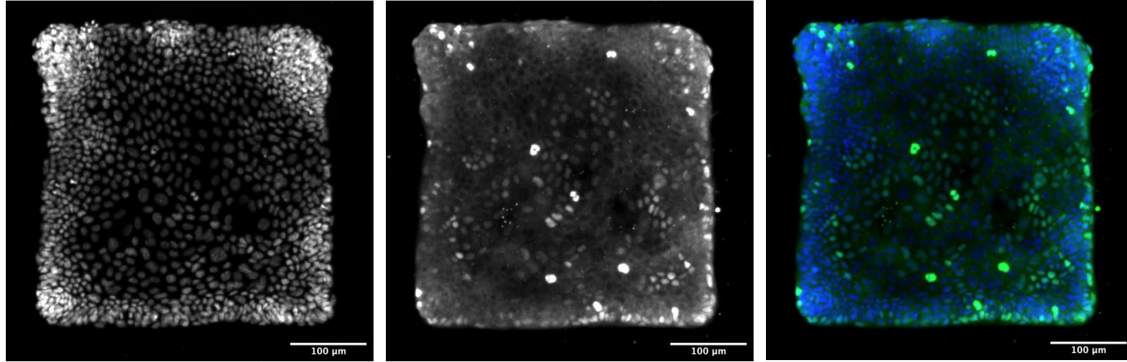


FIGURE IV.4 – Les cellules souches d’organoïdes intestinaux se répartissent de façon inhomogène à la surface des motifs conditionnés de fibronectine.

Cellules isolées d’organoïdes intestinaux villin-tomato cultivées sur des carrés de fibronectine conditionnés de 500 μm de côté. Les cellules ont été fixées trois jours après leur dépôt. **A gauche** : les noyaux. **Au centre** : Les cellules souches (LGR5+). **A droite** : un composite des marquages des noyaux (en bleu) et des cellules souches (LGR5+, en vert).

tionner préférentiellement en périphérie des motifs adhérents.

Ces résultats ouvrent un champ d’étude important. Ils permettraient d’étudier l’effet de la courbure en périphérie des îlots cellulaire sur la formation des domaines de crypte. De même que l’étude présentée par Q. Smith et collègues, l’utilisation de différentes formes de motifs pourraient révéler une répartition de la tension cellulaire qui dirigerait la voie de différenciation des cellules souches [144]. Les cellules d’organoïdes intestinaux pourraient être contraintes sur des triangles, des disques et des étoiles, mais aussi sur des ellipse avec différentes excentricités.

Par ailleurs, il a été montré que les cellules MDCK déposées sur des motifs en ellipse présentaient plus de défauts topologiques à la pointe des ellipses. La présence de ces défauts topologiques entraîne des extrusions [138]. La méthode présentée dans ce chapitre permettrait aussi l’étude des extrusions dans des monocouhes de cellules d’organoïdes intestinaux contraintes géométriquement.

Chapitre V

Conclusion

La morphogenèse et le maintien de l'homéostasie des tissus sont des processus complexes qui mettent en jeu des flux d'informations qui relèvent à la fois de la bio-chimie et de la mécanique. *In vivo*, comme *in vitro*, les cellules souches peuvent s'auto-organiser à partir d'instabilités mécaniques [142, 175, 144, 129]. Ce travail de thèse propose ainsi d'étudier l'effet des signaux mécaniques sur l'auto-organisation et le maintien de la population de cellules souches de l'épithélium intestinal. Il se construit autour de deux axes : un premier qui étudie l'effet de la rigidité du substrat sur l'auto-organisation des cellules de la crypte de l'épithélium intestinal ; puis un second qui se concentre quant à lui sur le rôle des contraintes géométrique dans l'auto-organisation des cellules souches de l'épithélium intestinal.

Ainsi dans la première partie des résultats, il a été montré que les cellules de l'épithélium intestinal s'assemblent de façon spontanée. Ces dernières forment des domaines de crypte séparés des domaines de cellules différenciées à partir d'une population cellulaire homogène et majoritairement souche, et ce en l'absence de courbure ou de cellules du mésenchyme.

Dans cette première partie, ce travail se concentre tout d'abord sur l'effet de la rigidité sur le maintien des domaines de crypte à partir de fragments d'organoïdes déposés sur des gels plans de PAA. J'ai observé la formation des domaines de crypte entourés de cellules allongés présentant des câbles d'actomyosine supra-cellulaires sont séparés des cellules différenciées. De plus, les cellules des domaines se meuvent de façon plus restreintes par rapport au cellules différenciées. Elles possèdent une vitesse plus faible et un mouvement moins dirigé. Enfin, la rigidité du substrat affecte la hauteur, la densité et la prolifération cellulaire des domaines de crypte. Sur des rigidités faibles (370 Pa), les cellules sont plus hautes, plus denses et plus prolifératives.

Ensuite, j'ai questionné la capacité pour des cellules isolées de s'auto-organiser en domaines de crypte et de cellules différenciées. Les cellules isolées mises sur les gels de PAA sont essentiellement des cellules souches (LGR5+) et forment ainsi un épithélium homogène. Puis la proportion de cellules souches (LGR5+) diminue au cours du temps. De plus, la proportion de cellules en phase S diminue au cours du temps et de façon plus rapide sur les substrats rigides. Par ailleurs, le champs de vitesse moyen au cours du temps des cellules montre que celles-ci s'écoulent vers l'extérieur des cryptes. Les cellules s'écoulent plus vite vers l'extérieur des cryptes sur les substrats rigide par rapport aux substrats mous. Ainsi, sur les substrats mous, la proportion de cellules en phase S est supérieure et les cellules s'extraient plus lentement des cryptes. Ces deux raisons expliquent que la taille des domaines de crypte sur les substrats mous soient plus élevée et en augmentation tout au long de leur durée de vie. Au contraire, sur les substrats rigides, la proportion de cellules en phase S est plus faible et les cellules se dirigent plus rapidement vers l'extérieur des cryptes. La taille constante et réduite des cryptes sur les substrats rigides pourrait être expliquée par ces deux causes.

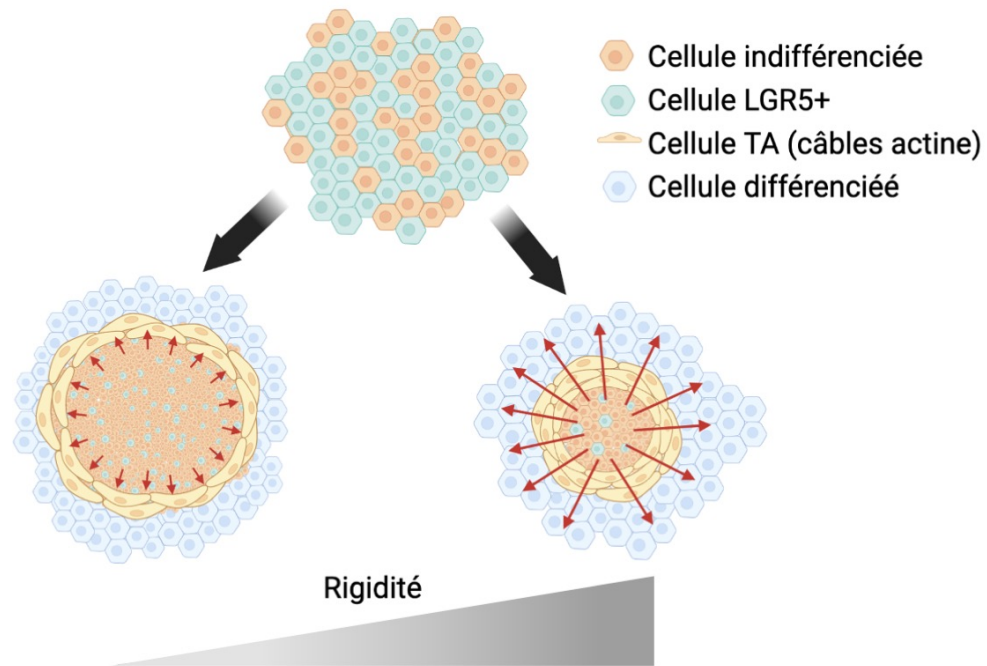


FIGURE V.1 – Schéma de l’auto-organisation des cellules d’organoïdes intestinaux sur des gels 2D de PAA de rigidité différente

A partir d’une population de cellules d’organoïdes intestinaux isolées majoritairement souches, des domaines de crypte entourées de cellules différenciées s’auto-organisent. Les domaines de crypte sont entourés d’une ceinture de cellules très allongées et contractiles présentant des câbles supra-cellulaires d’acto-myosine. **A gauche** : sur les substrats mous les cellules des domaines de crypte sont plus denses, plus hautes et plus prolifératives. La taille des domaines de crypte est plus grande et augmente au cours du temps. La taille des domaines s’explique par une prolifération cellulaire plus élevée et un écoulement plus lent des cellules vers l’extérieur de ceux-ci. **A droite** : sur les substrats rigides, les cellules des domaines de crypte sont plus étalées, moins hautes et moins prolifératives. Les domaines sont en moyenne plus petits et ont une taille constante au cours du temps. La taille des domaines de crypte s’explique par une prolifération cellulaire plus faible et un écoulement plus rapide des cellules vers l’extérieur de ceux-ci.

Ainsi, à la manière de ce qui est expliqué par A. E. Shyer et collègues pour la formation des follicules de plume chez le poulet, à partir d’une population homogène de

cellules majoritairement souches (LGR5+), des instabilités mécaniques permettent la formation de domaines de crypte et de cellules différenciées. La variation locale et aléatoire de la contractilité cellulaire engendre le maintien des cellules souches. C'est à partir de cette variation locale que vont se former les domaines de crypte. La différence observée de comportement cellulaire sur les substrats mous et rigides montre que l'auto-organisation est issue d'instabilités mécaniques.

Ensuite, une hypothèse expliquant ces différents comportements cellulaires sur les substrats mous et rigides est la voie de signalisation Notch. La voie de signalisation Notch régule de nombreux processus cellulaires comme la prolifération ou la différenciation [81]. Dans l'intestin, la voie de signalisation Notch bloque le régulateur de transcription ATOH1 et mène les cellules vers une voie de différenciation d'absorption [31]. Au contraire, lorsque la voie de signalisation Notch n'est pas activée, les cellules se dirigent vers une voie de différenciation de cellule sécrétrice. De plus, elle est une voie de signalisation juxtacrine. La voie de signalisation est activée par le contact direct entre les cellules adjacentes. Ainsi, sur les substrats mous les cellules sont moins mobiles et plus cylindriques. Les cellules adjacentes ont donc entre elles une plus grande surface de contact et un contact plus long. En revanche, sur les substrats rigides, les cellules sont plus mobiles et plus aplaties. Elles ont une surface de contact réduite et un temps de contact plus faible. Par conséquent, la voie de signalisation Notch serait plus probablement enclenchée sur les substrats mous. Ceci corrobore les observations de S. He et collègues. En effet, dans cette étude, les auteurs montrent que sur les substrats mous, les cellules s'orientent davantage vers une voie de différenciation de cellules d'absorption ; tandis que sur les substrats rigides les cellules s'orientent plutôt vers une voie de différenciation de cellules sécrétrices. Par la suite, il serait possible de vérifier cette hypothèse en suivant les cellules au cours du temps afin de mesurer la fréquence de changement de voisin selon la rigidité du

substrat. On pourrait aussi segmenter les cellules en 3D afin de mesurer les surface de contact entre les cellules selon la rigidité du substrat. Enfin, on pourrait mesurer l'effet de la perturbation de la voie Notch dans l'auto-organisation des cellules d'organoïdes intestinaux.

Dans la seconde partie des résultats, nous avons mis au point une nouvelle méthode permettant de cultiver des cellules d'organoïdes confinées dans des micro-motifs. Le conditionnement du substrat par d'autres cellules permet la culture des cellules isolées d'organoïdes intestinaux contraintes géométriquement sur des motifs jusqu'à trois jours au moins. Au bout de trois jours, des domaines de cryptes se forment. De plus, ils se localiseraient de façon plus probable en périphérie des motifs.

Ce travail reste préliminaire, mais il permet de mieux maîtriser les effets de bord et ouvre ainsi la voie à de nombreux autres travaux. En effet, Q. Smith et collègues ont montré que les cellules souches humaines pluripotentes induites s'auto-organisent avec en périphérie des îlots cellulaires des cellules qui se différencient vers une voie de cellules endothéliale [144]. Les auteurs expliquent que la tension cellulaire à des temps précoces dirige la différenciation. Des mécanismes similaires pourraient être étudiés dans notre système grâce à cette méthode de culture de cellules d'organoïdes intestinaux contraints géométriquement.

Par ailleurs, ces travaux ne s'intéressent pas à l'auto-organisation des cellules suite à des instabilités chimiques. Dans ces travaux, un seul milieu qui favorise la prolifération et le maintien des cellules souches est utilisé. Par la suite, il serait possible d'utiliser un milieu favorisant la différenciation cellulaire pour en comprendre les mécanismes.

En outre, ce travail se concentre sur la rigidité de l'environnement. Or le travail de

O. Chaudhuri et collègues montre que la part visqueuse de l'environnement cellulaire joue aussi un rôle dans la voie de différenciation des cellules souches [20]. L'utilisation de substrats à la viscosité variable pourrait permettre l'étude de ces phénomènes dans le contexte des organoïdes intestinaux.

Enfin, la méthode de culture de cellules d'organoïdes intestinaux exposée dans ces travaux de thèse pourrait permettre l'examen de l'effet de la contrainte géométrique et de la rigidité sur l'extrusion cellulaire. En effet, certains motifs comme les ellipse favorisent l'apparition de défauts topologiques localement et ainsi l'extrusion cellulaire [138].

En conclusion et plus largement, ces travaux ont permis de mettre en évidence certains mécanismes cellulaires engagés par des stimulations mécaniques sur la formation et le maintien de la niche des cellules souches.

Annexe A

Liste et référence des réactifs utilisés

Anticorps	Fournisseur	N° de référence
Monoclonal Anti-Uvomorulin/E-Cadherin	Sigma-Aldrich	U3254
LGR5 (GPR49 or GPR67) polyclonal	BiCell	50630
Lysozyme EC 3.2.1.17 polyclonal	Dako	A0099
Villin Monoclonal (1D2 C3)	Dako	M3637
Myosin phospho S19/phospho S20 polyclonal	Rockland	600-401-416
Laminine	Sigma-Aldrich	L9393
Collagène IV polyclonal	Abcam	ab19808
Alexa Fluor™ 647 Phalloidine	Termo Fisher Scientific	A22287
Anti-rat 647	life Technologies	A21147
Anti-souris 488	life Technologies	A11001
Anti-souris 568	life Technologies	A11004
Anti-lapin 488	life Technologies	A11008
Anti-lapin 568	life Technologies	A11011

TABLEAU A.1 – Liste des anticorps utilisés et leur référence fournisseur

Réactifs	Fournisseur	N° de référence
Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix	Corning	CLS354234
Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix	Corning	CLS354230
FBS	Biowest	S1810
DMEM	Termo Fisher Scientific	31966021
Supplément GlutaMAX™	Termo Fisher Scientific	35050061
Pénicilline-streptomycine	Termo Fisher Scientific	15140122
Geneticin™	Termo Fisher Scientific	10131035
Hygromycine B	Termo Fisher Scientific	10687010
TEMED	Termo Fisher Scientific	17919
Advanced DMEM/F-12	Termo Fisher Scientific	12634010
40% Acrylamide Solution	Bio-rad	1610140
2% Bis Solution	Bio-Rad	1610142
APS	Bio-Rad	1610700
3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate	Sigma-Aldrich	440159
Inhibiteur de ROCK Y-27632	Stemcell	72304
4-Hydroxytamoxifen	Sigma-Aldrich	SML1666-1ML
DPBS, sans calcium, sans magnésium	Termo Fisher Scientific	14190094
VECTASHIELD®	Vector laboratories	H-1000-10
ProLong™ Diamond	Termo Fisher Scientific	P36961
PFA	Termo Fisher scientific	28908
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich	X100-100ML
Hoechst 33342	Invitrogen	H3570
Click-iT™ EdU Kit Alexa Fluor™ 488	Invitrogen	C10337
Click-iT™ EdU Kit Alexa Fluor™ 647	Invitrogen	C10340
Cellules L-WRN	ATCC	CRL-3276
TrypLE™	Termo Fisher scientific	12605010
Floospheres 0,2 µm red	Invitrogen	F8810
Floospheres 0,2 µm yellow-green	Invitrogen	F8811

TABLEAU A.2 – Liste des réactifs utilisés et leur référence fournisseur

Annexe B

Revue : Bioengineering methods for organoid systems

Barbara Mercier, Jad Saleh, Wang Xi

REVIEW

Bioengineering methods for organoid systems

Jad Saleh | Barbara Mercier | Wang XI

Université de Paris, CNRS, Institut Jacques Monod, Paris, France

Correspondence

Wang XI, Université de Paris, CNRS, Institut Jacques Monod, Paris, France.
Email: wang.xi@ijm.fr

Jad Saleh and Barbara Mercier contributed equally to this work.

Abstract

Organoids have been widely used in fundamental, biomimetic, and therapeutic studies. These multicellular systems form via cell-autonomous self-organization where a cohort of stem cells undergoes in vivo-like proliferation, differentiation, and morphogenesis. They also recapitulate a series of physiological cell organization, complexity and functions that are untouchable by conventional bio-model systems using immortal cell lines. However, the development of organoids is often not easily controlled and their shape and size are yet fully physiological. Recent research has demonstrated that multiple bioengineering tools could be harnessed to control important internal and external cues that dictate stem cell behavior and stem-cell based organoid development. In this review, we introduce the current development of organoid systems and their potentials, as well as their limitations that impede their further utility in research and clinical fields. In comparison to conventional autonomous organoid system, we then review bioengineering approaches that offer improved control over organoid growth and development. We focus on the genetic editing tools that allow the program of build-in responses and phenotypes for organoid systems with enhanced physiological relevance. We also highlight the advances in bioengineering methods to modify cellular external milieu to generate desirable cell composition, 3D micro-architectures, and complex microfluidic systems. We conclude that the emerging biomimetic methods that employ multidisciplinary approaches could prevail in the future development of organoid systems.

KEYWORDS

biotechnologies, cellular microenvironment, designer biomaterials, organ-on-a-chip, stem cell behavior

INTRODUCTION

Modeling biological processes and diseases in vitro has been the basis of biomedical research. It allows scientists to recapitulate physiological conditions and body functions from the molecular to the cellular, tissue, and organ level. There are advantages in using animal models, since they are in vivo models that have close physiological similarities to human. However,

these models pose many disadvantages such as the biological differences between animals and humans, difficulty in accessing tissues for imaging, costly and time-consuming procedures in generating genetic clones, and limited throughput (Shanks et al., 2009). On the other, for decades, immortalized cell lines cultured on two-dimensional (2D) substrates have been the gold standard for in vitro studies of certain organs or tissues, owing to their simplicity, reproducibility, cost-effectiveness, and potential for long-term culture. Such cell lines are either derived from naturally occurring carcinomas that keep dividing or have been genetically altered to proliferate indefinitely and be cultured for prolonged periods of time. Countless number of cell lines have been developed, each characterized by their own

Abbreviations: 2D, two-dimensional; 3D, three-dimensional; ASC, adult stem cell; ECM, extracellular matrix; ESC, embryonic stem cell; iPSC, induced pluripotent stem cell; ISC, intestinal stem cell; PAA, polyacrylamine; PDMS, poly(dimethylsiloxane); PEG, poly(ethylene glycol); MMPs, matrix metalloproteinases; RGDS, peptide sequence Arg-Gly-Asp-Ser; VEGF, vascular endothelial growth-factor

© 2021 Société Française des Microscopies and Société de Biologie Cellulaire de France. Published by John Wiley & Sons Ltd

phenotype depending on the tissue from which they were derived. One big disadvantage of such cell lines is the fact that they undergo mutations to become immortal and can further acquire genetic variations after many passages, thus are not able to completely recapitulate the cell types found in vivo (Marx, 2014; Zhou et al., 2017). Another drawback of conventional 2D cell culture methods is that they lack the conditions that allow for natural three-dimensional (3D) cellular organization. This significantly affects important cell signaling networks, making 2D systems ineffective for accurate drug screenings (Wang et al., 1998). Additionally, since these cell lines are made of a single cell type, the cell-cell interactions of different cell types are not fully present in these in vitro systems, thus failing to recapitulate certain in vivo signaling pathways. Alternatively, culture methods using stem cells are promising for studying tissue morphogenesis, pathologies, developing new stem cell therapies through drug screenings, and applications in regenerative medicine. However, until recently, conventional stem cell culture systems on 2D substrates relied on culturing specific stem cells or stem cell-derived cell types (McKee & Chaudhry, 2017), which lacked the differentiated cell types found in the native tissue. These systems are unable to provide the proper conditions needed to maintain and expand the stem cell population while at the same time ensuring its potential to differentiate into its different lineages.

As the concerns for the limitations of 2D culture accumulated, researchers devoted their efforts in revealing the roles of extracellular matrix (ECM) in offering important 3D biochemical and biomechanical cues for tissue homeostasis and development. For example, previous works at the end of last century had demonstrated that ECM contributes morphogenic signals during mammary gland branching morphogenesis (Wicha et al., 1980) and disturbing the interactions between gland epithelial cells and ECM causes improper gland development and tumor formation (Roskelley & Bissell, 2002). Such studies illustrated the influence of 3D microenvironment for tissue morphogenesis and the need for cells to be exposed to a physiological exogenous matrix to maintain their differentiated state. Indeed, Emermen and Pitelka (1977) showed that on floating collagen membranes, epithelial cells could maintain their ability of secreting milk proteins as differentiated cells. When the same cells were cultured on 2D plastic culture dishes, they lost this ability even in the presence of lactogenic hormones. Similarly, Bissell and colleagues demonstrated that, unlike monolayer cultures, human mammary epithelial cells within 3D laminin-rich matrices (Matrigel) self-organized into acini-like structures that recapitulated several features of in vivo architectures (Petersen et al., 1992). In this context, 3D culture led to the development of normal and malignant tissues from distinct cell sources, whereas 2D surfaces

led to practically indistinguishable phenotypes (Petersen et al., 1992). These findings allowed scientists to use 3D cultures to decipher the morphogenic processes and the biological activities that cause tumor progression (Muthuswamy et al., 2001; Debnath et al., 2003a,b; Debnath & Brugge, 2005;). For instance, using a 3D model system of growth-arrested human mammary epithelial cells, Bissell and Brugge were able to identify genetic abnormalities associated with the early stages of carcinogenesis in culture (Muthuswamy et al., 2001). They demonstrated that the activation of an epidermal growth factor receptor, ERBB2, in MCF-10A cells during morphogenesis leads to abnormal 3D epithelial architectures with the presence of a multiacinar phenotype. This was attributed to an ability to escape proliferative suppression and the loss of normal apoptotic activity, which are hallmarks of cancer (Muthuswamy et al., 2001). In a following work, such hyperproliferative phenotype induced by oncogenes such as ERBB2 and RAS was found to depend on PI3K activity and only seen in 3D systems, not in 2D culture (Debnath et al., 2003b). All these findings pinpointed the importance of ECM in guiding in vitro tissue morphogenesis so as to enable better mimicking in vivo conditions. The development of 3D ECM culture techniques later laid a key foundation for the emergence of organoid culture.

In parallel to the progression of 3D culture techniques, investigations in embryonic development started to unravel the profound mechanism underlying organogenesis. Additionally, studies of key signaling pathways in stem cell niches of different organs have offered insights into how they are able to control stem cell maintenance and differentiation. Profiting from this knowledge, researchers supplemented 3D culture approaches with essential growth signaling molecules and this helped kick-start the modern field of organoids – the stem cell-derived 3D culture systems that are able to sustain self-renewal, generate multiple cell types, and allow for the spatial self-organization of cells similar to native organs (Figure 1). Starting from the seminal works by Sasai (Eiraku et al., 2008), Clevers (Sato et al., 2009), and colleagues, organoids are commonly developed in a 3D microenvironment of Matrigel that mimics ECM and so far, various organoids have been derived from organ-specific adult stem cells (ASCs), induced pluripotent stem cells (iPSCs), and embryonic stem cells (ESCs). Unprecedented advantages in better emulating in vivo features compared to classical 2D cultures have earned these systems broad recognition in many fundamental and translational biology studies (Lancaster & Knoblich, 2014). Indeed, 3D organoids represent faithfully the tissue homeostasis and organ-specific organogenesis. They harness stem cells as the “draft horse” to enable proliferation and differentiation of multiple, tissue-specific cell lineages. Within the 3D culture environment, these different progenies are able to self-organize into

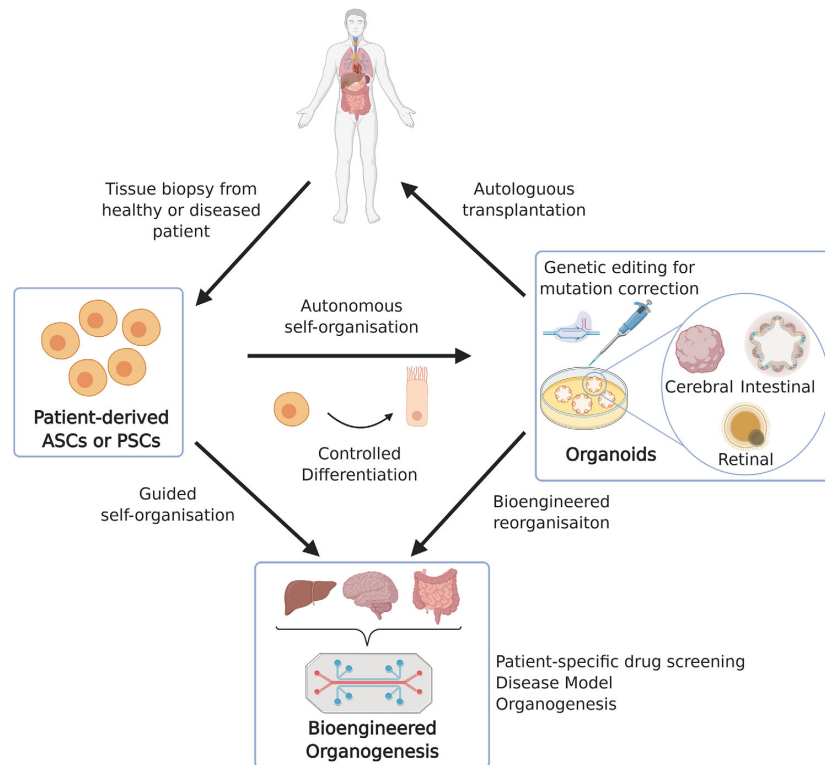


FIGURE 1 Illustration showing organoid development and different applications of organoids. Organoids can be generated from a variety of organs using ASCs or PSCs. They can be genetically modified to model diseases or correct a mutation from patient-derived stem cells. Bioengineering tools can enhance the physiological relevance of organoids and their utility in drug screening, regenerative therapies, and fundamental biology studies

different compartments reminiscent of the *in vivo* organization. Furthermore, such complex structures recapitulate physiological cell polarization, cell–cell interaction, cell–matrix contacts, and even certain functions that match what is seen in native tissues. Hence, organoid systems fill in the gap between *in vivo* and *in vitro* for accurate studies of many biological processes, such as morphogenesis, stem cell niche biology, tissue homeostasis, and the effect of genetic mutations and drugs.

Although using organoid systems has significantly improved our biomimetic platforms, they still possess a number of limitations, which have hindered the full realization of their potentials. One of those is the lack of generic cells such as endothelial, nervous and immune cells, as well as other types of tissues present in the physiological microenvironment (Jabs et al., 2017). Without these supportive cells and proper vascular networks for the nutrient delivery and waste removal, it is difficult to increase organoid size, lifetime, maturation, and complexity. Also prevalent is the problem that many organoids possess an enclosed and physically inaccessible central lumen. Another complication that arises

from current organoid culture is the use of Matrigel as a culture matrix, which is made from mouse sarcoma cells and is known for its batch-to-batch variability. Moreover, organoids do not possess regularly patterned structures as their native tissues in that they are generally allowed to grow freely without the physical and chemical constraints and guidance found *in vivo*. Deriving from such an uncontrolled, cell-autonomous approach, most self-organized organoids present shape heterogeneity, low reproducibility, variability in stem-cell differentiation outcomes, and cell-type(s) composition. These major disadvantages have significantly prevented generating higher-grade organoids and gaining control of their functionalities. Moreover, under the framework of autonomous organization, it is hard to conclude from experimental results whether they are real phenotypes or merely intrinsic inconsistencies due to chances, thus hampering many applications. Therefore, solutions that overcome these major drawbacks of this powerful culture model are currently highly sought-after.

The convergence of bioengineering and organoid biology has started to get a grip on key factors that

underpins stem cell behavior, tissue homeostasis, and cell–cell/cell–environment interactions in organoid systems. The main purposes of such interdisciplinary efforts are focusing on using engineering solutions to harness numerous intrinsic and extrinsic cues to direct the growth, development, organization, and architecture of organoids. The delicate control over intrinsic sensing pathways, genetic information of the cells, tissue–tissue interfaces, rigidity of the substrate, geometry, systemic stress, and vascular components (Murphy et al., 2014; Yin et al., 2016; Brassard & Lutolf, 2019) has enabled one to dictate stem cell fate and guide the organization of their progenies in an organoid. These discoveries fostered the notion that the development of artificial organoid systems could be designed and guided by various bioengineer strategies to further enhance their utility and physiological relevance (Yin et al., 2016) (Figure 1). Particularly, in the past decade, we have witnessed a surge in the development of novel biomimetic approaches for organoid studies aiming either to discover the fundamental biological principles or to revolutionize the existing systems for tissue engineering (Murphy et al., 2014; Yin et al., 2016; Brassard & Lutolf, 2019). In this review, we compare the conventional system exploiting cell-autonomous organization and bioengineering guided organoid formation. By introducing the basic of organoid systems, we pinpoint the numerous and often entwined factors that dictate organoid growth but are currently poorly controlled. We also discuss how advances in bioengineering methods could provide predefined cues to steer the complex organoid organization and leverage the heterogeneous and stochastic nature of organoid development. Finally, we envision that by mastering and carefully integrating bioengineering methodologies, researchers could overcome the challenges in regulating the autonomous self-assembly capacity of stem cells and further the limits of *in vitro* organogenesis to acquire desirable organoid systems.

PERMISSIVE AUTONOMOUS SELF-ORGANIZED ORGANOID

At present, many conventional organoid systems employ “permissive mode” of organoid generation. This means that they mainly rely on cell-autonomous 3D culture techniques that take advantage of the self-organization responses of ASCs of a specific tissue or pluripotent stem cells (PSCs). With minimal exogenously provided controls, such methods “permit” the intrinsic properties of the cells to drive the formation of various organoids. For instance, in their seminal work in 2008 Clevers and colleagues (Sato et al., 2009) observed the growth of Matrigel-suspended intestinal crypts, which house LGR5+ stem cells adjacent to specialized Paneth cells from mouse or human tissues. They discovered

that under the stimulations of small molecules such as EGF, Noggin, and R-Spondin1, these crypts could self-organize into cysts with a central lumen and in the next few days projected irregular protrusions (budding), characterized by the presence of LGR5+ stem cells, Paneth cells, and transit-amplifying cells, the main cell types of intestinal stem cell (ISC) niche. Such multiple “crypt fission events” are accompanied simultaneously with the self-formation of villus-like epithelia (Sato et al., 2009), which also face the lumen and contain all differentiated intestinal cell types, that is, enterocytes, and tuft, enteroendocrine, goblet, and M cells. In short, these intestinal tissue-resembling organisms, or intestinal organoids (“mini-guts” [Sato et al., 2009]) were emerged by the orchestrated effects of proliferation, differentiation, organization, and migration of ISCs in a cell-autonomous manner. The lineage potential and the stage of stem cells are then major determinants of organoid development. As such, ASC-derived organoids reflect closely the adult tissue homeostasis and renewal processes and are restricted to certain kind of tissue. Until now, with relentless efforts organoids have been generated from various individual tissues, including pancreas (Huch et al., 2013), liver (Huch et al., 2013), prostate (Karthaas et al., 2014), and stomach (Barker et al., 2010) (Figure 1). Alternatively, under coordinated regulation, PSC’s broad potency would allow one to obtain multiple lineages, reflecting various types of tissues. For example, the PSC-originated intestine (Spence et al., 2011), gastric (McCracken et al., 2014) and lung (Dye et al., 2015) organoids contain one co-evolved mesenchymal cell layer. This property adds a level of organ-like complexity to the PSC-originated organoid development and makes them an excellent candidate for the study of tissue-tissue crosstalk (Brassard & Lutolf, 2019). Hence, PSC may represent the optimal starting point for generating various organ ontogeny models and early stage embryonic systems to study the relative contribution of many cues and molecular factors to a complicated morphogenetic process. This has been successful as exemplified by numerous PSC-derived organoids, including intestine (Wells & Spence, 2014), brain (Lancaster et al., 2013), kidney (Takasato et al., 2014), liver (Takebe et al., 2013), lung (Dye et al., 2015), blood vessel (Wimmer et al., 2019), and optic cup (Eiraku et al., 2011) (Figure 1). Although PSC-derived organoids employ self-assembly at the pluripotency stage, it often requires the set-up of complicated culture conditions to limit the developmental variations and guide differentiation (Taguchi et al., 2014; Taguchi & Nishinakamura, 2017). In case the organoid development becomes unpredictable, it could result in uncontrolled growth of tissue aggregates as exemplified in the formation of optic cups with random number of vesicles per aggregate (Eiraku et al., 2011) and stomach organoids (Noguchi et al., 2015) that are embedded inside an arbitrarily distributed cell mass.

The advantages of organoids include incomparable complexity in terms of architecture and function by recapitulating the different population of cells in tissues (Sato & Clevers, 2013; Lancaster & Knoblich, 2014), versatility and relative simplicity of culture as well as the compatibility with many existing biological tools. These have made them an excellent biomimetic proxy for health and disease tissue development studies (Figure 1). Under a permissive condition, the formation of organoids by a group of stem cells include complex processes of self-sorting, self-patterning, and self-morphogenesis (Sasai, 2013). These processes reflect largely how intrinsic cell properties response to and regulate time-evolving local microenvironment and result in the control of relative cell positions, regulation of different cell status and emergence of an ordered organization via intrinsic tissue mechanics constraints. Hence, such systems may offer clues to long-standing matter of intrigue and interest in developmental biology. For instance, the interplay between Wnt-activated Lgr5 stem cells and Paneth cells is the key to self-renewal of gut organoids (Sato et al., 2011). Their physical association *in vitro* resembles their interdependence *in vivo* and reflects intestinal crypt self-sustaining mechanism. Additionally, other morphogenetic mechanisms, such as the self-organization of optic-cup from homogeneous progenitors (Eiraku et al., 2011) and forebrain tissue formation guided by long-range signaling (Cederquist et al., 2019), have also been revealed using organoid systems. Following this line, organoids have also been extensively used to model human disease development, such as cancer (Sato et al., 2011) and cystic fibrosis (Schwank et al., 2013), and to develop personalized regenerative medicine (Schwank et al., 2013). A representative example is the establishment of cancer organoids (tumoroids) from different patient biopsy samples (e.g., stomach (Bartfeld et al., 2015), liver (Broutier et al., 2017), and colon (Sato et al., 2011)). These tumoroid models not only recapitulate the molecular fingerprints of their origins, but also show high morphological similarity in the histological subtypes and differentiation phenotypes (Fujii & Sato, 2021). Additionally, architectural and genetic heterogeneity of *in vivo* tumors are also highly preserved by tumoroids that are self-organized by cell sorting (Broutier et al., 2017). These features allow direct investigation on the functional, developmental, and metabolic characteristics as well as drug responses of cancer-derived tissues. In a recent work by Broutier et al. (2017), liver tumoroids have been used for drug-screening test and provided the proof-of-principle of the therapeutic potential of the ERK inhibitor SCH772984 in treating liver cancer. In addition, PSC-derived liver organoids have offered new opportunities in investigating liver fibrosis and toxicity (Coll et al., 2018). In another work, Bartfeld et al. (2015) established healthy and cancerous gastric organoids and infected them with *Helicobacter pylori*.

In this way, they identified the activation of the nuclear factor- κ B pathway and up-regulated gene human chorionic gonadotropin β , which are associated with stomach cancer (Yakeishi et al., 1990). Moreover, although there are still major hurdles to overcome to use organoids for regenerative medicine, pioneering studies, such as organoids from renal cancer patients (Grassi et al., 2019), have started to pave the way to orthologous organ replacement (Schwank et al., 2013; Takebe et al., 2013) and reduction in the use of animal models (Fujii & Sato, 2021) for ethical reasons. The recent promising breakthroughs in this direction has been extensively reviewed by multiple groups (Clevers, 2016; Li & Izpisua Belmonte, 2019; Okamoto et al., 2020).

As organoids are approaching their initial destination of modeling healthy and pathological phenotypes, problems associated with cell-autonomous self-organization also emerged. First, this self-assembly process as mentioned above normally leads to organoids with a physically inaccessible lumen. This makes it difficult to access the apical part of the tissue in intestinal organoids for example, where the differentiated surface analogous to the intestinal cavum for nutrient absorption is facing a sealed off lumen (Figure 1). Such a configuration does not allow shedding dead cells either, resulting in a necrotic core that limits organoid size and disturbs long-term imaging. It also prevents direct probing tissue responses to other exogenous stimuli that interact with the *in vivo* luminal epithelial surface, such as metabolic enzymes and microbial communities (Astashkina et al., 2012). Although the polarity of conventional enteroids could be everted to an apical-out polarity by removing ECM scaffold proteins (Co et al., 2019), such an approach reduces the percentage of proliferating cells in the organoids, thus raising doubts about their capability of self-renewal and long-term culture of the system. Besides, the autonomous approach often fails to develop organoids consisting of generic cell types and tissue-tissue interfaces. Using self-organization method, this problem is partially mitigated by co-culture of cells sharing different origins. For instance, co-culture of human iPSC-hepatic endoderm cells, umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and mesenchymal stem cells (MSCs) could generate liver buds consisting of endothelial networks (Takebe et al., 2013). The introduction of human blood vessel organoids (Wimmer et al., 2019) may also trigger the formation of perfused vascular trees between avascular organoids. Similar co-culture approaches have been applied to create neural/intestinal (Workman et al., 2017), hepatic stellate cells/hepatocytes (Coll et al., 2018), and tumor/immune cells (Dijkstra et al., 2018) interfaces in organoids. Nevertheless, these co-culture systems still fail to reproduce organ-like high-order of structural and cellular sophistication. Furthermore, the permissive systems are lacking regulative factors that

could limit the inter-organoid variability in their relative cellular components, dimension, and architectural features. Such variabilities due to iterative cell autonomous interaction with other cells and local chemical, biophysical cues lead to poor reproducibility, and functional immaturity that hamper organoid's applications in bio-modeling and potential for transplantation. Various efforts have been made and bioengineering methods have shown promising results in improving organoid systems.

BIOENGINEERING APPROACHES FOR GROWTH AND DEVELOPMENT OF ORGANOIDS

The emerging field of organoid systems has offered a promising platform to bridge the current significant gap between *in vivo* and *in vitro*. In addition, the study of organoids and the properties of stem-cell based self-organization bolsters the notion that with proper guidance that is lacking or poorly controlled with conventional culture methods, various functional organ tissues could be reproduced in a test tube (Brassard & Lutolf, 2019). However, current culture approaches that are fully relied on the autonomous assembly of stem cells has led to low reproducibility, uncontrolled cell type development, limited tissue size, maturity and life span, and organoids of partial components of native tissues (Yin et al., 2016; Brassard & Lutolf, 2019). These drawbacks have significantly impeded the realization of the full potential of organoids in fundamental biology, tissue engineering, and regenerative therapies (Yin et al., 2016). To overcome these challenges, researchers have found resort in bioengineering methods to provide precise control over intrinsic properties and cellular environment and guidance for the growth and development of organoids. Herein, we discuss the emerging strategies and highlight the latest bioengineering advancement to acquire desirable organoid systems.

Customize intrinsic properties of stem cells

Within the framework of self-organization, one key factor that determines the characteristics of organoids is the intrinsic stem cell properties, such as the lineage potential and the stage of stem cells. These genetic properties of stem cells may be expanded and modified by the recent advances in biotechnology for direct manipulation of endogenous genes through CRISPR or TALEN technology. The genetic modification could trigger novel changes in stem cell behaviors and then results in user-defined organoids accordingly (Figure 2a). A seminal work by Schwank et al. (2013), has demonstrated that organoids developed from ISCs of cystic fibrosis patients

could be reverted to normal organoids via CRISPR/Cas9 editing. The researchers targeted single-gene mutation by deleting phenylalanine at position 508 and generated intestinal-organ-like units for autologous transplantation back into the patients for tissue repair and functional restoration. Such genome editing approach then offers a new possibility to generate sources of tissue for autologous therapy (Yui et al., 2018). Alternatively, transcription factor expression could be modified to genetically guide morphogenesis events (Velazquez et al., 2018). A transient pulse of GATA-binding protein 6 expression induced by genetic engineering has led to the development of multiple germ layers and liver bud-like phenotype (Guye et al., 2016). These genetic tools also significantly extend our sources of stem cells. In the case of patient-derived organoids, for example, the direct establishment of organoid-based disease models could be difficult when the disease itself is ultra-rare or due to lethal genetic defects before birth (Fujii & Sato, 2021). Using gene-editing technologies, such as lipofection-based transfection (Schwank & Clevers, 2016), lentiviral infection (Koo et al., 2012), and electroporation (Fujii et al., 2015), to induce mutations of specific genes (Drost et al., 2015; Matano et al., 2015) (Figure 1), various disease models due to genetic and epigenetic aberrations can be reconstructed in the form of organoids. Furthermore, cell–cell interactions and cellular behaviors can be modulated by modifying the cell membrane with DNA (Gartner & Bertozzi, 2009; Todhunter et al., 2015), liposomes (O'Brien et al., 2015), and aptamers (Zhao et al., 2011) to regulate cell adhesive properties (Figure 2a) and with growth-factor loaded nanoparticles to control autocrine signaling loop (Stephan & Irvine, 2011) (Figure 2a). On a DNA-patterned template, cells functionalized with short and degradable oligonucleotides can reversibly adhere into arrays in a modular fashion (Todhunter et al., 2015). Hybridization of complementary DNA then further allow the assembly of DNA-coated cells with user-specified cell–cell contacts, resulting in robust cell sorting and tissue–tissue interfaces during the building of 3D microtissues (Gartner & Bertozzi, 2009). Thus, such a treatment could be applied to modify the cell membranes of different stem cells to offer promising control over organoid self-organization processes. For instance, the formation of Rathke's-pouch-like tissue structures occurs at the interface of non-neural head ectoderm and hypothalamic neuroectoderm (Suga et al., 2011). To produce such defined tissue–tissue interfaces that are important for the self-driven morphogenesis, desirable cellular interconnectivities could be modulated by cell membrane-modification, leading to artificial cell sorting with controlled layer formation. Moreover, for autologous transplants therapeutic stem cells could be surface-engineered and harvested in the form of organoids to endow the donor cells specific adhesive properties to engage targeted cells or tissues (Stephan & Irvine, 2011; Zhao et al., 2011).

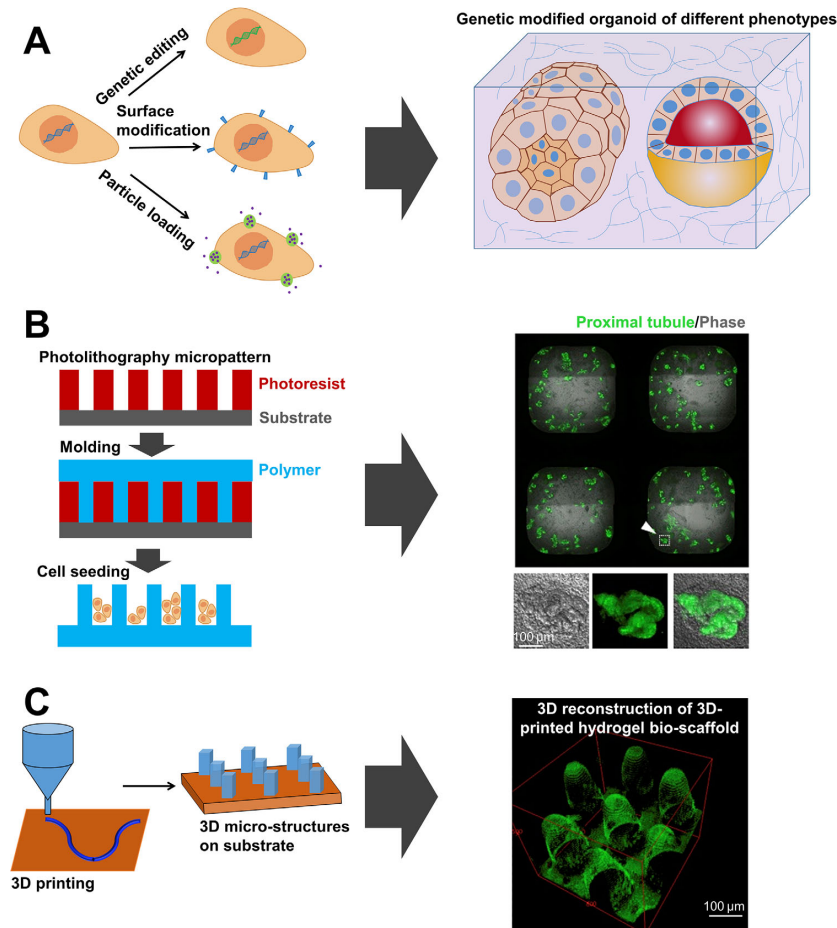


FIGURE 2 Illustration showing various bioengineered approaches for organoid growth and development. (a) Stem cells are genetically modified or their surfaces are conjugated chemically for programmed assembly or loaded with growth factor-bearing microbeads for regulating autocrine/paracrine signaling. These methods could generate user-defined organoid phenotypes. (b) Soft lithography can produce 3D confinement, such as micropits, to form initial stem cell aggregates. This approach led to the formation of kidney organoids inside wells of 384-well plates as described by Czerniecki et al. (2018). (c) 3D printing fabricates 3D bio-scaffolds to provide physical boundaries as showed by Creff et al. (2019)

Synthetic hydrogels for organoid studies

In conventional organoid systems, the organization of the cell mass is highly stochastic and its cell-type composition highly heterogeneous. For example, in intestinal organoids, crypts are random oriented and the length and number of crypts can vary considerably from one organoid to another. Such a lack of reproducibility is mainly due to uncontrolled stem cell proliferation and differentiation in a 3D matrix. Recent investigations have shown that stem cell behaviors are controlled by its external microenvironment (Daley et al., 2008) and the properties of the matrix (Murphy et al., 2014). The cell-substrate interplay via cell adhesive properties allow

stem cell to sense the stiffness, nanotopography, geometry, and chemistry of ECM. This together with cell-cell interaction and soluble biochemical cues (see section Spatiotemporal control of diffusive biochemical signals) in space and time leads to dynamic sensing signaling cascades that regulate stem cell fates and self-assembly. Thus, the biomaterials used for organoid culture should provide essential *in vivo* cues and means to control these cues for the growth of organoids.

The most commonly used substrate for growing organoids is Matrigel, a gelatinous protein mixture extracted from Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma cells (Hughes et al., 2010) via decellularization of native tissues. The aim of such a process is to remove

cellular component from the tissue by mechanical, chemical, and enzymatic means while reserve the ECM compositions, such as chemical components and ultrastructure (Badylak, 2004; Hussey et al., 2017), resulting in biocompatible scaffolds. Such ECM-derived bioscaffolds have been produced in the forms of hydrogel (Hughes et al., 2010), including Matrigel and collagens, dry sheets (Badylak et al., 2009), or powders (Gilbert et al., 2005) and have been shown to support stem cell growth and self-assembly. Another class of native-derived ECM consists of scaffolds made from decellularized organ tissues that preserve both the structural and functional integrity (Song & Ott, 2011). Using cells of the same origins, it is possible to repopulate the organ-specific ECM scaffolds. For instance, in an attempt to form intestinal epithelial barriers in vitro decellularized gut matrix was capable to support ISCs expansion and differentiation, as well as the co-culture of gut-derived fibroblasts (Schweinlin et al., 2016). However, ECM of natural sources is inherently heterogeneous, resulting in high batch-to-batch variation and potential xenogeneic contamination (Tong et al., 2018; Xi et al., 2019), which could further contribute to the variation in organoid development. Moreover, these materials are normally weak in mechanical properties and their multiple components lack instructive spatiotemporal distribution. This impedes the reproduction of elaborate morphogenesis that is guided by highly regulated cues in vivo. These challenges can be addressed by the development of synthetic elastomeric matrices with defined compositions and properties. Multiple variables, such as adhesive ligand density, crosslinking degree, material viscoelasticity and topography, porosity, as well as degradability, are controllable by modern synthetic chemistry approaches (Lu et al., 2016; Rosales & Anseth, 2016). For example, inert poly(ethylene glycol) (PEG) hydrogels could be enriched with fibronectin, laminin, hyaluronic acid, collagen, perlecan, and RGD (Arg-Gly-Asp) peptide to mimic essential in vivo biochemical signals. Degradable PEG gels could be made by incorporating hydrolytically or enzymatically labile segments to offer dynamic mechanical properties (Gjorevski et al., 2016). In a recent attempt, a four-arm PEG hydrogel with maleimide terminus and tunable mechanical properties was prepared and functionalized with adhesive RGD peptide in a co-polymerization procedure (Cruz-Acuña et al., 2017). This synthetic matrix was able to support reproducible human intestine and lung organoid development in vitro. The hydrogel can also act as delivery vehicles of organoids for engraftment at implantation sites, avoiding the risks of immunogen and pathogen transfer posed by natural tumor-derived ECM matrices.

Besides PEG, other promising materials for producing defined matrices include polyacrylamine (PAA), and natural macromolecules, such as alginate, agarose, fibrin, and collagen (Yin et al., 2016; Brassard & Lutolf,

2019). The exquisite tuneability of their material properties enables systematic variations and test with robotic micropatterning techniques (Ranga et al., 2014; Gobaa et al., 2011). One could produce large arrays of hydrogels with different elasticity, porosity, degradability, and chemical compositions for the evaluation of the influence on stem cell behaviors. From such high-throughput analysis on multiple parameters, researchers could extract the information about the most suitable biomaterial combination for modulating organoid in a desired manner. For instance, synergistic or antagonistic effects among degradability, biochemistry, rigidity, and cell density on ESC self-renewal capacity in hydrogels had been unraveled using 3D liquid-dispensing technology (Ranga et al., 2014). Furthermore, physiological topography cues down to nanometer scale could be added to synthetic bio-scaffolds as another layer of complexity using electrospinning, nanolithography, and selective etching. These technologies allow for the production of artificial substrates consisting of ultrafine fibers (by electrospinning), nano-scale features (i.e., nanowells, nanolines, nanopillars by nanolithography), and roughen surfaces (by etching). These topography features have been shown to impact profoundly on stem cell fate and behavior (Murphy et al., 2014). For example, nanopits and nanogratings could elicit changes in alignment, adhesion, and mechanical properties of human stem cells (Yim et al., 2005; McMurray et al., 2011), impacting differentiation, expansion, and self-renewal, thus providing artificial guidelines for the later development of organoids. Besides guiding stem cell behaviors, hydrogels were also produced in other formats for various applications. For example, a thermoresponsive hydrogel that transits from liquid to solid phase between 4°C and 37°C allows serial expansion and rapid retrieval of hPSCs for biomedical applications (Lei & Schaffer, 2013). For scalable expansion and differentiation of PSCs, alginate beads (Swioklo et al., 2017) and capsules (Horiguchi & Sakai, 2015; Fattahi et al., 2021) that are loaded with stem cells were also developed to match production using industrial scale stirred tank bioreactors.

Nevertheless, in compared to native ECMs such as Matrigel, synthetic bioscaffolds are still in primitive stage as their major drawback is the usual lack of dynamic properties of native matrices for cell-driven remodeling. Synthetic hydrogels formed via stable, covalent crosslinks generally do not allow for broad matrix remodeling and fiber displacement (Blondel & Lutolf, 2019), that prevents in vivo like morphogenesis processes and obtaining organoids of large size (millimeter scale). Hence, the future development of synthetic designer matrices for organoids would need to include bioresponsive materials (Lu et al., 2016; Rosales & Anseth, 2016) that contain physical crosslinks and/or active bonds susceptible to proteolysis or enzymatic

degradation. These components would allow relaxation and rearrangement in response to cellular forces and enzymatic cleavage, mimicking native ECM mechanics. For example, RGD, a generic cell adhesion peptide, could be coupled to long and flexible tethers in hydrogels that allow cells to reorganize and pull them into clusters (Kuhlman et al., 2007). To produce cell-degradable matrices, peptide-based cross-linkers that are susceptible to proteolysis and other enzymes such as plasmin, elastase, and matrix metalloproteinases (MMPs) can be included in functionalized hydrogels (Fonseca et al., 2014; Huang et al., 2017). The hydrogels containing synthetic peptides, which are recognizable and responsible to local cell-secreted protease levels, then enable cell-mediated point of clearance, promoting desired cellular behavior, such as directed migration (Raeber et al., 2005). In addition, bio-reactive hydrogels that mimic matrix stiffening during aging, development and disease have been developed by multiple approaches to study various collective cell mechano-sensing mechanisms (Guvendiren & Burdick, 2012; Baker et al., 2015; Ondeck et al., 2019). Interestingly, another level of complexity in bioreactivity can be achieved by incorporation of multiple bioresponsive sites. By combining protease-degradable sites, cell-adhesion motifs, and growth factors in PEG for instance, sustained delivery of vascular endothelial growth-factor (VEGF) could be achieved during MMP-regulated hydrogel degradation, promoting vascularization *in vivo* (Phelps et al., 2010). Nevertheless, many of these materials have not been applied to organoid studies. Furthermore, major hurdles in developing bioactive hydrogels, including controlling polymerized/depolymerized byproducts and gel degradation kinetics in biocompatible and bio-inert formats (Huang et al., 2017), are still ongoing challenges to be conquered. Significant improvement and convergence of synthetic ECM and organoids in the future should lead to the generation of mimicking systems to study tissue homeostasis and pathogenesis.

Bioengineering seeding conditions

In vivo, diffusive chemical gradient could be caused by unevenly distribution of specific cell types. In the case of intestine, Paneth cells are restricted in the crypts and secrete Wnt3 and EGF for the maintenance of stem cell niche (Wang et al., 2018). Along this line, by seeding different amounts of cells in defined location one could generate artificial chemical gradient cues in the later culture condition for organoid growth. In a recent study by Lancaster et al. (2017), the initial size of cell aggregates was shown to dictate the neuroectodermal formation of brain organoids. In fact, the initial aggregate size was found to influence complex tissue organization and architecture or even cause failure in organoid development. An elegant method to control the seeding aggre-

gates is to place defined number of cells in micropits that is microfabricated by soft lithography (Czerniecki et al., 2018; Shin et al., 2018) or stencil stamping into soft gels (Nelson et al., 2006). Soft lithography (Figure 2b) produces micropatterns by placing a mask between a UV light source and a photosensitive resin. After development, the arbitrary features on the photopolymer could be replicated by silicon-based organic polymers such as poly(dimethylsiloxane) (PDMS), generating microscale pits or pillars on the surface. The PDMS replica can then be used directly as micropit arrays or to fabricate other hydrogel substrates by replica molding. Stem cells that are seeded into these arrays are confined and when under centrifugal or gravity force, the confinement allows the formation of cell aggregates (Figure 2b). Additionally, different cells could be added into micropit arrays to increase component complexity and create interfaces among different cell types. This approach can also be conveniently scaled up to produce organoid arrays for several translational applications. In a recent example, PEG micropit arrays have been mass fabricated and directly anchored at the bottom of conventional multiwell plates for trapping stem cell aggregates at predefined focal plane (Brandenberg et al., 2020). In this way, large arrays of patient-derived colorectal cancer organoids were generated with high reproducibility and homogeneity for high-throughput anticancer drug screening. The combination with fast imaging and automated computations then enables high-content image-based phenotypic analyses to gain insights into drug-response mechanisms by real-time analysis of thousands of organoids.

Following the request to control cell–cell and tissue–tissue interface for adding another level of complexity to organoids, 3D bioprinting technologies (Figure 2c) using biocompatible ink (Murphy & Atala, 2014) have been applied to the organoid field. The bio-inks are normally a mixture of hydrogel and soluble nutrients to support the survival, proliferation, and growth of cells or organoids. In comparison with homogenous co-culture method (Takebe et al., 2013), 3D bioprinting allows different living cells/organoids to be embedded into various bio-inks and deposited by multiple ejectors in precise locations in an additive layer-by-layer fashion. With this approach, cell masses containing multiple lineages and complicated structures could be obtained according to needs. For instance, the fusion of human cortical and thalamic organoids *in vitro* recapitulates the thalamocortical projections between thalamus and cortex (Xiang et al., 2019). This requires close position of these two types of organoids next to each (Xiang et al., 2017), which is, however, highly stochastic and labor-intensive. Precise spatial manipulation offered by 3D bioprinting should help to create robust, user-defined organoid–organoid interfaces and to decipher the principal mechanisms for tissue regeneration and interactions. In a recent work by Brassard and colleagues, mouse stomach corpus stem cells and ISCs were bioprinted inside

3D culture matrices to create centimeter long tubular tissues to mimic gastrointestinal tract (Brassard et al., 2021) for applications in drug discovery and regenerative medicine. Additionally, organoids that mimic liver, muscle, and blood vessels have been created by 3D bio-printing for toxicology testing (Kang et al., 2015). The precise manipulation of stem cell niches then provides an interesting possibility for integrating multiple tissues to kick-off the formation of a multi-organoid system and for the study of their interactions and fusion in later remodeling (Guyen et al., 2015).

Controlling mechanical cues in organoid systems

As briefly mentioned above, external mechanical properties are known to affect stem cell fate and behaviors with a rivalry potency to biochemical signals. Indeed, stiffness alone can specify the differentiation of stem cells (Engler et al., 2006) in 2D context. In the case of organoids, Capeling et al. (2019), have demonstrated that mechanical support alone is sufficient to foster human intestinal organoids survival and development. Using alginate as a minimal support, the researchers found human intestinal organoids differentiated indistinguishably from those grown inside Matrigel. Recent bio-engineering efforts have focused on developing multiple approaches to provide inherent, instructive mechanical cues according to different developmental stages of organoids. This is elegantly exemplified by Gjorevski et al. (2016), who embedded ISCs in a mixture of mechanically static and dynamic PEG gels. The ratio between these two gels decided the degradability of the mixed matrix, allowing a control over the gel softening profile over time. The intestinal organoids inside the gel then experienced a decreasing mechanical elasticity. Their set of experiments interrogated the effects of external mechanical properties on intestinal organoid development and found that ISC expansion was enhanced by a high matrix stiffness while a soft matrix and laminin adhesion were optimal for ISC differentiation. Hence, this approach may mimic tissue evolution in responses to ever-shifting characteristics of native ECM. Similarly, in allyl sulfide hydrogels with photocleavable bonds, crypt-like structures formation in intestinal organoids was improved with matrix softening by photochemically induced degradation (Hushka et al., 2020). Additionally, the crypt-formation was accompanied with the differentiation of ISCs into Paneth cells. These studies underscore the interdependence between stem cell fates and material mechanical properties and such active matrices then allow eliciting defined ISC behavior patterns for intestinal organoid formation at certain time point or with light control. The latter case is particularly interesting as the photodegradable material can be easily combined with light-based patterning technologies (Strale

et al., 2016). However, degradable hydrogels might limit the long-term culture of organoids, as their supportive networks become unstable during irreversible degradation. Ideally, crosslinked networks of bio-hydrogels should be photoreversibly controlled via different wavelengths (or by other means) and as such, one can induce local/overall changes in the gel modulus at any time to modulate ISC behavior. Furthermore, many tissue developments *in vivo* are associated with stable mechanical strain. To investigate the effects of such strain, Poling et al. (2018) recently incorporated a compressed nitinol spring into mesentery of mice, where human intestinal organoids were grafted. Under the stimulus of uniaxial strain, the transplanted organoids were found to have promoted intestinal maturation as well as native-like transcription and morphology. Similarly, using *in vitro* stretching devices to actuate organoids also promote the growth, patterning, and morphogenesis in human neural tube organoids derived from single hPSC (Abdel Fattah et al., 2021). These technologies would further improve our understanding of the role physical interactions via mechanical forces in regulating complex spatial organization in tissue.

Regulating topographic cues for organoid growth

Conventional organoids embedded in uniform 3D hydrogel without topographic features usually form a spherical architecture enclosing a lumen. Such an architecture exhibits a gap between *in vitro* and *in vivo* configuration, where native tissue often present highly regular shapes and organizations. For instance, small intestine epithelium lines the mucosa and organizes into highly regular crypt and villus structures, where cells of varied functions are found. Hence, 3D topographic cues of ECM may provide boundary conditions and guidance for the tissue architecture formation and integration. Indeed, when transferred from 2D substrates to 3D scaffolds, epithelia need to regulate its tissue contractility according to the geometry for the preservation of the tissue integrity (Salomon et al., 2017). Mammary epithelial cells may also take advantage of geometric cues to initiate morphogenesis processes, such as branching from epithelial tubules that are confined by the shape of hydrogel matrices is highly consistent with the patterned geometry (Nelson et al., 2006). Thus, it is necessary to fabricate 3D scaffolds with appropriate micro-structures to mimics physiological boundaries. A recent attempt in this direction was achieved by combining photopolymerizable hydrogels with high-resolution stereolithography to generate crypt and villus arrays to mimic the intestinal epithelium (Creff et al., 2019) (Figure 2c). This 3D scaffold could support the growth of Caco-2 cells for 3 weeks, leading to a differentiated epithelial layer. Another example also used photolithography and

molding to fabricate similar crypt and villus micropatterns in collagen substrates (Wang et al., 2017). Using these 3D scaffolds and under a conventional culture condition for intestinal organoid expansion, ISCs from human intestinal organoids formed a 3D self-renewing epithelium. In addition, by combining the topography with gradients of morphogens, the ISCs were guided into *in vivo*-like configuration recapitulating cell-specific compartments and distribution with directional cell migration along the crypt-villus axis. The same group of researchers also used a similar approach to reproduce *in vitro* crypt structures for human colonic epithelium, mimicking multiple aspects of colonic tissue (Wang et al., 2018). These studies provide means to control topographic cues and demonstrate their importance for organoid development. Of note, such an *ex vivo* models offer an open apical part of the tissue, thus allowing a broad range of physiological relevant experiments, such as epithelial defense, metabolism, and studies of drugs, microbiota, and toxins in intestinal context.

Spatiotemporal control of diffusive biochemical signals

During organogenesis, gradients of biochemical signals including morphogens and growth factors play an important role in triggering symmetry breaking, polarization, and pattern formation in the tissue. However, conventional organoids are flooded with homogeneous medium without any spatiotemporal modulation of these cues, resulting in significant differences between *in vivo* and *in vitro* tissue development and organization. To overcome this drawback, microfluidic systems have been employed to recreate the biochemical gradients for organoid growth and organization. For instance, colonic organoids or individual stem cells had been placed in a microengineered gradient channel, where linear gradients of Wnt3a and R-spondin1 were generated by diffusion (Attayek et al., 2016). Such an exposure caused higher degree of polarization in colonoids in compared to those cultured without a gradient. It is also noticeable that stem cells were polarized more in the form of single cells than those within colonoid fragments, suggesting that the cell clusters may already have other intrinsic pre-patterns that counteract the influences of external stimuli. Besides microfluidics, biochemical gradient can also be created by tethering biomolecules, whose active sites are masked with a photo-degradable moiety, into a hydrogel matrix, rendering photo-responsive release (Gjorevski et al., 2014). This method is also compatible with photo-patterning technologies, enabling precise creation of localized biochemical patterns within a matrix with light. In a work using this photodegradable tethering approach (Kloxin et al., 2009), a peptide (sequence Arg-Gly-Asp-Ser, RGDS) coupled to a

PEG hydrogel via photolabile moieties was cleaved from the network upon selective irradiation. The release of the peptide RGDS then led embedded human MSCs down the chondrogenic pathway. Similarly, nanoparticles or degradable vehicles can be loaded with growth factors and tethered to cells or the networks of hydrogel to mimic autocrine, paracrine, and juxtacrine signals (Stephan & Irvine, 2011). Further efforts are still required to fully realize the potentials of these techniques in the field of organoid.

Monitoring organoid components *in vitro*

The aforementioned bioengineering approaches offer means to control multiple cues to guide organoid development. It is also necessary to monitor components in the organoid systems, such as cell-cell/matrix interactions, intrinsic genetic information, local nutrient transport, and oxygen levels. Sensors and detectors could be embedded in *in vitro* set-ups for *in situ* read-out of the influence of cell-mediated signaling. For instance, micromachined silicon substrates could manipulate adherent cells with micrometer-scale precision and study their interactions (Hui & Bhatia, 2007). To measure and manipulate organoid mechanics, multiple methods and tools have been developed. These include 3D traction force microscopy (Legant et al., 2010), elastic soft droplet insert (Campàs et al., 2014), laser ablation (Pérez-González et al., 2021), and fluorescence resonance energy transfer tension sensors (Grashoff et al., 2010). Applying these techniques to organoid systems to probe 3D organoid mechanics have resulted in some successes (Garreta et al., 2021). Moreover, computational frameworks and simulation models can be used to predict and support mechanical measurement of 3D organoid dynamics (Etournay et al., 2016; Latorre et al., 2018). In a recent work, Karzbrun and colleagues modeled the role of mechanical forces in guiding surface wrinkles in human brain organoids trapped in a microfabricated compartment (Karzbrun et al., 2018). There are also other analytical tools that are able to be included in microfabricated platforms for organoid studies, such as micro-electrode arrays (Passaro & Stice, 2021), mass cytometry imaging (Bodenmiller, 2016), and microflourimetry (Yin et al., 2016). Besides these, the recent advances in transcriptomics have offered new opportunities to unravel in-depth organoid genetic information. RNA sequencing of kidney organoids at different time points have revealed transcriptional profiles that indicate early cultured organoids highly matching the fetal gonad (Takasato et al., 2015). Transcriptomic analysis can also serve as guidelines to fine tune 3D extracellular environment for the generation of kidney organoids showing congruence with second-trimester human fetal kidneys (Garreta et al., 2019). Taken all

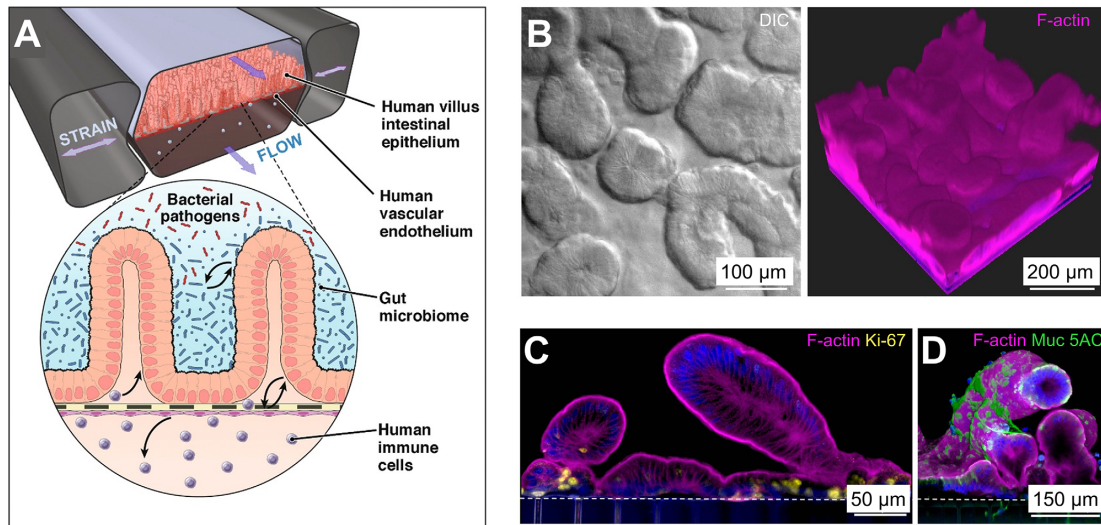


FIGURE 3 Bioengineered gut-on-a-chip. (a) Illustration of the integration of multiple components into a microfluidic chip for primary human intestinal culture by synergistic bioengineering as described by Bein et al. (2018). (b and d) Morphological analysis of human intestinal organoid-derived epithelia lining the flexible membrane in a gut-chip as demonstrated by Kasendra et al. (2018). (b) DIC and fluorescent images showing the primary intestinal epithelial layer. (c and d) Vertical cross-sections demonstrating villus-like protrusion with condensed brush-border (marked by F-actin), proliferative cells (marked by Ki-67 in (c)) at the basal regions, and mucin-producing cells (marked by Muc 5AC in (d)) along the apical region

together, combining multiple analytical tools to organoid systems in spatiotemporal manners would be capable to provide biochemical, tissue mechanical, and genome-wide signatures for different cells within organoids at different developmental stages.

BIOENGINEERED INTEGRATION OF MULTIPLE COMPONENTS FOR ORGANOID ASSEMBLY

The presence of multiple parameters, such as the biochemical and physical properties of the matrix, soluble morphogens, mechanical strains, as well as topographic cues, in organogenesis (Gjorevski et al., 2014) suggests that a systematic integration of these variables is essential to achieve customized, bioengineered in vitro organoid systems. At present, one promising approach in this direction is microfluidic organs-on-a-chip system established through synergistic engineering (Zhang et al., 2018). Such platforms could integrate numerous functional components that offer control over cell culture, shear stress, mechanical strain, spatial confinement, topographic patterns, biochemical gradients, electrical stimulation, and sensors for signal readouts. As such, there is a trend in converging the versatility of organs-on-a-chip systems and organoid-based tissue engineering to bestow artificial guidance to current organoid technologies. To achieve this, these functional modules must

be systematically associated into one chip to tune each factor individually and synchronously without interfering with the autonomous stem cell self-assembly capability.

In a previous example, microfluidic chips for mimicking human intestine, named gut-on-a-chip (Bein et al., 2018; Kasendra et al., 2018; Shin et al., 2019), were produced to provide controllable microenvironment for ISC culture (Figure 3). In such a system, a flexible, porous membrane was connected to two vacuum chambers and separated the cell culture channel into top and bottom parts. The membrane was functionalized with ECM to support cell survival and expansion. Cyclic mechanical strains mimicking peristalsis caused by the extension and retraction of the membrane were transmitted via the deformation of the two hollow side chambers upon suction and biochemical gradient across the porous membrane is generated by perfusing different culture media into the top and bottom culture channels. Additionally, 3D scaffolds that mimic the crypt-villus axis could be mounted on the supportive membrane to provide physical boundaries for the preservation of tissue architectures. Primary intestinal epithelial cells from biopsy-derived organoids were then introduced in the top surface of the membrane, forming a parenchymal channel, whereas microvascular endothelial and immune cells were co-cultured on the opposite side, representing a vascular channel (Bein et al., 2018; Kasendra et al., 2018). Moreover, human intestinal commensal microbiota could be co-cultured in the upper channel, in

contact with living intestinal epithelia and under physiological shear flow (Kim et al., 2016). Hence, microfluidics-based integration offers unparalleled control over individual biochemical, biophysical, mechanical, cellular, and bacterial factors in an artificial intestine model. This can allow researchers to explore molecular, cellular, and tissue mechanisms and gain insights into intestinal physiology and pathology. Besides intestinal model, a biomimetic lung-on-chip model has been developed via similar principles to study multiple lung functions (Huh et al., 2010). Hence, one can also easily incorporate cells from multiple species, that is, human and animal cells, in a same chip, to determine the conserved tissue development and functional mechanisms. The same integration principles are applicable to the establishment of other organ-on-a-chip and cancer-on-a-chip systems (Bhatia & Ingber, 2014). Such platforms should then have important utilities in pharmaceutical screening and disease modeling in that they have potentials to significantly reduce cost and can avoid the ethical issues with animal models. In short, novel organ-on-a-chips offer new capacities to control numerous biochemical and biophysical parameters and to analyze their contributions to human physiology and pathophysiology one-at-a-time.

CONCLUDING REMARKS

In the past decades, we have witnessed numerous breakthroughs in the field of organoid technologies. A series of organ-specific organoids have been developed and the advancements in organoid-based tissue engineering have significantly improved our understandings in organogenesis and therapy strategies. However, the further utility of organoid to reproduce functional organs in vitro is currently hindered by the highly variable, unmaturing differentiated, and poorly organized self-assembly systems. To overcome these challenges inherent in autonomous organoid systems, a few impressive steps toward the convergence of bioengineering approaches and organoid systems have been made. Bioengineered tools derived from microfabrication, genome editing, designer biomaterials, and other advanced microtechnologies have been successfully implemented for the manipulation of cellular microenvironment and stem cells themselves to direct cell-substrate and cell-cell interactions. This rich toolbox has particularly contributed to reveal many morphogenetic rules and the independent effects of physiological environmental parameters that are largely intertwined in vivo in modulating stem cell and organoid development. While it is not without challenges to integrate these tools in an organoid system without tampering with inherent biological qualities and capabilities, we envision that the continuous expansion of this bioengineering library will further empower researchers to develop novel biomimetic organ-on-chips

systems to advance our knowledge in many fundamental biology and to transform regenerative therapies.

ACKNOWLEDGMENTS

We sincerely thank Delphine Delacour for very helpful discussion and suggestions. We thank all members of the cell adhesion and mechanics Lab for their help and support. This work was supported by the Marie Skłodowska-Curie Actions (W.X., Individual Fellowship, Project: 846449), funding from the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under REA grant agreement no. PCOFUND-GA-2013-609102, through the PRESTIGE programme coordinated by Campus France, the University of Paris (J.S. and B.M.), and grants from the Groupama Foundation – Research Prize for Rare Diseases 2017 (W.X. and J.S.), the LabEx “Who Am I?” #ANR-11-LABX-0071 and the Université de Paris IdEx #ANR-18-IDEX-0001 funded by the French Government through its “Investments for the Future” program (W.X. and J.S.), the Human Frontier Science Program (RGP0038/2018) (W.X. and J.S.), and ANR Mecanoadipo (B.M.).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that no competing interests exist.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Jad Saleh, Barbara Mercier, and Wang Xi discussed the content of the review. They also wrote the manuscript. Jad Saleh and Wang Xi made the figures and also reviewed, edited, and revised the manuscript.

REFERENCES

- Abdel Fattah, A. R., Daza, B., Rustandi, G., Berrocal-Rubio, M. Á., Gorissen, B., Poovathingal, S., et al. (2021). Actuation enhances patterning in human neural tube organoids. *Nature Communications*, 12, 3192.
- Astashkina, A., Mann, B., & Grainger, D. W. (2012). A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 134, 82–106.
- Attayek, P. J., Ahmad, A. A., Wang, Y., Williamson, I., Sims, C. E., Magness, S. T., et al. (2016). In vitro polarization of colonoids to create an intestinal stem cell compartment. *PLoS ONE*, 11, e0153795.
- Badyal, S. F. (2004). Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunology*, 12, 367–377.
- Badyal, S., Freytes, D., & Gilbert, T. (2009). Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta Biomaterialia*, 5, 1–13.
- Baker, B. M., Trappmann, B., Wang, W. Y., Sakar, M. S., Kim, I. L., Shenoy, V. B., et al. (2015). Cell-mediated fibre recruitment drives extracellular matrix mechanosensing in engineered fibrillar microenvironments. *Nature Materials*, 14, 1262–1268.
- Barker, N., Huch, M., Kujala, P., Van De Wetering, M., Snippert, H. J., Van Es, J. H., et al. (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.
- Bartfeld, S., Bayram, T., Van De Wetering, M., Huch, M., Begthel, H., Kujala, P., et al. (2015). In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection. *Gastroenterology*, 148, 126–136. e126.

- Bein, A., Shin, W., Jalili-Firoozinezhad, S., Park, M. H., Sontheimer-Phelps, A., Tovaglieri, A., et al. (2018). Microfluidic organ-on-a-chip models of human intestine. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 5, 659–668.
- Bhatia, S. N., & Ingber, D. E. (2014). Microfluidic organs-on-chips. *Nature Biotechnology*, 32, 760–772.
- Blondel, D., & Lutolf, M. P. (2019). Bioinspired hydrogels for 3D organoid culture. *Chimia*, 73, 81–85.
- Bodenmiller, B. (2016). Multiplexed epitope-based tissue imaging for discovery and healthcare applications. *Cell Systems*, 2, 225–238.
- Brandenberg, N., Hoehnel, S., Kuttler, F., Homicsko, K., Ceroni, C., Ringel, T., et al. (2020). High-throughput automated organoid culture via stem-cell aggregation in microcavity arrays. *Nature Biomedical Engineering*, 4, 863–874.
- Brassard, J. A., & Lutolf, M. P. (2019). Engineering stem cell self-organization to build better organoids. *Cell Stem Cell*, 24, 860–876.
- Brassard, J. A., Nikolaev, M., Hübscher, T., Hofer, M., & Lutolf, M. P. (2021). Recapitulating macro-scale tissue self-organization through organoid bioprinting. *Nature Materials*, 20, 22–29.
- BROUTIER, L., MASTROGIOVANNI, G., VERSTEGEN, M. M., FRANCIES, H. E., GAVARRÓ, L. M., BRADSHAW, C. R., et al. (2017). Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nature Medicine*, 23, 1424–1435.
- Campàs, O., Mammoto, T., Hasso, S., Sperling, R. A., O'Connell, D., Bischof, A. G., et al. (2014). Quantifying cell-generated mechanical forces within living embryonic tissues. *Nature Methods*, 11, 183.
- Capeling, M. M., Czerwinski, M., Huang, S., Tsai, Y.-H., Wu, A., Nagy, M. S., et al. (2019). Nonadhesive alginate hydrogels support growth of pluripotent stem cell-derived intestinal organoids. *Stem Cell Reports*, 12, 381–394.
- Cederquist, G. Y., Asciola, J. J., Tchiew, J., Walsh, R. M., Cornacchia, D., Resh, M. D., et al. (2019). Specification of positional identity in forebrain organoids. *Nature Biotechnology*, 37, 436–444.
- Clevers, H. (2016). Modeling development and disease with organoids. *Cell*, 165, 1586–1597.
- Co, J. Y., Margalef-Català, M., Li, X., Mah, A. T., Kuo, C. J., Monack, D. M., et al. (2019). Controlling epithelial polarity: a human enteroid model for host-pathogen interactions. *Cell Reports*, 26, 2509–2520. e2504.
- Coll, M., Perea, L., Boon, R., Leite, S. B., Vallverdú, J., Mannaerts, I., et al. (2018). Generation of hepatic stellate cells from human pluripotent stem cells enables in vitro modeling of liver fibrosis. *Cell Stem Cell*, 23, 101–113. e107.
- Creff, J., Courson, R., Mangeat, T., Foncy, J., Souleille, S., Thibault, C., et al. (2019). Fabrication of 3D scaffolds reproducing intestinal epithelium topography by high-resolution 3D stereolithography. *Biomaterials*, 221, 119404.
- Cruz-Acuña, R., Quirós, M., Farkas, A. E., Dedhia, P. H., Huang, S., Siuda, D., et al. (2017). Synthetic hydrogels for human intestinal organoid generation and colonic wound repair. *Nature Cell Biology*, 19, 1326–1335.
- Czerniecki, S. M., Cruz, N. M., Harder, J. L., Menon, R., Annis, J., Otto, E. A., et al. (2018). High-throughput screening enhances kidney organoid differentiation from human pluripotent stem cells and enables automated multidimensional phenotyping. *Cell Stem Cell*, 22, 929–940. e924.
- Daley, W. P., Peters, S. B., & Larsen, M. (2008). Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of Cell Science*, 121, 255–264.
- Debnath, J., & Brugge, J. S. (2005). Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nature Reviews. Cancer*, 5, 675–688.
- Debnath, J., Muthuswamy, S. K., & Brugge, J. S. (2003a). Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods (San Diego, Calif.)*, 30, 256–268.
- Debnath, J., Walker, S. J., & Brugge, J. S. (2003b). Akt activation disrupts mammary acinar architecture and enhances proliferation in an mTOR-dependent manner. *Journal of Cell Biology*, 163, 315–326.
- Dijkstra, K. K., Cattaneo, C. M., Weeber, F., Chalabi, M., Van De Haar, J., Fanchi, L. F., et al. (2018). Generation of tumor-reactive T cells by co-culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids. *Cell*, 174, 1586–1598. e1512.
- Drost, J., Van Jaarsveld, R. H., Ponsioen, B., Zimmerlin, C., Van Boxtel, R., Buijs, A., et al. (2015). Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature*, 521, 43–47.
- Dye, B. R., Hill, D. R., Ferguson, M. A., Tsai, Y.-H., Nagy, M. S., Dyal, R., et al. (2015). In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *eLife*, 4, e05098.
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., et al. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 472, 51–56.
- Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yone-mura, S., Matsumura, M., et al. (2008). Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell*, 3, 519–532.
- Emerman, J. T., & Pitelka, D. R. (1977). Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In vitro*, 13, 316–328.
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126, 677–689.
- Etournay, R., Merkel, M., Popović, M., Brandl, H., Dye, N. A., Aigouy, B., et al. (2016). TissueMiner: a multiscale analysis toolkit to quantify how cellular processes create tissue dynamics. *eLife*, 5, e14334.
- Fattahi, P., Rahimian, A., Slama, M. Q., Gwon, K., Gonzalez-Suarez, A. M., Wolf, J., et al. (2021). Core-shell hydrogel microcapsules enable formation of human pluripotent stem cell spheroids and their cultivation in a stirred bioreactor. *Scientific Reports*, 11, 7177.
- Fonseca, K. B., Granja, P. L., & Barrias, C. C. (2014). Engineering proteolytically-degradable artificial extracellular matrices. *Progress in Polymer Science*, 39, 2010–2029.
- Fujii, M., Matano, M., Nanki, K., & Sato, T. (2015). Efficient genetic engineering of human intestinal organoids using electroporation. *Nature Protocols*, 10, 1474–1485.
- Fujii, M., & Sato, T. (2021). Somatic cell-derived organoids as prototypes of human epithelial tissues and diseases. *Nature Materials*, 20, 156–169.
- Garreta, E., Kamm, R. D., Chuva De Sousa Lopes, S. M., Lancaster, M. A., Weiss, R., Treppe, X., et al. (2021). Rethinking organoid technology through bioengineering. *Nature Materials*, 20, 145–155.
- Garreta, E., Prado, P., Tarantino, C., Oria, R., Fanlo, L., Martí, E., et al. (2019). Fine tuning the extracellular environment accelerates the derivation of kidney organoids from human pluripotent stem cells. *Nature Materials*, 18, 397–405.
- Gartner, Z. J., & Bertozzi, C. R. (2009). Programmed assembly of 3-dimensional microtissues with defined cellular connectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 4606–4610.
- Gilbert, T. W., Stolz, D. B., Biancaniello, F., Simmons-Byrd, A., & Bady-lak, S. F. (2005). Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 26, 1431–1435.
- Gjorevski, N., Ranga, A., & Lutolf, M. P. (2014). Bioengineering approaches to guide stem cell-based organogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 141, 1794–1804.
- Gjorevski, N., Sachs, N., Manfrin, A., Giger, S., Bragina, M. E., Ordóñez-Morán, P., et al. (2016). Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature*, 539, 560–564.
- Gobaa, S., Hoehnel, S., Roccio, M., Negro, A., Kobel, S., & Lutolf, M. P. (2011). Artificial niche microarrays for probing single stem cell fate in high throughput. *Nature Methods*, 8, 949–955.
- Grashoff, C., Hoffman, B. D., Brenner, M. D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M. T., et al. (2010). Measuring mechanical tension across

- vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*, 466, 263–266.
- Grassi, L., Alfonsi, R., Francescangeli, F., Signore, M., De Angelis, M. L., Addario, A., et al. (2019). Organoids as a new model for improving regenerative medicine and cancer personalized therapy in renal diseases. *Cell Death & Disease*, 10, 201.
- Güven, S., Chen, P., Inci, F., Tasoglu, S., Erkmen, B., & Demirci, U. (2015). Multiscale assembly for tissue engineering and regenerative medicine. *Trends in Biotechnology*, 33, 269–279.
- Guvendiren, M., & Burdick, J. A. (2012). Stiffening hydrogels to probe short- and long-term cellular responses to dynamic mechanics. *Nature Communications*, 3, 792.
- Guye, P., Ebrahimkhani, M. R., Kipniss, N., Velazquez, J. J., Schoenfeld, E., Kiani, S., et al. (2016). Genetically engineering self-organization of human pluripotent stem cells into a liver bud-like tissue using Gata6. *Nature Communications*, 7, 10243.
- Horiguchi, I., & Sakai, Y. (2015). Alginate encapsulation of pluripotent stem cells using a co-axial nozzle. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 101, e52835.
- Huang, G., Li, F., Zhao, X., Ma, Y., Li, Y., Lin, M., et al. (2017). Functional and biomimetic materials for engineering of the three-dimensional cell microenvironment. *Chemical Reviews*, 117, 12764–12850.
- Huch, M., Bonfanti, P., Boj, S. F., Sato, T., Loomans, C. J. M., Van De Wetering, M., et al. (2013). Unlimited in vitro expansion of adult bipotent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *The EMBO Journal*, 32, 2708–2721.
- Hughes, C. S., Postovit, L. M., & Lajoie, G. A. (2010). Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*, 10, 1886–1890.
- Huh, D., Matthews, B. D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H. Y., & Ingber, D. E. (2010). Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 328, 1662–1668.
- Hui, E. E., & Bhatia, S. N. (2007). Micromechanical control of cell–cell interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 5722–5726.
- Hushka, E. A., Yavitt, F. M., Brown, T. E., Dempsey, P. J., & Anseth, K. S. (2020). Relaxation of extracellular matrix forces directs crypt formation and architecture in intestinal organoids. *Advanced Healthcare Materials*, 9, 1901214.
- Hussey, G. S., Cramer, M. C., & Badyal, S. F. (2017). Extracellular matrix bioscaffolds for building gastrointestinal tissue. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 5, 1–13.
- Jabs, J., Zickgraf, F. M., Park, J., Wagner, S., Jiang, X., Jechow, K., et al. (2017). Screening drug effects in patient-derived cancer cells links organoid responses to genome alterations. *Molecular Systems Biology*, 13, 955.
- Kang, H.-W., Atala, A., & Yoo, J. J. (2015). *Essentials of 3D biofabrication and translation*. In: Atala, A., & Yoo, J. J. (Eds.). Winston-Salem, NC, USA: Academic Press, pp. 179–186.
- Kartha, W. R., Iaquinata, P. J., Drost, J., Gracanin, A., Van Boxtel, R., Wongvipat, J., et al. (2014). Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell*, 159, 163–175.
- Karzbrun, E., Kshirsagar, A., Cohen, S. R., Hanna, J. H., & Reiner, O. (2018). Human brain organoids on a chip reveal the physics of folding. *Nature Physics*, 14, 515–522.
- Kasendra, M., Tovaglieri, A., Sontheimer-Phelps, A., Jalili-Firoozinezhad, S., Bein, A., Chalkiadaki, A., et al. (2018). Development of a primary human small intestine-on-a-chip using biopsy-derived organoids. *Scientific Reports*, 8, 2871.
- Kim, H. J., Li, H., Collins, J. J., & Ingber, D. E. (2016). Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 113, E7-E15.
- Kloxin, A. M., Kasko, A. M., Salinas, C. N., & Anseth, K. S. (2009). Photodegradable hydrogels for dynamic tuning of physical and chemical properties. *Science*, 324, 59–63.
- Koo, B.-K., Stange, D. E., Sato, T., Karthaus, W., Farin, H. F., Huch, M., et al. (2012). Controlled gene expression in primary Lgr5 organoid cultures. *Nature Methods*, 9, 81–83.
- Kuhlman, W., Taniguchi, I., Griffith, L. G., & Mayes, A. M. (2007). Interplay between PEO tether length and ligand spacing governs cell spreading on RGD-modified PMMA-g-PEO comb copolymers. *Biomacromolecules*, 8, 3206–3213.
- Lancaster, M. A., Corsini, N. S., Wolfinger, S., Gustafson, E. H., Phillips, A. W., Burkard, T. R., et al. (2017). Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids. *Nature Biotechnology*, 35, 659–666.
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 345, 1247125.
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurler, M. E., et al. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501, 373–379.
- Latorre, E., Kale, S., Casares, L., Gómez-González, M., Uroz, M., Valon, L., et al. (2018). Active superelasticity in three-dimensional epithelia of controlled shape. *Nature*, 563, 203–208.
- Legant, W. R., Miller, J. S., Blakely, B. L., Cohen, D. M., Genin, G. M., & Chen, C. S. (2010). Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices. *Nature Methods*, 7, 969–971.
- Lei, Y., & Schaffer, D. V. (2013). A fully defined and scalable 3D culture system for human pluripotent stem cell expansion and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, E5039–E5048.
- Li, M., & Izpisua Belmonte, J. C. (2019). Organoids — preclinical models of human disease. *New England Journal of Medicine*, 380, 569–579.
- Lu, Y., Aimetti, A. A., Langer, R., & Gu, Z. (2016). Bioresponsive materials. *Nature Reviews Materials*, 2, 16075.
- Marx, V. (2014). Cell-line authentication demystified. *Nature Methods*, 11, 483–488.
- Matano, M., Date, S., Shimokawa, M., Takano, A., Fujii, M., Ohta, Y., et al. (2015). Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature Medicine*, 21, 256–262.
- Mccracken, K. W., Catá, E. M., Crawford, C. M., Sinagoga, K. L., Schumacher, M., Rockich, B. E., et al. (2014). Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature*, 516, 400–404.
- Mckee, C., & Chaudhry, G. R. (2017). Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 159, 62–77.
- Mcmurray, R. J., Gadegaard, N., Tsimbouri, P. M., Burgess, K. V., McNamara, L. E., Tare, R., et al. (2011). Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. *Nature Materials*, 10, 637–644.
- Murphy, S. V., & Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32, 773–785.
- Murphy, W. L., Mcdevitt, T. C., & Engler, A. J. (2014). Materials as stem cell regulators. *Nature Materials*, 13, 547–557.
- Muthuswamy, S. K., Li, D., Lelievre, S., Bissell, M. J., & Brugge, J. S. (2001). ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nature Cell Biology*, 3, 785–792.
- Nelson, C. M., Vanduijn, M. M., Inman, J. L., Fletcher, D. A., & Bissell, M. J. (2006). Tissue geometry determines sites of mammary branching morphogenesis in organotypic cultures. *Science*, 314, 298–300.
- Noguchi, T.-A. K., Ninomiya, N., Sekine, M., Komazaki, S., Wang, P.-C., Asashima, M., et al. (2015). Generation of stomach tissue from mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, 17, 984–993.
- O'brien, P. J., Luo, W., Rogozhnikov, D., Chen, J., & Yousaf, M. N. (2015). Spheroid and tissue assembly via click chemistry in microfluidic flow. *Bioconjugate Chemistry*, 26, 1939–1949.
- Okamoto, R., Shimizu, H., Suzuki, K., Kawamoto, A., Takahashi, J., Kawai, M., et al. (2020). Organoid-based regenerative medicine for inflammatory bowel disease. *Regenerative Therapy*, 13, 1–6.

- Ondeck, M. G., Kumar, A., Placone, J. K., Plunkett, C. M., Matte, B. F., Wong, K. C., et al. (2019). Dynamically stiffened matrix promotes malignant transformation of mammary epithelial cells via collective mechanical signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116, 3502–3507.
- Passaro, A. P., & Stice, S. L. (2021). Electrophysiological analysis of brain organoids: current approaches and advancements. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 622137.
- Pérez-González, C., Ceada, G., Greco, F., Matejčić, M., Gómez-González, M., Castro, N., et al. (2021). Mechanical compartmentalization of the intestinal organoid enables crypt folding and collective cell migration. *Nature Cell Biology*, 23, 745–757.
- Petersen, O. W., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A. R., & Bissell, M. J. (1992). Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 9064–9068.
- Phelps, E. A., Landázuri, N., Thulé, P. M., Taylor, W. R., & García, A. J. (2010). Bioartificial matrices for therapeutic vascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 3323–3328.
- Poling, H. M., Wu, D., Brown, N., Baker, M., Hausfeld, T. A., Huynh, N., et al. (2018). Mechanically induced development and maturation of human intestinal organoids in vivo. *Nature Biomedical Engineering*, 2, 429–442.
- Raeber, G. P., Lutolf, M. P., & Hubbell, J. A. (2005). Molecularly engineered PEG hydrogels: a novel model system for proteolytically mediated cell migration. *Biophysical Journal*, 89, 1374–1388.
- Ranga, A., Gobaa, S., Okawa, Y., Mosiewicz, K., Negro, A., & Lutolf, M. P. (2014). 3D niche microarrays for systems-level analyses of cell fate. *Nature Communications*, 5, 4324.
- Rosales, A. M., & Anseth, K. S. (2016). The design of reversible hydrogels to capture extracellular matrix dynamics. *Nature Reviews Materials*, 1, 15012.
- Roskelley, C. D., & Bissell, M. J. (2002). The dominance of the microenvironment in breast and ovarian cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 12, 97–104.
- Salomon, J., Gaston, C., Magescas, J., Duvauchelle, B., Canioni, D., Sengmanivong, L., et al. (2017). Contractile forces at tricellular contacts modulate epithelial organization and monolayer integrity. *Nature Communications*, 8, 13998.
- Sasai, Y. (2013). Cytosystems dynamics in self-organization of tissue architecture. *Nature*, 493, 318–326.
- Sato, T., & Clevers, H. (2013). Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science*, 340, 1190–1194.
- Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G. J., Van Es, J. H., Van Den Brink, S., et al. (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, 141, 1762–1772.
- Sato, T., Van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., Van Den Born, M., et al. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, 469, 415–418.
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., Van De Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459, 262–265.
- Schwank, G., & Clevers, H. (2016). CRISPR/Cas9-mediated genome editing of mouse small intestinal organoids. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1422, 3–11.
- Schwank, G., Koo, B.-K., Sasselli, V., Dekkers, J. F., Heo, I., Demircan, T., et al. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*, 13, 653–658.
- Schweinlin, M., Wilhelm, S., Schwedhelm, I., Hansmann, J., Rietscher, R., Jurovich, C., et al. (2016). Development of an advanced primary human in vitro model of the small intestine. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 22, 873–883.
- Shanks, N., Greek, R., & Greek, J. (2009). Are animal models predictive for humans? *Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine*, 4, 2.
- Shin, H.-S., Hong, H. J., Koh, W.-G., & Lim, J.-Y. (2018). Organotypic 3D culture in nanoscaffold microwells supports salivary gland stem-cell-based organization. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4, 4311–4320.
- Shin, W., Hinojosa, C. D., Ingber, D. E., & Kim, H. J. (2019). Human intestinal morphogenesis controlled by transepithelial morphogen gradient and flow-dependent physical cues in a microengineered gut-on-a-chip. *iScience*, 15, 391–406.
- Song, J. J., & Ott, H. C. (2011). Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends in Molecular Medicine*, 17, 424–432.
- Spence, J. R., Mayhew, C. N., Rankin, S. A., Kuhar, M. F., Vallance, J. E., Tolle, K., et al. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, 470, 105–109.
- Stephan, M. T., & Irvine, D. J. (2011). Enhancing cell therapies from the outside in: cell surface engineering using synthetic nanomaterials. *Nano Today*, 6, 309–325.
- Strale, P.-O., Azioune, A., Bugnicourt, G., Lecomte, Y., Chahid, M., & Studer, V. (2016). Multiprotein printing by light-induced molecular adsorption. *Advanced Materials*, 28, 2024–2029.
- Suga, H., Kadoshima, T., Minaguchi, M., Ohgushi, M., Soen, M., Nakano, T., et al. (2011). Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture. *Nature*, 480, 57–62.
- Swioklo, S., Ding, P., Pacey, A. W., & Connon, C. J. (2017). Process parameters for the high-scale production of alginate-encapsulated stem cells for storage and distribution throughout the cell therapy supply chain. *Process Biochemistry*, 59, 289–296.
- Taguchi, A., Kaku, Y., Ohmori, T., Sharmin, S., Ogawa, M., Sasaki, H., et al. (2014). Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 14, 53–67.
- Taguchi, A., & Nishinakamura, R. (2017). Higher-order kidney organogenesis from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 21, 730–746. e736.
- Takasato, M., Er, P. X., Becroft, M., Vanslambrouck, J. M., Stanley, E. G., Elefanti, A. G., et al. (2014). Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney. *Nature Cell Biology*, 16, 118–126.
- Takasato, M., Er, P. X., Chiu, H. S., Maier, B., Baillie, G. J., Ferguson, C., et al. (2015). Kidney organoids from human iPSC cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*, 526, 564–568.
- Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., et al. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 499, 481–484.
- Todhunter, M. E., Jee, N. Y., Hughes, A. J., Coyle, M. C., Cerchiari, A., Farlow, J., et al. (2015). Programmed synthesis of three-dimensional tissues. *Nature Methods*, 12, 975–981.
- Tong, Z., Martyn, K., Yang, A., Yin, X., Mead, B. E., Joshi, N., et al. (2018). Towards a defined ECM and small molecule based monolayer culture system for the expansion of mouse and human intestinal stem cells. *Biomaterials*, 154, 60–73.
- Velazquez, J. J., Su, E., Cahan, P., & Ebrahimkhani, M. R. (2018). Programming morphogenesis through systems and synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 36, 415–429.
- Wang, F., Weaver, V. M., Petersen, O. W., Larabell, C. A., Dedhar, S., Briand, P., et al. (1998). Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 14821–14826.
- Wang, Y., Gunasekara, D. B., Reed, M. I., Disalvo, M., Bultman, S. J., Sims, C. E., et al. (2017). A microengineered collagen scaffold for generating a polarized crypt-villus architecture of human small intestinal epithelium. *Biomaterials*, 128, 44–55.

- Wang, Y., Kim, R., Gunasekara, D. B., Reed, M. I., Disalvo, M., Nguyen, D. L., et al. (2018). Formation of Human colonic crypt array by application of chemical gradients across a shaped epithelial monolayer. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 5, 113–130.
- Wang, Y., Kim, R., Hinman, S. S., Zwarycz, B., Magness, S. T., & Allbritton, N. L. (2018). Bioengineered systems and designer matrices that recapitulate the intestinal stem cell niche. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 5, 440–453. e441.
- Wells, J. M., & Spence, J. R. (2014). How to make an intestine. *Development (Cambridge, England)*, 141, 752–760.
- Wicha, M. S., Liotta, L. A., Vonderhaar, B. K., & Kidwell, W. R. (1980). Effects of inhibition of basement membrane collagen deposition on rat mammary gland development. *Developmental Biology*, 80, 253–266.
- Wimmer, R. A., Leopoldi, A., Aichinger, M., Wick, N., Hantusch, B., Novatchkova, M., et al. (2019). Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy. *Nature*, 565, 505–510.
- Workman, M. J., Mahe, M. M., Trisno, S., Poling, H. M., Watson, C. L., Sundaram, N., et al. (2017). Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nature Medicine*, 23, 49–59.
- Xi, W., Saw, T. B., Delacour, D., Lim, C. T., & Ladoux, B. (2019). Material approaches to active tissue mechanics. *Nature Reviews Materials*, 4, 23–44.
- Xiang, Y., Tanaka, Y., Cakir, B., Patterson, B., Kim, K.-Y., Sun, P., et al. (2019). hESC-derived thalamic organoids form reciprocal projections when fused with cortical organoids. *Cell Stem Cell*, 24, 487–497. e487.
- Xiang, Y., Tanaka, Y., Patterson, B., Kang, Y.-J., Govindaiah, G., Roselaar, N., et al. (2017). Fusion of regionally specified hPSC-derived organoids models human brain development and interneuron migration. *Cell Stem Cell*, 21, 383–398. e387.
- Yakeishi, Y., Mori, M., & Enjoji, M. (1990). Distribution of beta-human chorionic gonadotropin-positive cells in noncancerous gastric mucosa and in malignant gastric tumors. *Cancer*, 66, 695–701.
- Yim, E., Reano, R., Pang, S., Yee, A., Chen, C., & Leong, K. (2005). Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells. *Biomaterials*, 26, 5405–5413.
- Yin, X., Mead, B. E., Safaee, H., Langer, R., Karp, J. M., & Levy, O. (2016). Engineering stem cell organoids. *Cell Stem Cell*, 18, 25–38.
- Yui, S., Azzolin, L., Maimets, M., Pedersen, M. T., Fordham, R. P., Hansen, S. L., et al. (2018). YAP/TAZ-dependent reprogramming of colonic epithelium links ECM remodeling to tissue regeneration. *Cell Stem Cell*, 22, 35–49. e37.
- Zhang, B., Korolj, A., Lai, B. F. L., & Radisic, M. (2018). Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nature Reviews Materials*, 3, 257–278.
- Zhao, W., Loh, W., Droujinine, I. A., Teo, W., Kumar, N., Schafer, S., et al. (2011). Mimicking the inflammatory cell adhesion cascade by nucleic acid aptamer programmed cell-cell interactions. *The FASEB Journal*, 25, 3045–3056.
- Zhou, J., Su, J., Fu, X., Zheng, L., & Yin, Z. (2017). Microfluidic device for primary tumor spheroid isolation. *Experimental Hematology & Oncology*, 6, 22–22.

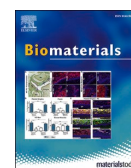
How to cite this article: Saleh, J., Mercier, B., & Xi, W. Bioengineering methods for organoid systems. *Biology of the Cell*. 2021;113:475–491. <https://doi.org/10.1111/boc.202000119>

Annexe C

Article : Modulation of designer biomimetic matrices for optimized differentiated intestinal epithelial cultures

Wang Xi, Jad Saleh, Ayako Yamada, Caterina Tomba, **Barbara Mercier**, Sébastien Janel, Tien Dang, Matis Soleilhac, Aurélie Djemat, Huiqiong Wu, Béatrice Romagnolo, Frank Lafont, Renée-Marc Mège, Yong Chen, Delphine Delacour

Dans ce travail de recherche, j'ai contribué à l'élaboration des gels de PAA pour la culture plane d'organoïdes intestinaux. De plus, certains des échantillons fixés sur gels de PAA de 370 Pa et 5,22 kPa que j'avais réalisés ont été utilisés dans cette étude.



Modulation of designer biomimetic matrices for optimized differentiated intestinal epithelial cultures

Wang Xi^a, Jad Saleh^a, Ayako Yamada^b, Caterina Tomba^c, Barbara Mercier^a, Sébastien Janel^d, Tien Dang^a, Matis Soleilhac^a, Aurélie Djemat^e, Huiqiong Wu^a, Béatrice Romagnolo^f, Frank Lafont^d, René-Marc Mège^a, Yong Chen^b, Delphine Delacour^{a,*}

^a Cell Adhesion and Mechanics Lab, Université de Paris, CNRS, Institut Jacques Monod, F-75006, Paris, France

^b PASTEUR, Département de Chimie, École Normale Supérieure, PSL Université, Sorbonne Université, CNRS, 75005, Paris, France

^c Univ Lyon, CNRS, INSA Lyon, Ecole Centrale de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CPE Lyon, INL, UMR5270, 69622, Villeurbanne, France

^d Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur Lille, U1019 - UMR 9017 - CIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000, Lille, France

^e Animal Core Facility Buffon, Université de Paris, CNRS, Institut Jacques Monod, F-75006, Paris, France

^f Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, 75014, PARIS, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Long-term primary cell cultures
Intestinal organoids
Substrate stiffness
3D scaffold
Tissue engineering
Epithelial differentiation

ABSTRACT

The field of intestinal biology is thirstily searching for different culture methods that complement the limitations of organoids, particularly the lack of a differentiated intestinal compartment. While being recognized as an important milestone for basic and translational biological studies, many primary cultures of intestinal epithelium (IE) rely on empirical trials using hydrogels of various stiffness, whose mechanical impact on epithelial organization remains vague until now. Here, we report the development of hydrogel scaffolds with a range of elasticities and their influence on IE expansion, organization, and differentiation. On stiff substrates (>5 kPa), mouse IE cells adopt a flat cell shape and detach in the short-term. In contrast, on soft substrates (80–500 Pa), they sustain for a long-term, pack into high density, develop columnar shape with improved apical-basal polarity and differentiation marker expression, a phenotype reminiscent of features *in vivo* mouse IE. We then developed a soft gel molding process to produce 3D Matrigel scaffolds of close-to-nature stiffness, which support and maintain a culture of mouse IE into crypt-villus architecture. Thus, the present work is up-to-date informative for the design of biomaterials for *ex vivo* intestinal models, offering self-renewal *in vitro* culture that emulates the mouse IE.

1. Introduction

The intestinal epithelium (IE), which functions as a barrier and constitutes the major site for nutrient uptake and metabolism in the small intestine, is maintained under dynamic equilibrium of cell proliferation, migration, differentiation and cell death [1]. Such a homeostatic process relies on the continuous proliferation/self-renewal of intestinal stem cells (ISCs) [2] that reside at the bottom of the tissue invaginations known as crypts. ISCs generate transit-amplifying cells that, after several rounds of division while migrating along the crypt-villus axis, differentiate mainly in absorptive enterocytes, but also

secretory cells (*i.e.*, tuft, enteroendocrine, goblet, Paneth and M cells). Altogether, these differentiated cells form a cohesive monolayer that lines the projective, finger-like villi. In contrast to the ever-youthful ISCs, the terminally differentiated cells are doomed to die as they reach the tip of the villi where they undergo cell extrusion through the so-called shedding process. Given the implication of these vital biological processes, the study of IE self-renewal and differentiation is highly informative for understanding complex biological phenomena that involve stem cell behavior, epithelial cell sorting, dynamics, organization and homeostasis, as well as pathogen defense and metabolism and thus has attracted significant research interest.

Abbreviations: AFM, atomic force microscopy; AJ, adherens junction; CL, cross-linked; DIOs, dissociated intestinal organoids; DPP-IV, dipeptidyl peptidase-IV; ECM, extracellular matrix; EDC, *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; EM, expansion medium; FA, focal adhesion; IE, intestinal epithelium; ISC, intestinal stem cell; NHS, *N*-hydroxysuccinimide; PAA, polyacrylamide; WNR, Wnt-3A; Noggin, R-spondin.

* Corresponding author.

E-mail address: delphine.delacour@ijm.fr (D. Delacour).

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121380>

Received 3 May 2021; Received in revised form 7 January 2022; Accepted 16 January 2022

Available online 18 January 2022

0142-9612/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Ex vivo intestinal model systems aiming at mimicking *in vivo* tissue structure, dynamics and functions have tremendously contributed to recent advances in stem cell biology, intestinal biology and biomedical studies [3–6]. Animal models are gold standards to analyze organ structures and functions, but they are inconvenient for proper live imaging, costly and criticized for inter-individual variations, animal-human differences, and ethical problems [7]. On the other hand, intestinal cell lines, such as human Caco-2 cells, are much simpler and present numerous advantages but these cells are usually cancer-derived and lack normal physiological regulations, which concerns the maintenance of stemness, proliferation, completeness of differentiation and diversity of intestinal cell lineages [8]. The development of intestinal organoids out of ISCs has significantly advanced gastrointestinal research relevant to cell and developmental biology, physiopathology and translational biology [9]. Intestinal organoids grow either from mouse or human intestinal crypts to produce expandable and physiologically functional structures that mimic many aspects of the *in vivo* intestine organization and functions [4,10,11]. This revolutionary technology has offered an alternative to the animal models for a vast range of *in vitro* studies with accesses to close-to-physiology, live biological materials. However, intestinal organoids also present well-recognized shortcomings, including reduced and flatten “villus-like” domains as well as the closed and hard-to-reach lumen. Such small, irregular differentiated domains are mosaicked amongst the “crypt-like” protrusions and make it difficult for the study of intestinal differentiation. In addition, their culture within a tridimensional (3D) thick mass of matrix/hydrogel, usually Matrigel [4], is a limitation to applying spatially controlled gradients of biochemical and mechanical cues [12]. Hence, there is an increasing interest in culturing ISCs from organoids into epithelial monolayers on extracellular matrix (ECM) coated surfaces for intestinal biology and physiology [13–17]. Such a solution not only provides convenient access to the luminal surface by unfolding the spherical organoids into monolayers but also better controls over the mechanical and biochemical cues to the culture. It also presents the potential for further integration into a series of setups for various applications. For example, for mimicking IE morphogenesis, the substrate can be micro-engineered into a 3D architecture that guides IE into 3D crypt-villus topography [18,19]. Furthermore, when integrated into a Transwell setup, a signaling gradient can be applied to the IE monolayer to mimic the physiological distribution of secreting factors [17,18].

Nevertheless, culturing primary ISCs into renewable IE monolayers is far more difficult than culturing cell lines and requires a deep consideration of intestinal homeostatic regulatory signals. At present, cultures of primary IE on planar substrates are usually short-lived, and overcoming the limited time span is still a daunting challenge for many attempts to build an *ex vivo* intestinal model [20]. It is now known that IE homeostasis is finely regulated by the balance of many biochemical and mechanical signals [21]. For example, the morphogens Wnt, Noggin and Epidermal Growth Factor (EGF), which present decreasing gradients from the crypt towards the villus, are crucial for the maintenance of stem cell niche and promote ISC proliferation [21]. These gradients are caused by the uneven distribution of cells secreting them, such as Paneth cells located in the crypts and expressing Wnt 3 and EGF [21,22]. Besides these important biochemical cues, mechanical cues, such as ECM stiffness that rivals the potency of chemical supplements, could have a substantial influence on epithelial migration, growth, differentiation and organization [23–26]. ECM stiffness is determined by protein composition and network structure. In the gut, the spatial distribution of ECM proteins, including type IV collagen and laminins, is heterogeneous [27], thus leading to variation in ECM rigidity. For instance, the mucosa of the large intestine contains less collagen than the submucosa, indicating a stiffness gradient between these layers [28]. Similar spatiotemporal heterogeneity in ECM proteins distribution is also found in the small intestine [29,30], whereas whether there exists an ECM stiffness variation along the crypt-villus axis is yet to be determined. Changes in ECM stiffness are also associated with illness as shown for instance by

the increased macroscale stiffness associated with high ECM collagen content in the human ileum and colon of inflammatory bowel disease [25].

Recent *in vitro* investigations unraveled that substrate elasticity can dictate stem cell fate *via* regulating focal adhesions, mechano-sensing cascades as well as actomyosin-mediated contractility at cellular and tissue levels [31,32]. Conventional stiff substrates, including glass, polystyrene and polydimethylsiloxane (PDMS), do not support appropriate IE primary culture and only allow the formation of poorly organized monolayers, whereas pure Matrigel could be too soft for the formation/expansion of a spreading monolayer [33]. Alternatively, degradable polyethylene glycol (PEG) hydrogels have been proven to promote ISC proliferation at a stiffness ~ 1.3 kPa while differentiation and organoid formation were favored at a stiffness of around 190 Pa with typical cultures in Matrigel domes [34]. Together, these observations suggest a narrow mechanical window for the self-renewal, organization and differentiation of IE monolayers. Furthermore, in a theoretical framework [35], a morphogenetic alternation from columnar to squamous cell shapes in epithelial sheets could be achieved due to different force balances amongst tensions in cell-substrate adhesion, cell-cell interaction as well as apical actomyosin contractility. Even so, given the importance of substrate stiffness in regulating the cell-substrate adhesion [32], its role in determining differentiated epithelial cell shape and packing has been largely overlooked. Recent successful attempts in culturing IE monolayers include using chemically treated type I collagen substrates [18] and pure Matrigel layers laid on rigid supports [15,17]. However, these substrates are either more than one order of magnitude stiffer than the *in vivo* ECM [18,21] or employed without supportive elasticity measurement. Hence, while understanding cell-ECM interaction at different scales is a key topic in tissue morphogenesis and differentiation, how substrate mechanical properties modulate IE differentiated cell shape and organization remains unknown until now. Moreover, without such knowledge, it is difficult to design and produce designer matrices for biomimetic and tissue engineering applications.

These challenges are currently leveraged by engineering biomaterial composites of multiple pre-defined properties to recapitulate the rich yet heterogeneous biochemical and mechanical properties of the *in vivo* ECM [36]. Single component materials, such as collagens, may allow IE cell adhesion and growth [37], and rough stiffness tunability [18], but often lack other essential biochemical characteristics [20], such as laminin isoforms. Moreover, the lack of multiple niche factors in the matrices may also hinder typical IE compartmentalization, *i.e.*, the formation of large differentiated domains separated from the stem or proliferative compartments [18]. The results obtained with collagen substrates are then incomparable with many other studies using animal-extracted ECM biomaterials. Among them, the Matrigel matrix contains a wealth of diverse ECM proteins and growth factors, and in comparison with substrates of a single collagen component, it shows a higher growth efficiency for digestive tract epithelia [37,38] and allows the development of proliferative and differentiated zones [4,11,15]. Thus, Matrigel has become the gold-standard material for classical 3D intestinal organoid cultures. However, due to its low mechanical stability Matrigel may not be able to support the large expansion of IE monolayers in 2D format [15] and to our best knowledge, there was no attempt to adjust Matrigel elasticity by any means.

In this work, we aimed at creating 2D and 3D biomimetic scaffolds for IE layer growth and its proper differentiation. First, we determined the ECM elasticity of mouse small intestine along the crypt-villus axis. Based on these analyses, we then tested the influence of ECM elasticity variation on organoid monolayer expansion, organization and differentiation by developing Matrigel-based and Matrigel-coated polyacrylamide (PAA) substrates. We revealed that, according to substrate stiffness, 2D IE monolayers expanded with distinct degrees of cell shape and tissue organization, and defined an optimal range of substrate elasticity for IE differentiation. To reproduce biomimetic crypt-villus

micro-architecture of low rigidity, a simple method was further designed to mold soft gels into 3D scaffolds. We demonstrated that using this combined approach, organoid cultures could grow on soft 3D micro-fabricated substrates for several weeks and developed monolayers resembling features of the *in vivo* differentiated IE.

2. Materials and methods

2.1. Materials and chemicals

Matrigel (#734-1100), fetal bovine serum (FBS, #35-010-CV) were purchased from Corning. DMEM medium (31,966-021), Glutamax (35,050-61) are from Gibco. Advanced DMEM/F12 (#12634010), hygromycin (#10687010), penicillin and streptomycin (#15140122), geneticin (#10131027), TEMED (#17919), rabbit anti-laminin alpha-3 (#PA538937) and rabbit anti-laminin alpha-5 (#PA549930) were from ThermoFisher Scientific. The IntestiCult™ Organoid Growth Medium (#06005) was from STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada. Solutions for making PAA gels, 40% acrylamide solution (#161-0140), 2% bis acrylamide solution (#161-0142) and ammonium persulfate (APS, #161-0700) were purchased from Bio-Rad Lab. 3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate (M6514), trimethylchlorosilane (TMCS, #92360), ROCK inhibitor Y-27632 (Y0503), *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) hydrochloride (E1769), sodium deoxycholate (30,970), DNase-I (10,104,159,001), *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) (#130672), mouse anti-collagen-IV antibody (C1926) and rabbit anti-laminin antibody (L9393) were from Sigma-Aldrich. Anti-E-cadherin mouse antibody (#610181) was from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). Mouse anti-villin antibody (M3637) was from Dako. Rabbit polyclonal antibodies directed against DPP-IV (ab187048) and Na-K-ATPase (ab76020) were from Abcam (Cambridge, UK). Rabbit polyclonal antibody directed against OLFM4 (39141 S) was from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Rat anti-occludin was a gift from S. Robine (Institut Curie) [39]. Phalloidin-Alexa 488 (A12379), 568 (A12380) and 647 (A22287), Hoechst 33,342 for nuclear staining (H3570) were from Life Technologies. Mowiol mounting medium was homemade. Vectashield antifade mounting medium (H-1000) was from Vector Laboratories. L-WNR cells (#CRL-3276) were from ATCC.

2.2. Organoid preparation and culture

4-month old wild-type male C57/Bl6 mice were provided by the animal facility of the Institut Jacques Monod. Transgenic LifeAct-GFP mice were a gift from D. Vignjevic (Institut Curie, Paris) [40]. Mice used for intestinal crypt isolation were between 8 and 12 weeks old. After euthanasia by cervical dislocation, the small intestine was harvested, flushed with PBS to discard luminal content and cut longitudinally open. The tissue was then cut into small pieces of 3–5 mm and further washed in PBS. The pieces of intestinal tissue were then incubated on ice for 10 min in a tube containing EDTA (5 mM). The tube was then vortexed for 2 min to release the villi from the tissue. After removal of EDTA, the intestinal pieces were placed in cold PBS and vortexed vigorously for 3 min to ensure crypt release. This process is repeated 3 times, with each fraction recovered. The third and fourth fractions are usually concentrated in crypts, so these are combined and passed through a 70- μ m cell strainer to remove the remaining villi, before being centrifuged at 1000 rpm for 5 min. The pellet (crypts) were then washed in advanced DMEM/F12 and centrifuged again. These isolated crypts were used for enteroid culture as reported previously [41]. Briefly, the final pellet containing crypts is embedded in a 1:1 ratio of basal media and Matrigel, plated as 50 μ L domes in a 24-well plate and incubated at 37 °C for 20–30 min for the Matrigel to polymerize before adding the IntestiCult™ Organoid Growth Medium and the expansion medium (EM). Media was changed every 2 days and after a week the organoids were either sub-cultured or used for seeding on 2D and/or 3D scaffolds.

2.3. Preparation of expansion medium (EM)

The EM, prepared from L-WRN cells [41], was used for the expansion and growth of IE cells in the forms of organoid, 2D monolayers and 3D biomimetic cultures. Briefly, L-WRN cells were cultured with conventional DMEM medium supplemented with FBS (10% v/v), GlutaMAX (2 mM), penicillin and streptomycin (100 unit/mL). After the first day, 500 μ g/mL geneticin and 500 μ g/mL hygromycin were added into the DMEM medium to culture until confluent. The cells were then passaged and cultured with primary culture medium (PCM, advanced DMEM/F12 supplemented with penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 μ g/mL), GlutaMAX (2 mM) and FBS (20% v/v)). The PCM supplemented with Wnt-3A, R-Spondin and Noggin produced by the L-WRN cells was collected every 24 h and mixed with fresh made PCM with a ratio of 1:1 to make EM.

2.4. Preparation of silanized glass coverslips

Silanized glass coverslips were prepared to facilitate the adhesion of polyacrylamide (PAA) hydrogel. Glass coverslips ($\varnothing = 14$ or 18 mm) were cleaned with ethanol under sonication for 5–10 min. They were then dried under airflow and activated by oxygen plasma for 5 min. During the plasma treatment, a mixture of 2% (v/v) 3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate and 1% (v/v) acetic acid in ethanol was prepared. The plasma-treated coverslips were then soaked in this mixture for 30 min. Then they were rinsed thoroughly with ethanol and dried under airflow. The coverslips were then baked at 120 °C for 2 h and stored at room temperature and kept dry for future use.

2.5. Production of 2D substrates

To prepare pure Matrigel 2D substrates, 50 μ L thawed Matrigel was placed on a glass coverslip ($\varnothing = 18$ mm) and spread manually to cover about 90% of the slide at 4 °C. The coverslips were then left on an event bench for 5–10 min to flatten the surface. After that, they were transferred into a 37 °C incubator and incubated for 1 h for gelation.

To produce cross-linked Matrigel (CL-Matrigel) flat substrates, a fresh-made solution of 100 mM NHS and 400 mM EDC in cold PBS (4 °C) was mixed properly with thawed pure Matrigel at a ratio of 1:10 (v/v). A drop of the mixture (50 μ L) was then spread manually on a glass coverslip ($\varnothing = 18$ mm) and flattened in a similar manner as mentioned above or by flat PAA substrates. Subsequently, the coverslips were placed in a 37 °C incubator for 2 h to form CL-Matrigel layers. The CL-Matrigel substrates were washed with PBS once and incubated in PBS at 37 °C for 24 h to remove unreacted EDC and NHS. The substrates were then stored in 1X PBS for future utilization. The recipes to produce CL-Matrigel substrates and their elasticities are presented in Table 1.

To fabricate PAA substrates with Matrigel coating, stock solutions were first prepared according to the recipe in Table 2 and stored at 4 °C. Glass coverslips ($\varnothing = 18$ mm) were properly cleaned with ethanol and treated with oxygen plasma for 5 min 60 μ L diluted Matrigel solution in Advanced DMEM/F12 (1:10, v/v) was placed on the coverslips and incubated overnight at 4 °C. The remaining solution was then discarded by pipetting to have Matrigel-coated coverslips. In the meantime, the PAA stock solutions and PBS were degassed in a vacuum chamber for 15 min. The working solution (Table 2) was quickly prepared and mixed by

Table 1
Matrigel substrates: Composition of the solutions for making Matrigel-based substrates.

	Pure Matrigel	Cross-linked Matrigel
Matrigel [μ L]	500	500
EDC [mM]	N.A.	40
NHS [mM]	N.A.	10
AFM measured elasticity [Pa]	33.3 \pm 1.6	418.8 \pm 15.2

Table 2

PAA substrates: Composition of stock and working solutions for making PAA-hydrogel substrates.

Stock solutions			
40% Acrylamide [mL]	1.25	1.25	3.75
10% Bis-acrylamide [mL]	0.3	0.5	0.75
1 × PBS [mL]	3.45	3.25	0.5
Working Solutions			
Stock solution [μL]	150	150	125
1 × PBS [μL]	347	347	372
TEMED [μL]	0.75	0.75	0.75
10% Ammonium persulfate [μL]	2.5	2.5	2.5
AFM measured elasticity	79.5 ± 3.7 [Pa]	369.2 ± 74.6 [Pa]	5.22 ± 0.64 [kPa]

vortexing for a few seconds, and a 70 μL drop was then placed on a silanized glass coverslip ($\varnothing = 14$ mm, see Section 2.4) and sandwiched by a Matrigel-coated coverslip. The set-up was left in ambient condition for 30 min to allow PAA polymerization before peeling off the Matrigel-coated coverslip from the PAA gel. As-fabricated Matrigel-coated PAA substrates were then soaked in PBS overnight to remove the unreacted chemicals before use.

2.6. Fabrication of 3D scaffolds with CL-Matrigel

2.6.1. Microfabrication of 3D negative master mold

4-inch silicon wafers and 100 μm negative photoresist dry films (Nagase ChemteX, provided by Laboratory of Analysis and Architecture of Systems (LAAS), Toulouse) were used to prepare the 3D master mold of crypt-villus architecture. Firstly, a 100 μm negative photoresist dry film was laminated on a pre-baked 4-inch silicon wafer (200 °C for 10–20 min) by a laminator at 100 °C with a speed of 0.2 m/min. This step was repeated twice more to obtain a 300 μm-thick layer of photoresist. The wafer was then exposed to UV through a chromium photo-mask with 200 μm dark dots by MJB4 mask aligner (SUSS MicroTec) for 40 s at 21.1 mW/cm². A post-exposure bake was carried out at 100 °C for 10 min on a hotplate. After, a second layer of 100 μm-thick negative photoresist dry film was laminated on the wafer as mentioned above. The wafer was exposed to UV with half of the light dose after properly aligning the second mask so that each 200 μm dot was surrounded by six 100 μm transparent circles. A similar post-exposure bake was followed and the exposed layer was developed with cyclohexanone for about 25 min on a shaker until the background surface becomes clean. After being rinsed with ethanol, the negative master mold was then dried and stored in a cool and dry place.

2.6.2. Preparation of PDMS negative mold with rounded up villi and crypts

To avoid sticking PDMS to the master mold, the mold was exposed to the vapor of TMCS for 5 min in a Petri dish before the first use. Freshly mixed PDMS polymer and linker (RTV 615, Momentive Performance Materials, 10:1 w/w) were poured on the mold. The trapped bubbles were removed by degassing in a vacuum chamber and the mixture was allowed to reticulate at 75 °C for at least 4 h. After peeling off, the first PDMS replica has villi and crypts with squared edges. The replica was then gently dipped on a coverslip ($\varnothing = 40$ mm) coated with pre-polymerized PDMS (by spin-coating at 2500 rpm for 60 s). This step transfers small drops of liquid PDMS onto the tips of villi, which formed half-spheres after hanging the structure upside down at room temperature overnight. A further incubation at 75 °C for at least 1 h was followed to fully polymerize the drops. The obtained PDMS mold was plasma treated 1 min by air plasma and exposed to the vapor of TMCS for 1 h in a sealed Petri dish, prior to being used to produce a second negative PDMS replica. After, the above steps were repeated to round up the crypts (spin-coating pre-polymerized PDMS on $\varnothing = 40$ mm coverslip at 3000 rpm for 60 s).

2.6.3. Fabrication of 3D CL-Matrigel scaffolds with villi and crypts

The negative PDMS molds from section 2.6.2 were used to prepare positive PDMS replicas with rounded villi and crypts. To produce 3D CL-Matrigel scaffolds, negative PAA molds were prepared to avoid Matrigel adhesion during molding and gelation. Briefly, after oxygen plasma treatment for 5 min, the positive PDMS mold was covered by a drop of acrylamide/bis-acrylamide working solution (for preparing PAA substrates with an elasticity of 55 kPa [42]). The trapped air bubbles were removed by vacuuming for 5 min and a silanized glass coverslip ($\varnothing = 14$ mm) was then placed on top of the working solution. The whole set-up was then transferred into a humid argon chamber to allow Matrigel polymerization for 1 h. The PDMS replica was then detached from the negative PAA mold that was covalently bound onto the silanized coverslip. The negative PAA mold was soaked in PBS for 48 h to reach swelling stability. A freshly made mixture of pure Matrigel and EDC/NHS (see section 2.5) was then added to the negative PAA mold and degassed under vacuum at 4 °C for 15 min before a sterile glass coverslip ($\varnothing = 14$ mm) was placed on top of the mold. Then the set-up was transferred into a humid chamber and incubated at 37 °C overnight. The formed EDC/NHS CL-Matrigel 3D scaffolds were peeled off from PAA molds and soaked into PBS for 48 h at 37 °C with multiple PBS replacements to eliminate unreacted EDC and NHS. These scaffolds were stored in PBS at 37 °C until use.

2.7. AFM measurement for the elasticity of the intestinal tissue and 2D/3D scaffolds

Mouse jejunum was dissected into 0.2–0.5 cm small pieces and cut longitudinally and transversally to get access to the luminal part of the tissue. Tissue pieces were then rinsed thoroughly with PBS for cleaning prior to atomic force microscopy (AFM) measurements.

To decellularize the intestinal tissue, the tissue pieces were carefully washed with deionized water (resistivity 18.2 MΩ/cm) on a shaker overnight at 4 °C and decellularized by incubation in 4% sodium deoxycholate while shaking for 4 h, and then with 2000 kU DNase-I in 1 M NaCl for 3 h at room temperature [43]. Although the pieces became half-transparent, crypt-villus architecture could still be distinguished under a microscope (see Fig. 1E).

For AFM measurements, the cut native intestinal tissue pieces or decellularized samples were immersed in PBS and mounted to a Petri-dish using a stainless-steel slice anchor (Warner Instruments). AFM measurements were performed by probing the surface of villi or crypts at the periphery of the tissue pieces. Similarly, the elasticity of 2D/3D CL-Matrigel/PAA scaffolds was determined by AFM under PBS.

AFM measurements were performed on a JPK NanoWizard III AFM mounted on a Zeiss Axio Observer. Z1 optical microscope, using pre-calibrated Bruker MLCT-SPH-5UM DC colloidal probes with a tip radius of 5.5 μm and calibrated according to the SNAP method. We recorded 50 μm² arrays of 8 × 8 force curves (force-mapping). Ramp size was set to 8 μm, tip velocity to 2 μm/s, and force threshold from 0.5 nN to 2 nN depending on sample elasticity to get similar indentations. Data were recorded using the JPK 6.3.43 version and analyzed using the corresponding data processing software for Hertz model fitting. Gel elasticities are shown as the mean ± S.E.M for each map (Tables 1 and 2).

2.8. Adaptation for 2D cultures and 3D scaffolds

The intestinal organoids routinely cultured in Matrigel domes were suspended in 3 mL cold Advanced DMEM/F12 and mechanically broken by repeatedly pipetting using 200 μL tips. The broken organoids were suspended in EM (section 2.3) containing 10 μM ROCK inhibitor Y-27632 and directly seeded on 2D culture scaffolds (section 2.5) or 3D scaffolds (section 2.6). These cells were allowed to attach to the scaffolds by incubating at 37 °C for 24 h and the unattached cells were washed off later. For 2D cultures, fresh EM was added to the samples. For 3D

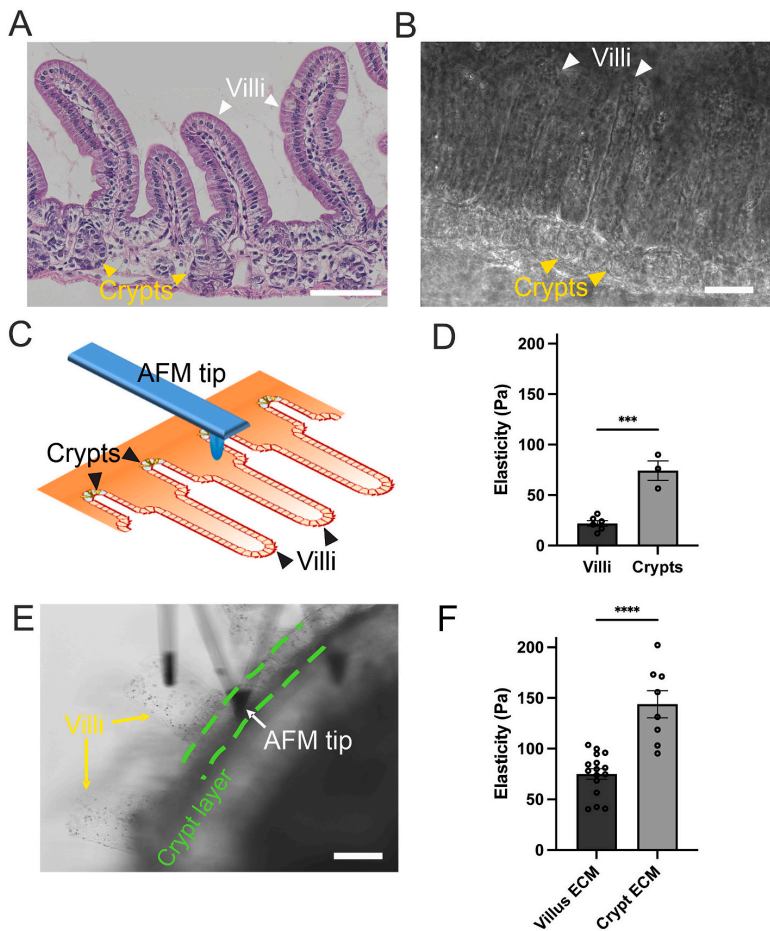


Fig. 1. Stiffness measurement along the crypt-villus axis in mouse small intestine. **A.** Histological image of hematoxylin-eosin stained paraffin section of mouse jejunum. The intestinal epithelium (IE) organizes along the crypt-villus axis. Scale bar, 100 μ m. **B.** Representative phase-contrast image of the crypt-villus axis arrangement in thin sections of fresh decellularized mouse jejunum prepared for AFM measurements. Scale bar, 100 μ m. **C.** Schematic representing the AFM approach to measuring the intestinal tissue/ECM elasticity. Scale bar, 100 μ m. **D.** Statistical analyses of the mouse jejunum IE elasticity at the villi or the crypts. Elasticity (villus) = 22.0 \pm 2.8 Pa, elasticity (crypt) = 74.3 \pm 9.7 Pa (mean \pm S.E. M.). N = 2 mouse jejunum samples, n (measured villus) = 6, n (measured crypt) = 3. Unpaired *t*-test: ****p* < 0.0002. **E.** Representative image of live AFM measurement on a decellularized mouse jejunum sample. Crypt layer is determined by green dotted lines. Scale bar, 100 μ m. **F.** Statistical analyses of the mouse jejunum ECM elasticity at the villi and the crypts. Elasticity (ECM-villus) = 75.1 \pm 5.1 Pa, elasticity (ECM-crypt) = 143.9 \pm 13.3 Pa (mean \pm S.E. M.), n = 3 mouse jejunum samples, n (measured villus) = 16, n (measured crypt) = 8. Unpaired *t*-test: *****p* < 0.0001.

cultures, cells were cultured in EM supplemented with 10 μ M Y-27632 for 12 h after seeding on scaffolds. After Y-27632 removal, cells were maintained in EM, which was renewed every two days. 3D cultures could be maintained for 3–15 weeks (the longest period tested) in these culture conditions.

2.9. Immunostainings, image acquisition and analysis

Cells were fixed using 4% paraformaldehyde for 15 min or cold methanol (-20°C) for 5 min, permeabilized using 0.02% saponin solution in PBS for 20 min, then blocked for 30 min in 0.02% saponin/1% BSA solution in PBS before proceeding to incubation with the primary antibodies diluted in 0.02% saponin/1% BSA solution at 4°C overnight. The secondary antibodies diluted in 0.02% saponin/1% BSA solution were then added after 3 washing steps in PBS and left to incubate for 2 h at RT. Immunostained samples were mounted in either Vectashield or Mowiol mounting media. Image acquisition was performed on a confocal LSM780 microscope (Zeiss, Zen software) or a confocal Leica SP8 microscope (STED 3D, InSerm, IPNP) with $\times 25/0.8\text{NA}$ LD LCI Plan-Apochromat, $\times 40/1.3\text{NA}$ Plan-Apochromat and $\times 63/1.2\text{NA}$ Plan-Apochromat oil/water-immersion objectives. Image analyses were performed using Imaris and Fiji.

EdU pulse was performed for proliferative cell labelling. Briefly, 10 μ M EdU in EM was incubated for 15 min. After removal of EdU

containing medium and PBS wash, cells were fixed in 4% PFA and permeabilized using 0.5% Triton X-100. Then, EdU signal was detected using the Click-iT Alexa Fluor 488 Imaging kit (Thermo Fisher Scientific).

For mouse intestinal tissue analyses, samples were prepared as previously described [44]. Briefly, 1-cm pieces of mouse small intestine were fixed for 2 h in either 4% formaldehyde or by successive 1 h incubations in cold 70%, 90%, or 100% methanol solutions and then stored at -20°C in methanol. The samples were then paraffin-embedded and 5 μ m sections were prepared. Paraffin sections were further de-waxed in a xylene bath, rehydrated in isopropanol and in solutions with decreasing ethanol concentrations, and were processed for histological staining or immunostaining. For histology, 5 mm sections were stained with hematoxylin and eosin as previously described [45]. For immunostaining, de-waxed tissue sections were blocked in 1.5% donkey serum (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) for 1 h. Primary antibody incubations were performed at 4°C overnight and secondary antibody incubations at room temperature for 2 h, both in 1.5% donkey serum solution. Hoechst 33,342 staining (Life Technologies, Paisley, UK) was used to detect nuclei. Tissue sections were mounted in home-made Mowiol 488 solution.

2.10. Statistics

All statistical analyses were performed using Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, version 7.0) and Excel (Microsoft Office). Unless otherwise stated, experiments were replicated 3 times independently.

2.11. Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

3. Results

3.1. Determine tissue and ECM stiffness along the small intestinal crypt-villus axis

Mechanical properties of the small intestine extracellular matrix are largely unexplored. Many measurements were obtained via different techniques and approaches and often reflect the rigidity of the entire intestinal mucosa [25]. For example, mechanical properties of soft tissues are measured by macro-scale testing methods, such as uniaxial tensile testing, which probes a length scale ranging from mm to cm [46]. However, key mechanical sensing events often happen within a length scale of several hundred microns. Thus, the genuine microscale stiffness of IE and its ECM remained to be determined. With an AFM probe, soft tissue can be probed down to nanometer-scale resolution, offering local tissue/ECM characteristics, to which cells respond. Along this line, to test stiffness amplitude along the crypt-villus axis in native tissue, we measured the stiffness of either villus or crypt epithelium on fresh mouse small intestine pieces using the AFM method with a micrometer-sized colloidal probe (Fig. 1A–C). We found that the average villus elasticity is 22.0 ± 2.8 Pa, and the tissue elasticity is 74.3 ± 9.7 Pa in the crypt area (Fig. 1D). Later, we decellularized intestinal tissue pieces as previously described [43] to expose the intestinal ECM. Removal of the columnar epithelial layer by chemical and enzymatic treatments preserved the underlying matrix architecture (Fig. 1B and E), enabling direct ECM elasticity measurements along the crypt-villus axis with an AFM tip (Fig. 1C and E). We found that the elasticity of the intestinal ECM is also low (75.1 ± 5.1 Pa at the villus and 143.9 ± 13.3 Pa at the crypt) (Fig. 1F). Hence, our results showed that the stiffness of mouse IE and its ECM is at least one order of magnitude lower than the values provided by previous measurements carried out on intestinal tissue as a whole [25,47]. In addition, a significant stiffness variation occurs between the crypt and villus compartments *in vivo* (Fig. 1D and F), suggesting a potential role of ECM mechanical properties in guiding ISC proliferation and differentiation. This is further in line with recent studies showing that modulation of matrix rigidity could dictate ISC fate towards stem-cell expansion or organoid formation in 3D intestinal organoid culture [34]. Based on this, we hypothesized that an ideal designer biomaterial for *ex vivo* IE culture should properly match the mechanical properties of intestinal ECM. Such soft substrates may offer a good compromise for optimal enterocytic differentiation while preserving proliferative properties of the tissue.

3.2. Cross-linked matrigel with increased elasticity supports the long-term culture of IE cells

We sought soft matrices close to the intestinal native conditions for *ex vivo* culture of IE cells. Amongst a large number of studies, researchers used Matrigel for routine intestinal organoid cultures, demonstrating the advantages of this natural hydrogel in supporting their development [4, 48]. We first determined the stiffness of Matrigel by AFM measurements and revealed a mean elasticity of 33.3 ± 1.6 Pa (Table 1), which is about 2–5 times softer than the native intestinal ECM (Fig. 1F). Second, we tested if planar, polymerized Matrigel substrates could support the

long-term culture of IE monolayers. Intestinal organoids were mechanically broken and transferred on 2D Matrigel layers on coverslips (Fig. 2A) as dissociated intestinal organoids (DIOs). While cells from organoids were initially attached to the Matrigel substrates, they could not expand to form large planar monolayers but instead grew into confined, multi-layered 3D cell domains (Fig. 2B–D). This is in line with previous reports showing that pure Matrigel could not support proper primary epithelium expansion on flat surfaces, probably in part due to the poor mechanical stability of the hydrogel [17,18,33]. Indeed, large radial Matrigel wrinkles, which might correspond to Matrigel deformation, formed around these cell domains (Fig. 2C, white arrowheads). Hence, upon cell adhesion to the substrate, traction forces generated by the cells and transduced to the adhesive sites may result in deformation on the surface of the soft gel [36], preventing further monolayer spreading. These data suggest that Matrigel does not possess appropriate mechanical stability and/or rigidity for the expansion of IE cells in 2D format. Additionally, it is known that DIOs grown on very rigid substrates such as PDMS of the same surface chemical properties quickly lose their viability and proliferative ability, resulting also in poor surface coverage [33]. Thus, these conventional materials do not allow the long-term culture of 2D IE monolayers.

We then investigated whether Matrigel could be stabilized and stiffened to match the physiological intestine ECM mechanical characteristics by increasing its cross-linking degree. We covalently crosslinked carboxylic-terminuses to amino-terminuses in a Matrigel by mixing it with a solution of EDC and NHS [18] (Fig. 2E). The course of the reactions, based on the carbodiimide crosslinking chemistry, could be slowed down at a low temperature, allowing us to flatten the pre-gelled mixture on a glass substrate before its full gelation (Fig. 2F). Newly formed amide bonds in the gel increased the cross-linking degree inside Matrigel (referred to as cross-linked Matrigel (CL-Matrigel) below) (Fig. 2E) and led to stiffened Matrigel-based hydrogel. Indeed, CL-Matrigel exhibited a 12-folds increase in the elasticity (418.8 ± 15.2 Pa) compared to the pure Matrigel (Table 1). Moreover, Matrigel surface chemistry homogeneity was maintained after the chemical cross-linking. When culturing DIOs on CL-Matrigel substrates, we found that IE domains continuously proliferated and expanded into dense monolayers which could reach a surface area of >4 mm² and nearly 100% coverage in about two weeks (Fig. 2G–I). Such IE monolayers contained large regions populated by differentiated cells such as enterocytes which developed a brush border, as demonstrated by the intense signal of apical actin and the brush border marker, villin (Fig. 2J and K, respectively). These monolayers also maintained proliferative crypt-like domains as reported previously [15] (Fig. 2K). Of note, such CL-Matrigel-based DIO cultures could be maintained as stable monolayers for a long-term (Fig. S1; the longest period tested was 70 days). Moreover, these DIO monolayers could be detached via conventional trypsin treatment in a typical cell passage process and re-seeded into pure Matrigel droplets or onto CL-Matrigel to form again conventional organoids or DIO monolayers, respectively, testifying to their ability of interconversion. Altogether, these data demonstrated that the combined effect of stabilization and stiffening of Matrigel allowed DIO cultures to expand into large, stable and self-renewal planar monolayers, but also promoted the emergence of enterocytic polarization and differentiation domains.

3.3. Substrate stiffness dictates epithelial differentiated characteristics of 2D DIO monolayers

We further tested whether substrate rigidity alone was capable of influencing organization of the differentiated domains in the 2D DIO cultures. For this purpose, we produced synthetic hydrogels with tunable elasticity (Table 2) using PAA. PAA hydrogels have been used as cell culture substrates due to their univariate elasticity, with the possibility to cover a large range from 0.1 to 200 kPa [32] and to be functionalized with biomaterials by surface chemistry approaches, such as

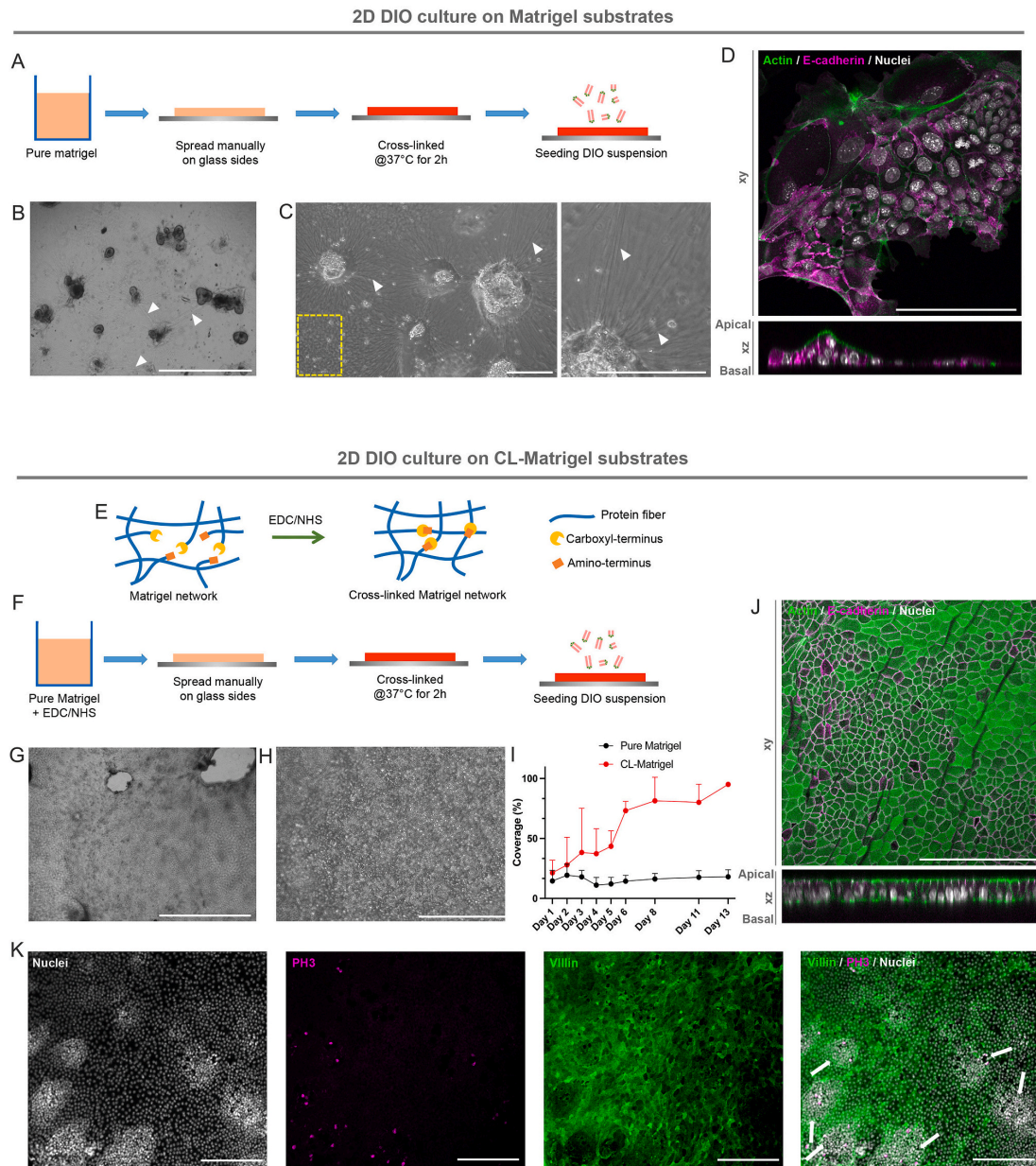


Fig. 2. Long-term culture of dissociated intestinal organoids (DIOs) on 2D Matrigel substrates. **A.** Schematic showing the preparation of Matrigel-layer coated coverslips. Thawed Matrigel was manually smeared on glass-coverslips and cross-linked at 37 °C before cell seeding. **B–C.** Bright-field images of DIOs after 9 days of culture on 2D Matrigel substrates. Yellow dashed box indicates an unmodified region of Matrigel substrate. White arrowheads indicate aligned Matrigel fibers caused by cell contractility. Scale bars, 1000 μm (**B**) and 400 μm (**C**). **D.** Confocal analysis of the distribution of E-cadherin (magenta) and actin (green) in DIOs cultured on 2D Matrigel substrates. Both *xy* (upper panels) and *xz* (lower panels) views are presented. Nuclei are stained with Hoechst 33,342 (gray). Scale bar, 100 μm. **E.** Illustration demonstrates the principle of EDC/NHS induced cross-linking in Matrigel. Cross-linking degree in Matrigel was increased by EDC/NHS treatment that covalently crosslinked carboxylic-terminuses to amino-terminuses. **F.** Schematic shows the procedure for the preparation of cross-linked (CL)-Matrigel substrates. A solution of Matrigel containing EDC and NHS was prepared and manually spread on glass coverslips. This layer was left at 37 °C for 2 h to form CL-Matrigel layer for cell seeding. **G–H.** Bright-field images of DIO culture after 35 days of culture on flat CL-Matrigel substrates. Scale bars, 1000 μm (**G**) and 200 μm (**H**). **I.** Quantitative analysis of the coverage of DIOs cultured on pure or CL-Matrigel as a function of time. Three independent experiments were carried out. Values are mean ± S.E.M. Between 2 and 9 samples were used for each condition. **J.** Confocal analysis of the distribution of E-cadherin (magenta) and actin (green) in DIOs cultured after 9 days on 2D CL-Matrigel substrates. Both *xy* (upper panels) and *xz* (lower panels) views are presented. Nuclei were stained with Hoechst 33,342 (gray). Scale bar, 100 μm. **K.** Confocal analysis of the distribution of villin (green) and phosphor-histone H3 (PH3, magenta) in 2D DIO monolayer cultured after 9 days on CL-Matrigel. White arrows point towards crypt-like areas. Nuclei were stained with Hoechst 33,342 (gray). Scale bars, 100 μm.

N-hydroxysuccinimide ester reaction [49], to promote cell adhesion. Here, based on previous reports [42], we developed solution recipes to adjust the elasticity of PAA hydrogels with the range of the *in vivo* intestinal ECM stiffness (Table 2, Fig. 1F). The PAA gels were then co-polymerized with a thin layer of Matrigel to create a Matrigel coating

on their surface (Fig. 3A, referred to as PAA-Matrigel from now on), thereby allowing stable cell-substrate adhesion.

First, we compared the early progression of tissue expansion according to various substrate rigidities, i.e., 80 and 370 Pa PAA-Matrigel, CL-Matrigel (ca. 420 Pa) and 5.2 kPa PAA-Matrigel. We found that the

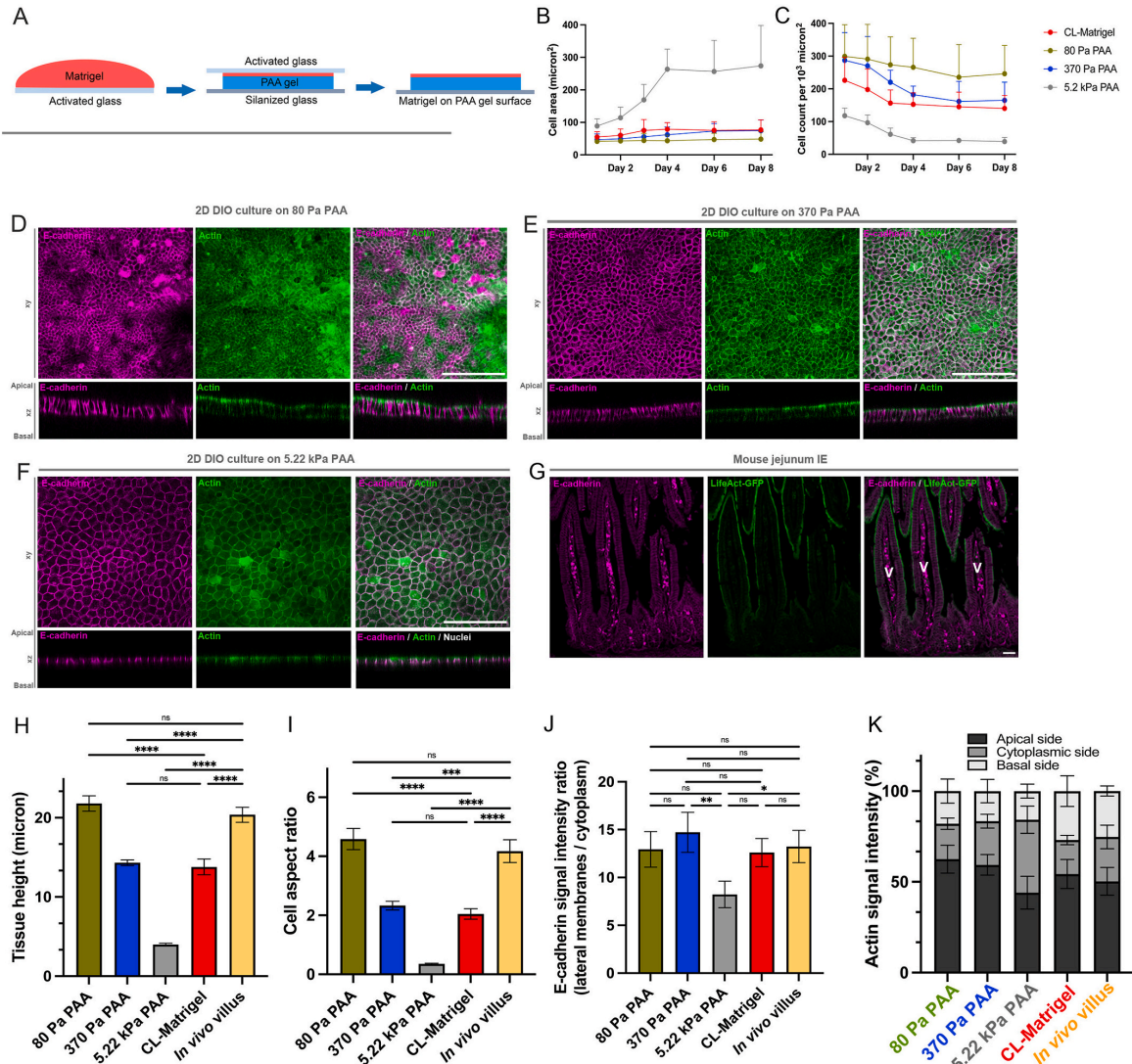


Fig. 3. Culture of DIOs on Matrigel-coated soft hydrogels. **A.** Schematic shows preparation of Matrigel-coated PAA 2D substrates. PAA was polymerized on a Matrigel-coated glass slide (activated glass). After peeling off, a thin Matrigel layer was transferred to the surface of the hydrogel substrate. **B.** Quantification of the variations in cell area on different planar substrates as a function of time. $N = 16$ cells in each time point. Values are mean \pm S.E.M. **C.** Quantification of the variations in cell density on different planar substrates as a function of time. $N = 16$ cells in each time point. Values are mean \pm S.E.M. **D-G.** Confocal analysis of the distribution of E-cadherin (magenta) and actin (green) distribution in DIO cultures on 80 Pa (**D**), 370 Pa (**E**) and 5.22 kPa (**F**) PAA-based substrates, and in mouse jejunum IE (**G**). Both *xy* (upper panels) and *xz* (lower panels) views are presented. Scale bars **D-F**, 100 μ m; **G**, 30 μ m. **H.** Statistical analyses of tissue height on various flat substrates. Mean tissue height (80 Pa PAA) = 21.8 ± 0.97 μ m, (370 Pa PAA) = 14.33 ± 0.35 μ m, (CL-Matrigel) = 13.78 ± 0.99 μ m, (5.22 kPa PAA) = 3.99 ± 0.17 μ m, (*in vivo* villus) = 20.37 ± 0.96 μ m $N = 11$ cells for each condition. One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test, **** $p < 0.0001$. **I.** Statistical analyses of cell aspect ratio (height/width) on various flat substrates. Mean cell aspect ratio (80 Pa PAA) = 4.58 ± 0.36 , (370 Pa PAA) = 2.33 ± 0.15 , (CL-Matrigel) = 2.05 ± 0.18 , (5.22 kPa PAA) = 0.35 ± 0.02 , (*in vivo* villus) = 4.17 ± 0.38 . $N = 11$ cells for each condition. One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test, *** $p = 0.0002$, **** $p < 0.0001$. **J.** Statistical analyses of the E-cadherin intensity ratio between lateral membranes and the cytoplasm. Mean E-cadherin intensity (80 Pa PAA) = 12.94 ± 1.86 , (370 Pa PAA) = 14.71 ± 2.1 , (5.22 kPa PAA) = 8.22 ± 1.38 , (CL-Matrigel) = 12.6 ± 1.47 , (*in vivo* villus) = 13.23 ± 1.69 . $N = 11$ cells for each condition. Two-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test. * $p = 0.0378$; ** $p = 0.0036$. **K.** Quantification of the percentage of actin fluorescence intensity at the apical, cytoplasm or basal side of DIOs cells cultured on various 2D substrates. $N = 11$ cells for each condition. For each analysis, three independent experiments were carried out.

average cell area in differentiated domains continuously expanded until they reached a plateau (Fig. 3B), regardless of the substrate rigidity. During the first 4 days of culture, while the cell area expanded, the tissue density of the monolayers decreased (Fig. 3C), before reaching a plateau and remained relatively stable until day 8. Although this tendency was observed on the substrates of varying mechanical properties, the development of the differentiated domains in DIO monolayers was impacted by the substrate rigidity. Indeed, after 8-days culture, the average cell areas developed on CL-Matrigel and 370 Pa PAA-Matrigel were 1.5-times larger than those on 80 Pa PAA-Matrigel (mean cell

areas: 74–77 μm^2 for 370 Pa PAA-Matrigel and CL-Matrigel versus 49 μm^2 for 80 Pa PAA-Matrigel, respectively). Moreover, in contrast to the soft gels (80, 370 Pa PAA-Matrigel and CL-Matrigel), the stiffest substrate (5.2 kPa PAA-Matrigel) led to large mean cell areas and loosely packed monolayers (mean cell area: 274 μm^2 and mean cell density: 39 cells per 10,000 μm^2 after 8-days culture). These observations were further confirmed by the analysis of monolayer morphology after 9 days of culture. We found that the DIOs on soft PAA hydrogels adopted densely packed monolayers and columnar cell shape (Fig. 3D–E, H–I) similar to those on CL-Matrigel (Figs. 2J, 3H–I) while on the stiffest

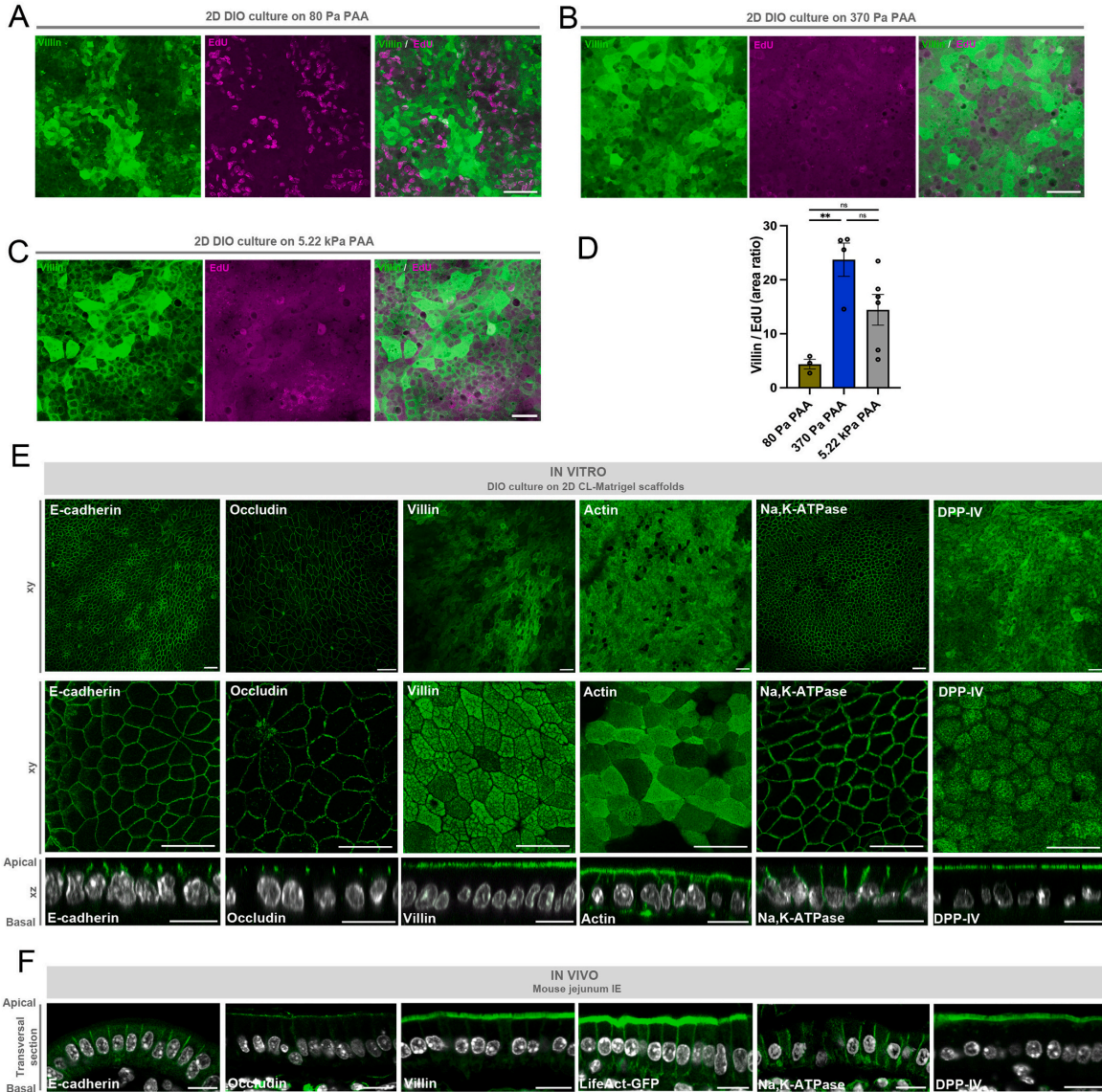


Fig. 4. Enterocytic differentiation in DIOs grown on 2D CL-Matrigel. A–C. Confocal analysis of the distribution of villin (green) and EdU (magenta) distribution in 2D DIO cultures on 80 Pa (A), 370 Pa (B) and 5.22 kPa (C) PAA-based substrates. Scale bars, 30 μm . D. Statistical analysis of the ratio between the surfaces covered by villin-positive cells and by EdU-positive cells. One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test, ns non-significant, **p = 0.0047. N (80 Pa PAA) = 3, n (370 Pa PAA) = 4, n (5.22 kPa PAA) = 6 samples. Three independent experiments were carried out. E–F. Confocal microscopy analysis of the distribution of E-cadherin, occludin, villin, actin, Na⁺,K⁺-ATPase and DPP-IV (green) in 2D DIOs on CL-Matrigel (E) and in transversal sections of mouse jejunum villi (F). In E, both xy (upper panels) and xz (lower panels) views are presented. Nuclei are labelled in gray. Scale bars, 20 μm .

substrate, cells displayed spread and flatten cell shape (Fig. 3F, H-I). In addition, the IE monolayers on CL-Matrigel and 370 Pa PAA-Matrigel resembled closely each other in the cell shape and tissue organization (Figs. 2J and 3E, H-I), indicating that regardless of the nature of the bulky materials, cells regulated tissue architecture mainly according to the substrate stiffness. Interestingly, such hexagonal epithelial cell shapes on the soft gels also resembled those of intestinal villi (Fig. 3G-I), suggesting that the close-to-nature soft substrate favored the development of *in vivo*-like differentiated IE domains.

Immunostainings of key morphologic protein expression further revealed the influence of substrate elasticity on IE properties. Cell cohesiveness was assessed by the localization of E-cadherin, a marker for the *adherens junctions* (AJs). The monolayers on the soft hydrogels showed an optimal lateral distribution of E-cadherin at levels comparable to *in vivo* villi (Figs. 2J, 3D-E, G, J). Moreover, actin signal at cell apical, cytoplasmic and basal portion also demonstrated a similar intensity distribution between the differentiated cells on the soft gels and those on native villi (Figs. 2J and 3G, K). We then sought to determine which stiffness could lead to stable and large differentiated domains in the monolayers. The IE homeostatic state was assessed by villin as a marker of enterocytic differentiation and EdU as a proxy of the proliferative cells (Fig. 4A-C). We found the monolayer on 370 Pa PAA-Matrigel possessed the highest villin/EdU area ratio in comparison with 80 Pa and 5.2 kPa PAA-Matrigel (Fig. 4D). Hence a substrate close to ~400 Pa appeared to be an optimal condition for the development of enterocytic differentiation domains. We noticed that such rigidity was higher than the AFM-determined intestinal ECM rigidity (Fig. 1F). However, protein-protein interactions might be disturbed due to the decellularization process [50]. Moreover, the decellularized ECM lacked modulation by cells and their contractile forces owing to the absence of stromal cells. Thus, such chemical treatment might lead to a weakened ECM with a slightly lower AFM-measured elasticity. To confirm the suitability of CL-Matrigel (~420 Pa) for 2D differentiated IE culture, the differentiation level of DIO monolayers was assessed with the analysis of the expression and distribution of key enterocytic markers (Fig. 4E). In fact, the enterocytic differentiation of 2D DIO monolayers on CL-Matrigel presented a high similarity with villus IE from mouse jejunum (Fig. 4E-F). In both cases, the AJ-associated protein, E-cadherin was concentrated at the upper half of lateral membranes, and occludin, a tight junction component, was found at the upper apical part of cell-cell contacts [51]. Additionally, high density of villin, a brush border marker, was detected exclusively at the apical domain [52,53]. Similarly, actin that is enriched within microvilli as one of the main brush border core proteins was also concentrated at the apical membrane of the cells [52,53]. These suggested that a large number of microvilli covered the differentiated enterocytes on 2D CL-Matrigel as *in vivo* villi. In contrast, the sodium-potassium pump Na^+/K^+ -ATPase was only localized to the lateral membranes [54,55]. Moreover, these large, planar differentiated domains were distinctly marked with dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV), an intestinal hydrolase responsible for peptide digestion, which is expressed by enterocytes [56]. Globally, the localizations of these protein markers in differentiated zones on CL-Matrigel (Fig. 4E) mirrored those in mouse enterocytes (Fig. 4F), demonstrating that the CL-Matrigel exhibits favourable mechanical stability and substrate stiffness towards enterocytic differentiation.

Hence, substrate mechanical properties could dictate the characteristics of 2D IE monolayers. Our data revealed that an appropriate stiffness window (~100–500 Pa) was required for the formation of an *ex vivo* planar IE with high-density packing and elongated columnar cell shape, reminiscent of *in vivo* tissue. PAA-Matrigel and CL-Matrigel with an elasticity closed to 400 Pa offered the optimal conditions for the formation of enterocytic differentiated domains. Although these soft hydrogel substrates were suitable for the long-term culture of planar IE monolayers, they lack the 3D geometric cues for the formation of crypt-villus micro-architectures.

3.4. Fabrication of 3D scaffolds to mimic crypt-villus axis using CL-Matrigel

We then aimed to transpose DIO monolayer cultures in a suitable 3D microenvironment that reproduced the topography and arrangement of the crypt-villus axis in mouse jejunum [57] (Fig. 5A-B). Previously, similar patterns were made by soft-lithography [18] or 3D-printing technology [19]. Nevertheless, crypt-like structures produced by soft-lithography exhibit flat bottoms with sharp edges and rectangular corners, while the method employing stereolithography relied on expensive and sophisticated machines [18,19]. Here, to address these problems, simplify fabrication and improve yield, we developed a two-steps photolithography process. We firstly produced PDMS stamps with pillars and wells of sharp rectangular edges at the tips and the bottoms (Fig. 5C, 1st – 2nd row), respectively. We then rounded up the sharp edges by curing hemispherical drops of PDMS on the tips and the bottoms by two-steps wet-stamping and remolding. In this way, we obtained a negative PDMS mold with a reverse crypt-villus axis (Fig. 5C, last row). Using the negative mold, we produced positive PDMS replicas, which showed a 3D micropattern consisting of pillars (~350 μm in the height and ~175 μm in the diameter) and wells (~150 μm in the depth and ~100 μm in the diameter) (Fig. 5D). These pillars were laid out by close-packing of equal spheres and each was surrounded by six wells (Fig. 5B). With the PDMS replicas, negative PAA master molds (~55 kPa) were then produced.

Molding soft materials into 3D structures with high aspect ratios is currently a challenge in microengineering. Although often used in microfabrication protocols, PAA material could not be used here as a core component of the 3D culture scaffolds. In practice, soft PAA (~100–500 Pa) could not be shaped into stable 3D microstructures of a high aspect ratio. In addition, while 370 Pa PAA substrates could promote enterocytic differentiation on micro-pillars, the former required an extra step to functionalize a thin layer of Matrigel on its surface for cell adhesion. Moreover, this method caused adhesion between the hydrogel and the mold, and thus failed in generating well-defined 3D crypt-villus axis of high aspect ratio (Fig. 5A-B). Hence, we chose to directly polymerize CL-Matrigel on the 55 kPa PAA negative master molds. Due to their protein repellent surface, these PAA master molds allowed the polymerization and easy unmolding of 3D CL-Matrigel scaffolds. To test the substrate elasticity after the molding process, we probed and compared 3D CL-Matrigel scaffold and 2D CL-Matrigel substrate flatten by flat PAA layers using AFM (Figs. S2A-B). Although slightly increased after the molding procedure (Fig. S2B), the elasticity of 3D CL-Matrigel remained very close to the optimal stiffness window for DIO differentiation and was still at least one order of magnitude lower than reported Collagen I [18] and PEG-DA [19] scaffolds.

3.5. Primary cultures of DIO on 3D CL-Matrigel scaffolds mimic *in vivo* intestinal tissue

DIOs were plated on 3D CL-Matrigel scaffolds and cultured in EM medium. The 3D CL-Matrigel scaffolds remained stable in culture (Fig. S3) and supported the adhesion and expansion of DIOs (Fig. 6A). Indeed, after 21 days of culture, pillars and wells mimicking crypts and villi were lined with a regular cell monolayer (Fig. 6A). Notably, in the 3D DIO cultures, the high density of the brush border markers – actin and villin, was concentrated on the pillars (Fig. 6B, D and E, left panels), resembling villi of mouse jejunum (Fig. 6B, D and E, right panels). *In vivo*, villin is highly expressed in differentiated intestinal cells, i.e., enterocytes [53] and its expression already starts at a low level in progenitor cells [58] (Fig. 6B and E, right panels). This uneven distribution of villin in 3D DIO cultures indicates enterocytes preferentially reside on the pillars. To confirm this, we further stained the *in vitro* 3D DIOs and native tissues with DPP-IV (Figs. S4A-B) and found similar DPP-IV distribution. In short, on 3D CL-Matrigel scaffolds both villin and DPP-IV were more enriched on the pillars than in the wells by about

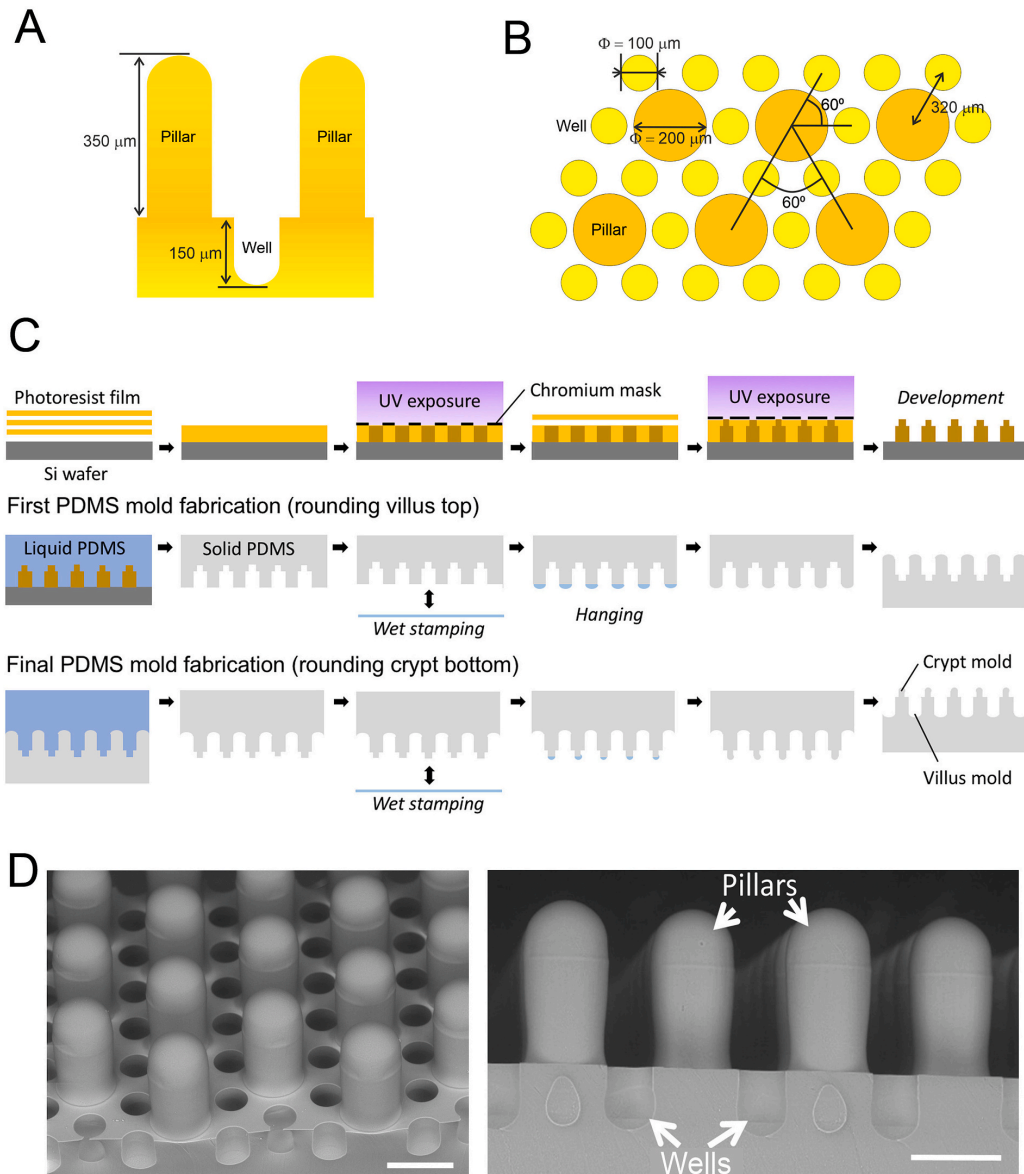
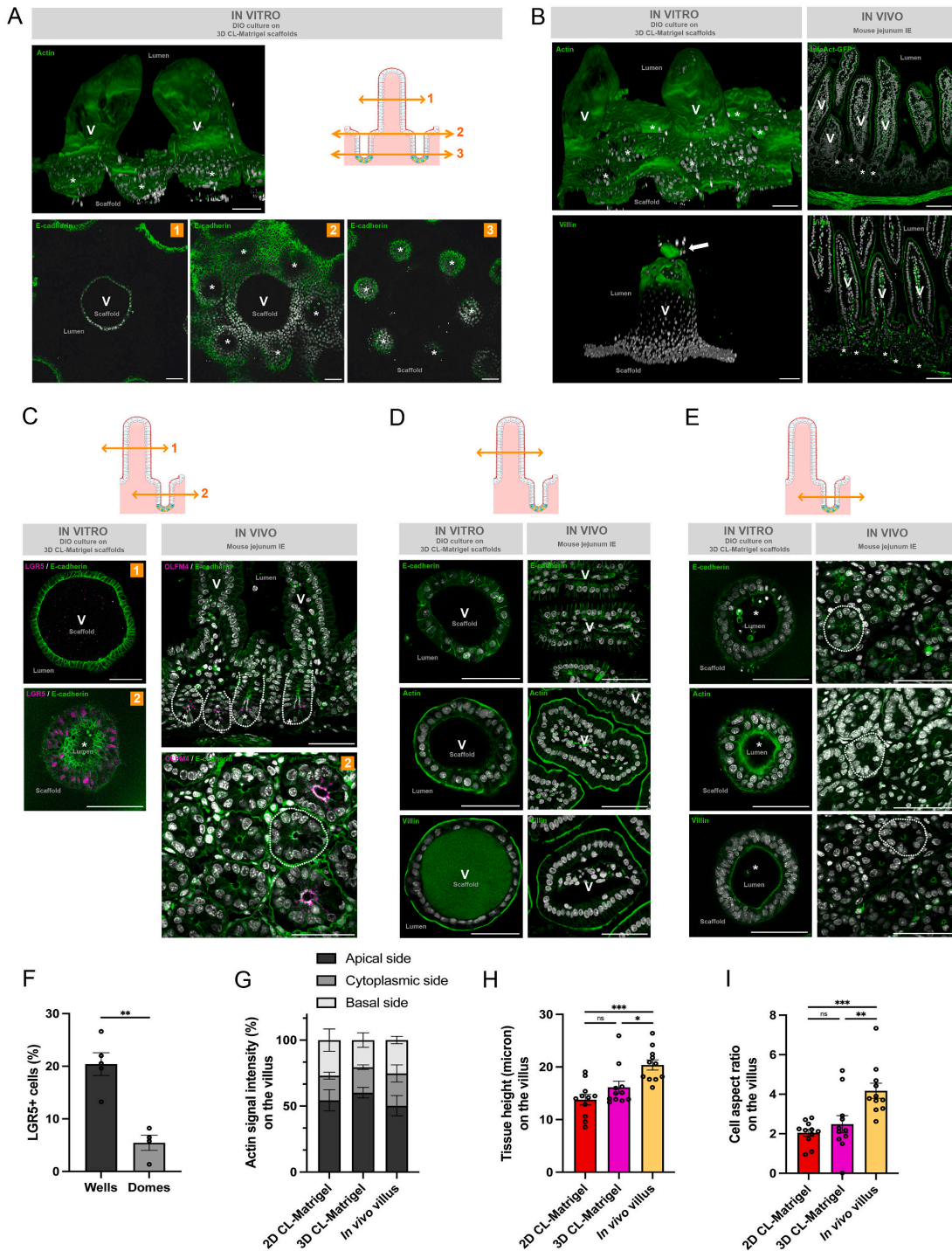


Fig. 5. Fabrication of 3D scaffolds with soft CL-Matrigel to mimic intestinal crypt-villus axis. **A.** Schematic representation of the 3D mimetic scaffold being generated. **B.** Schematic representation of the planar arrangement of pillars and wells in the 3D scaffold being generated. **C.** Schematic of the microfabrication process to produce positive PDMS replica to micromold negative PAA mold. Two-step photolithography was used to produce positive mold in photoresist. This is followed by two molding steps and two wet stamping steps. **D.** SEM images of positive PDMS replicas of the microfabricated 3D crypt-villus axis scaffolds. Scale bars, 200 μm .

1.4–1.6-folds (Fig. S4C), which is comparable to that (1.6–1.7-folds, Fig. S4C) for native tissues. In addition, cells were extruded at the tip of the pillars (white arrow in Fig. 6B, low panel), reproducing epithelial cell shedding that takes place on villi *in vivo* [59,60]. Moreover, ISCs detected with LGR5 marker were found to preferentially localize in the wells (Fig. 6C, left panel and 6 F), reminiscent of mouse crypts labelled with OLFM4 marker (Fig. 6C, right panel). To investigate the compartmentalization of different intestinal cells on the 3D scaffolds, we determined the expression of laminins $\alpha 3$ and $\alpha 5$ subunits in the 3D DIO cultures (Fig. S5A). Laminins $\alpha 3$ and $\alpha 5$ are known to be associated with

the villus compartment [61] and could play a role in the differentiation process [62,63]. We found both laminins $\alpha 3$ and $\alpha 5$ were preferentially expressed at the cell base, adjacent to the scaffolds (Fig. S5A). Moreover, similar to villin and DPP-IV, our staining showed an anisotropic distribution of laminins $\alpha 3$ and $\alpha 5$ on the 3D scaffolds with a higher fluorescent intensity concentrated at the pillars than the wells (Fig. S5B). As Matrigel does not contain these laminins, our results suggested the endogenous contribution of the IE to the differentiated villus compartmentalization. Taking together, these data indicate the self-compartmentalization of the proliferative and differentiated regions



(caption on next page)

Fig. 6. DIOs cultured on CL-Matrigel 3D scaffolds mimic the *in vivo* intestinal tissue. **A. Upper left panel,** confocal microscopy analysis of the DIOs grown on 3D CL-Matrigel scaffolds for 21 days. Cells were labelled for actin (green) and nuclei (gray). After z-stack acquisition, 3D rendering was generated. V, villus-like structures; *, crypt-like structures. **Upper right panel,** schematic representation of the crypt-villus axis. **Lower panels,** confocal analysis of the DIO monolayer at the level of the villus-like structure (1), the transition between villus and crypts (2) and crypt-like structures (3). Scale bars, 50 μm . **B.** Confocal analysis of brush border markers actin (**upper panels**) and villin (**lower panels**) in DIO cultures on 3D CL-Matrigel scaffolds (**left panels**) and in mouse jejunum IE (**right panels**). White arrow, events of cell extrusion. Scale bars, 50 μm . **C. Left panels,** confocal analysis of the stem cell marker LGR5⁺ (magenta) together with E-cadherin (green) at the level of the villus-like (1) or crypt-like (2) structures in DIO cultured on 3D CL-Matrigel scaffolds. **Right panels,** confocal analysis of the stem cell marker OLFM4 (magenta) together with E-cadherin (green) along crypt-villus axis and in crypts (2) in mouse jejunum. White dotted line delimits crypts. Scale bars, 50 μm . **D-E.** Cross-sectional confocal images of E-cadherin, actin and villin at the villi (D) or crypts (E) in DIOs grown on 3D CL-Matrigel scaffolds (**left panels**) or in mouse jejunum (**right panels**). White dotted line delimits crypts. Nuclei are shown in gray. Scale bars, 50 μm . **F.** Statistical analysis of the relative number of Lgr5⁺ cells in the crypt-like or villus-like areas *in vitro*. N = 5 wells, n = 4 domes. Unpaired t-test, **p < 0.01. Two independent experiments were carried out. **G.** Quantification of the percentage of actin fluorescence intensity at the apical, cytoplasm or basal side of cells in different cultures and native tissues. N = 11 cells for each condition. **H.** Statistical analyses of tissue height in various cultures and intestinal tissues. N = 11 cells for each condition. One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test, ns non-significant, *p < 0.05, ***p < 0.001. **I.** Statistical analyses of cell aspect ratio (height/width) in various cultures and native tissues. N = 11 cells for each condition. One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test, ns non-significant, **p < 0.01, ***p < 0.001.

on the CL-Matrigel-based 3D scaffolds resembled *in vivo* intestinal tissue. Of note, we could maintain the 3D DIO cultures for as long as 15 weeks in these culture conditions.

Taking a close look at cross-sections of DIO on the pillars (Fig. 6D) and in the wells (Fig. 6E), we found monolayers lining the scaffolds exhibited features of *in vivo* IE tissue. Cells adopted a columnar cell shape as well as a cohesive organization with physiological apical-basal polarity (Fig. 6D–E, left panels and Fig. 6G). We noted that cell height and aspect ratio on the pillars were higher than that on the planar CL-Matrigel substrates and close to the mouse tissue (Fig. 3H–I; 6H–I). Analysis of actin intensity over the pillar cross-sections revealed a high density of actin at the cell apical domain (Fig. 6D, left panels), similar to its *in vivo* counterpart (Fig. 6D, right panels). The distribution of actin intensity over the cells indicated a highly condensed signal at the brush border (Fig. 6D, left panels, and 6G); this was further confirmed by the enrichment of villin and DPP-IV at the same location (Fig. 6D, left panels and Fig. S4). We attributed these epithelial properties to a higher degree of differentiation and physiological-like tissue organization. The effects of 3D geometric on epithelial organization have been studied previously, and it was proposed that 3D curvature is an additional cue besides rigidity for the arrangement of the epithelial tissue [64]. Cells may strengthen AJs to maintain out-of-plan curved topography and thus, leading to a more compressed monolayer with an elongated cell shape [35]. Taken together, our results demonstrate that the soft CL-Matrigel 3D scaffolds promote IE compartmentalization, differentiation and organization that mimic the *in vivo* tissue.

4. Discussion

Herein, we describe a new method to produce Matrigel-based hydrogels that match the physiological elasticity of intestinal tissue. Compared to 2D layers of small patches on pure Matrigel and short-lived IE layers on stiff PDMS substrates, our CL-Matrigel and soft PAA-Matrigel substrates support the long-term culture of self-renewal, compartmentalized and largely expanded IE in 2D format. We analyzed the importance of substrate elasticity in guiding planar intestinal epithelium growth and organization. Firstly, we measured the elasticity of fresh mouse intestinal tissue and ECM by the AFM method (Fig. 1). Our measurement revealed that the intestinal ECM is one order of magnitude softer than previously reported results that were obtained *via* micro-scale testing methods [30]. The AFM measurement provided local mechanical properties that are likely within the mechano-sensing range of cells. Base on this, we produced hydrogels that varied from 80 Pa to 5.2 kPa and, by testing substrates of various elasticities, we identified a narrow mechanical window (~100–500 Pa) required for the formation of a simple columnar differentiated IE. Such IE mimicked many morphological aspects of intestinal tissue. For example, differentiated cells on the soft gels adopt dense packing of highly columnar cells similar to differentiated intestinal cells in villi. This switch from a flat and spread cell shape on the rigid substrate to columnar one could be

due to changes in force balance among tissue contractility, cell-cell interaction and cell-substrate adhesion [35] that are tuned by the substrate rigidity. One could envisage that rigid substrates facilitate the formation of focal adhesions (FAs) that promote cell adherence and cell spreading, resulting in flattened cells. On the other hand, on very soft hydrogel like pure Matrigel, tissue contractility and tension originating from cell-cell junction may overcome weak cell-substrate adhesion [65, 66], preventing cells from spreading and leading to cell layers folding into 3D configurations. Our experimental observations demonstrated a decreasing trend in tissue height and cell aspect ratio on PAA-Matrigel from 5.22 kPa to 80 Pa (Fig. 3H–I), suggesting that cells were subjected to compression as the substrate stiffness decreased. This could be attributed to the mechanical cross-talk between cell-matrix and cell-cell adhesions since soft surfaces could favor cell compaction through downregulation of FAs [65,66]. However, whether there is a sharp threshold of stiffness for epithelial tissue organization and how epithelial cells control their shapes *via* mechano-sensing pathways remain unknown, and the detailed mechanisms deserve further investigations.

The experimental procedure we developed displays diverse advantages. For instance, Matrigel is widely used in cell biology experiments, notably for the 3D cultures of epithelial cells. This hydrogel of natural origin recapitulates the biochemical signature of the basal lamina of epithelia. Its wealth in diverse ECM proteins and growth factors may promote the self-compartmentalization of IE into proliferative and differentiated domains [4,11,15], whereas DIOs on collagen I substrates comprise predominantly proliferative cells which are randomly embedded among other cells [18]. Hence, in contrast to the simple component substrates, the Matrigel-based 3D substrates we developed do not require a series of switches in culture conditions to achieve large, expanded differentiated zones and localized stem cell compartments. Moreover, increasing the cross-linking degree within Matrigel by chemical method lifted its elasticity close to that of intestinal ECM and significantly improve its mechanical stability for IE expansion. Thus, our approach allows the culture of primary IE using a single type of culture medium for the long-term and permits the connection of short-term mechano-sensing and biochemical responses of cells to long-term tissue development and homeostasis.

3D scaffolds, mimicking villus shape and suitable for established cell line cultures, have previously been produced in our lab [64]. Here we have generated soft hydrogel scaffolds consisting of 3D crypt-villus microarchitecture that matches the physiological dimension of villi and crypts in mouse jejunum [18]. In contrast to previous collagen-based 3D scaffolds, our hydrogel scaffolds were at least 10-times softer and thus very close to the mechanical properties of the natural ECM. Although being soft, the 3D CL-Matrigel scaffold was chemically strengthened in its mechanical stability, which supported 3D DIO culture for more than 3 months without significant deformation. This stability also outperforms a recent cross-linked collagen 3D scaffold whose villi are more than 50% shortened by IE after 14-days of culture [67]. We also demonstrated that IE on our scaffolds was fully polarized,

differentiated, and formed *in vivo*-like cell morphology. Surprisingly, the 3D scaffolds alone were sufficient to compartmentalize the proliferative and differentiated cells for LGR5+ cells were preferentially enriched in the wells (Fig. 6F), whereas the villin-positive brush border was concentrated along the pillars (Fig. 6B, D and Fig. S4C). Such compartmentalization took place without any external signals such as biochemical gradients in ECM deposition as well as a soluble morphogenic factor and directed stiffness variations [21]. This may be attributed to a combined effect of endogenous laminins $\alpha 3$ and $\alpha 5$ expression (Fig. S5), physiological rigidities and 3D crypt-villus geometries in regulating cellular signal in IE self-organization and assembly. Indeed, epithelial organizations are known to be responsive to external geometric cues [68,69]. The mechanism underpinned the influence of topographical cues on intestinal cell sorting thus deserves thorough investigations in the future. The simplicity and stability of our platform further enable high-resolution imaging, broad utility in relevant research, *in vitro* toxicology tests for drug screening and high-throughput pre-clinical trials. To conclude, our experimental approach opens novel routes for the development of an *ex vivo* intestinal model for multiple applications in fundamental and translational biological studies.

Credit author statement

Investigation: W.X., J.S., A.Y., B.M., T.D., M.S., S.J., H.W., and D.D. **Methodology:** W.X., J.S., A.Y., C.T., F.L., Y.C. and D.D. **Resources:** A.D., B.R. **Validation, Formal analysis, Visualization:** W.X., J.S. and D.D. **Writing – Original draft:** W.X., J.S., A.Y., C.T., R.M.M., Y.C. and D.D. **Writing – Review and editing:** W.X. and D.D. **Conceptualization:** W.X. and D.D. **Supervision, Project administration and funding acquisition:** D.D.

Data availability

The data supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We thank Dr. Benoit Ladoux for his helpful discussions. We thank Virginie Bazin and Michael Trichet for technical help in scanning electron microscopy analyses (Electron Microscopy facility, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS)). Confocal microscopy was performed in the ImagoSeine facility (Institut Jacques Monod, IJM), member of the France Bioluminescence infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INSP-04, «Investments for the future»), with the help of Xavier Baudin, Paul Lambert and Nicolas Moisan. We acknowledge the technical platform and animal core facility “Buffon” of the Université de Paris/IJM, especially Isabelle Le Parco, Angélique Dauvin, Ludovic Maingault, Florianne Michel, Laetitia Pontoizeau and Daniel Quintas for animals’ care. This work was supported by grants from PRESTIGE co-financing grant #PRESTIGE-2016-4-0007 (W.X.), Marie Skłodowska-Curie Actions #846449 (W.X.), the “Institut Pierre-Gilles de Gennes” (laboratoire d’excellence, “Investissements d’avenir” program ANR-10-IDEX-0001-02 PSL and ANR-10-LABX-31.) (to A. Y and Y.C.), the Mission for Transversal and Interdisciplinary Initiatives (MiTi, CNRS) – Biomimeticism Challenge 2019 (to A.Y., Y.C. and D.D.), the Groupama Foundation – Research Prize for Rare Diseases 2017 (to D. D.), the LabEx “Who Am I?” #ANR-11-LABX-0071 and the Université de Paris IdEx #ANR-18-IDEX-0001 funded by the French Government through its “Investments for the Future” program (to B.R and D. D), and

the Human Frontier Science Program (RGP0038/2018) (to D. D).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121380>.

References

- [1] H. Gehart, H. Clevers, Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16 (1) (2019) 19–34.
- [2] C. Crosnier, D. Stamatakis, J. Lewis, Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control, *Nat. Rev. Genet.* 7 (5) (2006) 349–359.
- [3] F. Schutgens, H. Clevers, Human organoids: tools for understanding biology and treating diseases, *Annu. Rev. Pathol.* 15 (1) (2020) 211–234.
- [4] T. Sato, R.G. Vries, H.J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D.E. Stange, J. H. van Es, A. Abo, P. Kujala, P.J. Peters, H. Clevers, Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche, *Nature* 459 (7244) (2009) 262–265.
- [5] T. Sato, J.H. van Es, H.J. Snippert, D.E. Stange, R.G. Vries, M. van den Born, N. Barker, N.F. Shroyer, M. van de Wetering, H. Clevers, Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts, *Nature* 469 (7330) (2011) 415–418.
- [6] G. Rossi, A. Manfrin, M.P. Lutolf, Progress and potential in organoid research, *Nat. Rev. Genet.* 19 (11) (2018) 671–687.
- [7] N. Shanks, R. Greek, J. Greek, Are animal models predictive for humans? *Philos. Ethics Humanit. Med.* 4 (1) (2009) 2.
- [8] C.A. Larregieu, L.Z. Benet, Drug discovery and regulatory considerations for improving *in silico* and *in vitro* predictions that use caco-2 as a surrogate for human intestinal permeability measurements, *AAPS J.* 15 (2) (2013) 483–497.
- [9] J.G. In, J. Foulke-Abel, M.K. Estes, N.C. Zachos, O. Kovbasnjuk, M. Donowitz, Human mini-guts: new insights into intestinal physiology and host–pathogen interactions, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13 (11) (2016) 633–642.
- [10] T. Sato, H. Clevers, Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications, *Science* 340 (6137) (2013) 1190–1194.
- [11] J.R. Spence, C.N. Mayhew, S.A. Rankin, M.F. Kuhar, J.E. Vallance, K. Tolle, E. E. Hoskins, V.V. Kalinichenko, S.I. Wells, A.M. Zorn, N.F. Shroyer, J.M. Wells, Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*, *Nature* 470 (7332) (2011) 105–109.
- [12] X. Yin, Benjamin E. Mead, H. Safaei, R. Langer, Jeffrey M. Karp, O. Levy, Engineering stem cell organoids, *Cell Stem Cell* 18 (1) (2016) 25–38.
- [13] Z. Jabaji, C.M. Sears, G.J. Brinkley, N.Y. Lei, V.S. Joshi, J. Wang, M. Lewis, M. Stelzner, M.G. Martin, J.C.Y. Dunn, Use of collagen gel as an alternative extracellular matrix for the *in vitro* and *in vivo* growth of murine small intestinal epithelium, *Tissue Eng. C Methods* 19 (12) (2013) 961–969.
- [14] Y. Liu, Z. Qi, X. Li, Y. Du, Y.-G. Chen, Monolayer culture of intestinal epithelium sustains Lgr5+ intestinal stem cells, *Cell Discovery* 4 (1) (2018) 32.
- [15] C.A. Thorne, L.W. Chen, L.E. Sanman, M.H. Cobb, L.F. Wu, S.J. Altschuler, Enteroid monolayers reveal an autonomous WNT and BMP circuit controlling intestinal epithelial growth and organization, *Dev. Cell* 44 (5) (2018) 624–633, e4.
- [16] C. Moon, K.L. VanDussen, H. Miyoshi, T.S. Stappenbeck, Development of a primary mouse intestinal epithelial cell monolayer culture system to evaluate factors that modulate IgA transcytosis, *Mucosal Immunol.* 7 (4) (2014) 818–828.
- [17] G. Altay, E. Larrañaga, S. Tosi, F.M. Barriga, E. Batlle, V. Fernández-Majada, E. Martínez, Self-organized intestinal epithelial monolayers in crypt and villus-like domains show effective barrier function, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019) 10140.
- [18] Y. Wang, D.B. Gunasekara, M.I. Reed, M. DiSalvo, S.J. Bultman, C.E. Sims, S. T. Magness, N.L. Allbritton, A microengineered collagen scaffold for generating a polarized crypt-villus architecture of human small intestinal epithelium, *Biomaterials* 128 (2017) 44–55.
- [19] J. Creff, R. Courson, T. Mangeat, J. Foncy, S. Souleille, C. Thibault, A. Besson, L. Malaquin, Fabrication of 3D scaffolds reproducing intestinal epithelium topography by high-resolution 3D stereolithography, *Biomaterials* 221 (2019) 119404.
- [20] S.R. Merker, J. Weitz, D.E. Stange, Gastrointestinal organoids: how they gut it out, *Dev. Biol.* 420 (2) (2016) 239–250.
- [21] Y. Wang, R. Kim, S.S. Hinman, B. Zwarycz, S.T. Magness, N.L. Allbritton, Bioengineered systems and designer matrices that recapitulate the intestinal stem cell niche, *CMGH Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 5 (3) (2018) 440–453.e1.
- [22] H.F. Farin, I. Jordens, M.H. Mosa, O. Basak, J. Korving, D.V.F. Tauriello, K. de Punder, S. Angers, P.J. Peters, M.M. Maurice, H. Clevers, Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche, *Nature* 530 (7590) (2016) 340–343.
- [23] D.-Y. Chen, J. Crest, S.J. Streichan, D. Bilder, Extracellular matrix stiffness cues junctional remodeling for 3D tissue elongation, *Nat. Commun.* 10 (1) (2019) 3339.
- [24] E.H. Barriga, K. Franze, G. Charras, R. Mayor, Tissue stiffening coordinates morphogenesis by triggering collective cell migration *in vivo*, *Nature* 554 (2018) 523–527.
- [25] D.C. Stewart, D. Berrie, J. Li, X. Liu, C. Rickerson, D. Mkoji, A. Iqbal, S. Tan, A. L. Doty, S.C. Glover, C.S. Simmons, Quantitative assessment of intestinal stiffness and associations with fibrosis in human inflammatory bowel disease, *PLoS One* 13 (7) (2018), e0200377.
- [26] G. Latella, F. Rieder, Intestinal fibrosis: ready to be reversed, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 33 (4) (2017) 239–245.

- [27] M. Kedinger, J.-N. Freund, J.-F. Launay, P. Simon-Assmann, Cell interactions through the basement membrane in intestinal development and differentiation, in: I.R. Sanderson, W.A. Walker (Eds.), *Development of the Gastrointestinal Tract*, PMPH-USA, 2000, pp. 83–102.
- [28] D.P. Sokolis, S.G. Sassani, Microstructure-based constitutive modeling for the large intestine validated by histological observations, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 21 (2013) 149–166.
- [29] I. Leivo, T. Tani, L. Laitinen, R. Bruns, E. Kivilaakso, V.P. Lehto, R.E. Burgeson, I. Virtanen, Anchoring complex components laminin-5 and type VII collagen in intestine: association with migrating and differentiating enterocytes, *J. Histochem. Cytochem.* 44 (11) (1996) 1267–1277.
- [30] S.N. Steinway, J. Saleh, B.-K. Koo, D. Delacour, D.-H. Kim, Human microphysiological models of intestinal tissue and gut microbiome, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (725) (2020).
- [31] A.M. Handorf, Y. Zhou, M.A. Halanski, W.J. Li, Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression, *Organogenesis* 11 (1) (2015) 1–15.
- [32] W. Xi, T.B. Saw, D. Delacour, C.T. Lim, B. Ladoux, Material approaches to active tissue mechanics, *Nat. Rev. Mater.* 4 (1) (2019) 23–44.
- [33] Y. Wang, M. DiSalvo, D.B. Gunasekara, J. Dutton, A. Proctor, M.S. Lebbur, I. A. Williamson, J. Speer, R.L. Howard, N.M. Smiddy, S.J. Bultman, C.E. Sims, S. T. Magness, N.L. Allbritton, Self-renewing monolayer of primary colonic or rectal epithelial cells, CMGH cell, *Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 4 (1) (2017) 165–182, e7.
- [34] N. Gjorevski, N. Sachs, A. Manfrin, S. Giger, M.E. Bragina, P. Ordóñez-Morán, H. Clevers, M.P. Lutolf, Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture, *Nature* 539 (2016) 560–564.
- [35] E. Hannezo, J. Prost, J.-F. Joanny, Theory of epithelial sheet morphology in three dimensions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (1) (2014) 27–32.
- [36] L. Li, J. Eyckmans, C.S. Chen, Designer biomaterials for mechanobiology, *Nat. Mater.* 16 (2017) 1164.
- [37] Z. Tong, K. Martyn, A. Yang, X. Yin, B.E. Mead, N. Joshi, N.E. Sherman, R. S. Langer, J.M. Karp, Towards a defined ECM and small molecule based monolayer culture system for the expansion of mouse and human intestinal stem cells, *Biomaterials* 154 (2018) 60–73.
- [38] S. Yui, T. Nakamura, T. Sato, Y. Nemoto, T. Mizutani, X. Zheng, S. Ichinose, T. Nagaishi, R. Okamoto, K. Tsuchiya, H. Clevers, M. Watanabe, Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell, *Nat. Med.* 18 (4) (2012) 618–623.
- [39] M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka, M. Itoh, M. Furuse, J. Inazawa, K. Fujimoto, S. Tsukita, Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution, *Eur. J. Cell Biol.* 73 (3) (1997) 222–231.
- [40] J. Riedl, A.H. Crevenna, K. Kessenbrock, J.H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T.A. Holak, Z. Werb, M. Sixt, R. Wedlich-Soldner, Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin, *Nat. Methods* 5 (7) (2008) 605–607.
- [41] H. Miyoshi, T.S. Stappenbeck, In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture, *Nat. Protoc.* 8 (12) (2013) 2471–2482.
- [42] S.V. Plotnikov, B. Sabass, U.S. Schwarz, C.M. Waterman, Chapter 20 - high-resolution traction force microscopy, in: J.C. Waters, T. Wittman (Eds.), *Methods in Cell Biology*, Academic Press, 2014, pp. 367–394.
- [43] G. Totonelli, P. Maghsoudlou, M. Garriboli, J. Riegler, G. Orlando, A.J. Burns, N. J. Sebire, V.V. Smith, J.M. Fishman, M. Ghionzoli, M. Turmaine, M.A. Birchall, A. Atala, S. Soker, M.F. Lythgoe, A. Seifalian, A. Pierro, S. Eaton, P. De Coppi, A rat decellularized small bowel scaffold that preserves villus-crypt architecture for intestinal regeneration, *Biomaterials* 33 (12) (2012) 3401–3410.
- [44] D. Delacour, A. Koch, W. Ackermann, I.E.-L. Parco, H.-P. Elsässer, F. Poirier, R. Jacob, Loss of galectin-3 impairs membrane polarisation of mouse enterocytes in vivo, *J. Cell Sci.* 121 (4) (2008) 458–465.
- [45] J. Magescas, L. Sengmanivong, A. Viau, A. Mayeux, T. Dang, M. Burtin, U. J. Nilsson, H. Leffler, F. Poirier, F. Terzi, D. Delacour, Spindle pole cohesion requires glycosylation-mediated localization of NuMA, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 1474.
- [46] R. Akhtar, M.J. Sherratt, J.K. Cruickshank, B. Derby, Characterizing the elastic properties of tissues, *Mater. Today* 14 (3) (2011) 96–105.
- [47] L.A. Johnson, E.S. Rodansky, K.L. Sauder, J.C. Horowitz, J.D. Mih, D. J. Tschumperlin, P.D. Higgins, Matrix stiffness corresponding to strictured bowel induces a fibrogenic response in human colonic fibroblasts, *Inflamm. Bowel Dis.* 19 (5) (2013) 891–903.
- [48] T. Sato, H. Clevers, Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications, *Science* 340 (6137) (2013) 1190–1194.
- [49] R.J. Pelham, Y.-I. Wang, Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (25) (1997) 13661–13665.
- [50] J.W. Goding, 10 - analysis of antigens recognized by monoclonal antibodies, in: J. W. Goding (Ed.), *Monoclonal Antibodies*, third ed., Academic Press, London, 1996, pp. 234–326.
- [51] B. Lee, K.M. Moon, C.Y. Kim, Tight junction in the intestinal epithelium: its association with diseases and regulation by phytochemicals, *J. Immunol. Res.* 2018 (2018) 2645465.
- [52] D. Louvard, The function of the major cytoskeletal components of the brush border, *Curr. Opin. Cell Biol.* 1 (1) (1989) 51–57.
- [53] D. Delacour, J. Salomon, S. Robine, D. Louvard, Plasticity of the brush border — the yin and yang of intestinal homeostasis, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13 (3) (2016) 161–174.
- [54] J.H. Kaplan, Biochemistry of Na,K-ATPase, *Annu. Rev. Biochem.* 71 (2002) 511–535.
- [55] M.A. Rocafull, L.E. Thomas, J.R. del Castillo, The second sodium pump: from the function to the gene, *Pflueg. Arch. Eur. J. Physiol.* 463 (6) (2012) 755–777.
- [56] J.P. Gorvel, A. Ferrero, L. Chambraud, A. Rigal, J. Bonicel, S. Maroux, Expression of sucrose-isomaltase and dipeptidylpeptidase IV in human small intestine and colon, *Gastroenterology* 101 (3) (1991) 618–625.
- [57] M. Bjerknes, H. Cheng, Methods for the isolation of intact epithelium from the mouse intestine, *Anat. Rec.* 199 (4) (1981) 565–574.
- [58] F. El Marjou, K.-P. Janssen, B. Hung-Junn Chang, M. Li, V. Hindie, L. Chan, D. Louvard, P. Chambon, D. Metzger, S. Robine, Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium, *Genesis* 39 (3) (2004) 186–193.
- [59] T.F. Bullen, S. Forrest, F. Campbell, A.R. Dodson, M.J. Hershman, D.M. Pritchard, J.R. Turner, M.H. Montrose, A.J.M. Watson, Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine, *Lab. Invest.* 86 (10) (2006) 1052–1063.
- [60] J.M. Williams, C.A. Duckworth, M.D. Burkitt, A.J. Watson, B.J. Campbell, D. M. Pritchard, Epithelial cell shedding and barrier function: a matter of life and death at the small intestinal villus tip, *Vet. Pathol.* 52 (3) (2015) 445–455.
- [61] M. Antfolk, K.B. Jensen, A bioengineering perspective on modelling the intestinal epithelial physiology in vitro, *Nat. Commun.* 11 (1) (2020) 6244.
- [62] I.C. Teller, J. Auclair, E. Herring, R. Gauthier, D. Ménard, J.-F. Beaulieu, Laminins in the developing and adult human small intestine: relation with the functional absorptive unit, *Dev. Dynam.* 236 (7) (2007) 1980–1990.
- [63] I.C. Teller, J.F. Beaulieu, Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease, *Exp. Rev. Mol. Med.* 3 (24) (2001) 1–18.
- [64] J. Salomon, C. Gaston, J. Magescas, B. Duvauchelle, D. Canioni, L. Sengmanivong, A. Mayeux, M. G. C. F. L. J. V. J. P. F. M. N. S. J. B. N. L. B. G. O. D. Delacour, Contractile forces at tricellular contacts modulate epithelial organization and monolayer integrity, *Nat. Commun.* 8 (2017) 13998.
- [65] W.H. Guo, M.T. Frey, N.A. Burnham, Y.L. Wang, Substrate rigidity regulates the formation and maintenance of tissues, *Biophys. J.* 90 (6) (2006) 2213–2220.
- [66] H.E. Balcioglu, L. Balasubramanian, T.V. Stirbat, B.L. Doss, M.-A. Fardin, R.-M. Mège, B. Ladoux, A subtle relationship between substrate stiffness and collective migration of cell clusters, *Soft Matter* 16 (7) (2020) 1825–1839.
- [67] M. Verhulsel, A. Simon, M. Bernheim-Dennery, V.R. Gannavarapu, L. Gérémié, D. Ferraro, D. Krndija, L. Talini, J.-L. Viovy, D.M. Vignjevic, S. Descroix, Developing an advanced gut on chip model enabling the study of epithelial cell/fibroblast interactions, *Lab Chip* 21 (2) (2021) 365–377.
- [68] W. Xi, S. Sonam, T.B. Saw, B. Ladoux, C.T. Lim, Emergent patterns of collective cell migration under tubular confinement, *Nat. Commun.* 8 (1) (2017) 1517.
- [69] H.G. Yevick, G. Duclos, I. Bonnet, P. Silberzan, Architecture and migration of an epithelium on a cylindrical wire, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (19) (2015) 5944–5949.

Bibliographie

- [1] Cynthia L. ADAMS et al. “Mechanisms of Epithelial Cell–Cell Adhesion and Cell Compaction Revealed by High-resolution Tracking of E-Cadherin– Green Fluorescent Protein”. en. In : *Journal of Cell Biology* 142.4 (août 1998), p. 1105-1119. ISSN : 0021-9525, 1540-8140. DOI : 10.1083/jcb.142.4.1105. URL : <https://rupress.org/jcb/article/142/4/1105/12568/Mechanisms-of-Epithelial-CellCell-Adhesion-and> (visité le 16/02/2022).
- [2] Gizem ALTAY et al. “Self-organized intestinal epithelial monolayers in crypt and villus-like domains show effective barrier function”. en. In : *Scientific Reports* 9.1 (déc. 2019), p. 10140. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/s41598-019-46497-x. URL : <http://www.nature.com/articles/s41598-019-46497-x> (visité le 18/04/2022).
- [3] Ana ANGULO-URARTE, Tanne van der WAL et Stephan HUVENEERS. “Cell-cell junctions as sensors and transducers of mechanical forces”. en. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1862.9 (sept. 2020), p. 183316. ISSN : 00052736. DOI : 10.1016/j.bbmem.2020.183316. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273620301474> (visité le 17/04/2022).
- [4] Reina AOKI et al. “Foxl1-Expressing Mesenchymal Cells Constitute the Intestinal Stem Cell Niche”. en. In : *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 2.2 (mars 2016), p. 175-188. ISSN : 2352345X. DOI : 10.1016/j.jcmgh.2015.12.004. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352345X15001988> (visité le 18/04/2022).
- [5] M Amin ARNAOUT, Simon L GOODMAN et Jian-Ping XIONG. “Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion”. en. In : *Current Opinion in Cell Biology* 19.5 (oct. 2007), p. 495-507. ISSN : 09550674. DOI : 10.1016/j.ceb.2007.08.002. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067407001196> (visité le 15/02/2022).

- [6] Benoit A. AUCLAIR et al. “Bone Morphogenetic Protein Signaling Is Essential for Terminal Differentiation of the Intestinal Secretory Cell Lineage”. en. In : *Gastroenterology* 133.3 (sept. 2007), p. 887-896. ISSN : 00165085. DOI : 10.1053/j.gastro.2007.06.066. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508507012978> (visité le 18/04/2022).
- [7] Megan AURORA et Jason R. SPENCE. “hPSC-derived lung and intestinal organoids as models of human fetal tissue”. en. In : *Developmental Biology* 420.2 (déc. 2016), p. 230-238. ISSN : 00121606. DOI : 10.1016/j.ydbio.2016.06.006. URL : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160616301889> (visité le 18/02/2022).
- [8] Lakshmi BALASUBRAMANIAM et al. “Investigating the nature of active forces in tissues reveals how contractile cells can form extensile monolayers”. en. In : *Nature Materials* 20.8 (août 2021), p. 1156-1166. ISSN : 1476-1122, 1476-4660. DOI : 10.1038/s41563-021-00919-2. URL : <http://www.nature.com/articles/s41563-021-00919-2> (visité le 05/01/2022).
- [9] Nick BARKER. “Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration”. en. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15.1 (jan. 2014), p. 19-33. ISSN : 1471-0072, 1471-0080. DOI : 10.1038/nrm3721. URL : <http://www.nature.com/articles/nrm3721> (visité le 18/02/2022).
- [10] Nick BARKER et al. “Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*”. en. In : *Nature* 449.7165 (oct. 2007), p. 1003-1007. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature06196. URL : <http://www.nature.com/articles/nature06196> (visité le 25/04/2022).
- [11] Buzz BAUM et Marios GEORGIU. “Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling”. en. In : *Journal of Cell Biology* 192.6 (mars 2011), p. 907-917. ISSN : 1540-8140, 0021-9525. DOI : 10.1083/jcb.201009141. URL : <https://rupress.org/jcb/article/192/6/907/36223/Dynamics-of-adherens-junctions-in-epithelial> (visité le 16/02/2022).
- [12] J. BERKES et al. “Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation”. eng. In : *Gut* 52.3 (mars 2003), p. 439-451. ISSN : 0017-5749. DOI : 10.1136/gut.52.3.439.
- [13] Joep BEUMER et Hans CLEVERS. “How the Gut Feels, Smells, and Talks”. en. In : *Cell* 170.1 (juin 2017), p. 10-11. ISSN : 00928674. DOI : 10.1016/j.cell.2017.06.023. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867417307079> (visité le 18/02/2022).

- [14] Laurent BLANCHOIN et al. “Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility”. en. In : *Physiological Reviews* 94.1 (jan. 2014), p. 235-263. ISSN : 0031-9333, 1522-1210. DOI : 10.1152/physrev.00018.2013. URL : <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00018.2013> (visité le 16/02/2022).
- [15] Vangelis BONIS, Carla ROSSELL et Helmuth GEHART. “The Intestinal Epithelium – Fluid Fate and Rigid Structure From Crypt Bottom to Villus Tip”. In : *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (mai 2021), p. 661931. ISSN : 2296-634X. DOI : 10.3389/fcell.2021.661931. URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.661931/full> (visité le 18/02/2022).
- [16] Julia BRASCH et al. “Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion”. en. In : *Trends in Cell Biology* 22.6 (juin 2012), p. 299-310. ISSN : 09628924. DOI : 10.1016/j.tcb.2012.03.004. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892412000529> (visité le 13/06/2022).
- [17] C. D. BUCKLEY et al. “The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force”. en. In : *Science* 346.6209 (oct. 2014), p. 1254211-1254211. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1254211. URL : <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1254211> (visité le 16/02/2022).
- [18] Tim F BULLEN et al. “Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine”. en. In : *Laboratory Investigation* 86.10 (oct. 2006), p. 1052-1063. ISSN : 0023-6837, 1530-0307. DOI : 10.1038/labinvest.3700464. URL : <http://www.nature.com/articles/3700464> (visité le 18/04/2022).
- [19] Thomas D. CARROLL et al. “Interkinetic nuclear migration and basal tethering facilitates post-mitotic daughter separation in intestinal organoids”. en. In : *Journal of Cell Science* (jan. 2017), jcs.211656. ISSN : 1477-9137, 0021-9533. DOI : 10.1242/jcs.211656. URL : <https://journals.biologists.com/jcs/article/doi/10.1242/jcs.211656/265650/Interkinetic-nuclear-migration-and-basal-tethering> (visité le 17/02/2022).
- [20] Ovijit CHAUDHURI et al. “Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity”. en. In : *Nature Materials* 15.3 (mars 2016), p. 326-334. ISSN : 1476-4660. DOI : 10.1038/nmat4489. URL : <https://www.nature.com/articles/nmat4489> (visité le 14/02/2022).

- [21] Yuemin Celina CHEE et al. “Intrinsic Xenobiotic Resistance of the Intestinal Stem Cell Niche”. en. In : *Developmental Cell* 46.6 (sept. 2018), 681-695.e5. ISSN : 15345807. DOI : 10.1016/j.devcel.2018.07.023. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580718306087> (visité le 18/04/2022).
- [22] Chaithanya CHELAKKOT, Jaewang GHIM et Sung Ho RYU. “Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications”. en. In : *Experimental & Molecular Medicine* 50.8 (août 2018), p. 1-9. ISSN : 1226-3613, 2092-6413. DOI : 10.1038/s12276-018-0126-x. URL : <http://www.nature.com/articles/s12276-018-0126-x> (visité le 17/02/2022).
- [23] Jose C. CLEMENTE et al. “The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View”. en. In : *Cell* 148.6 (mars 2012), p. 1258-1270. ISSN : 00928674. DOI : 10.1016/j.cell.2012.01.035. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867412001043> (visité le 17/02/2022).
- [24] Claudio COLLINET et Thomas LECUIT. “Programmed and self-organized flow of information during morphogenesis”. en. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22.4 (avr. 2021), p. 245-265. ISSN : 1471-0080. DOI : 10.1038/s41580-020-00318-6. URL : <https://www.nature.com/articles/s41580-020-00318-6> (visité le 09/02/2022).
- [25] Scott W. CRAWLEY, Mark S. MOOSEKER et Matthew J. TYSKA. “Shaping the intestinal brush border”. en. In : *Journal of Cell Biology* 207.4 (nov. 2014), p. 441-451. ISSN : 1540-8140, 0021-9525. DOI : 10.1083/jcb.201407015. URL : <https://rupress.org/jcb/article/207/4/441/37925/Shaping-the-intestinal-brush-border> (visité le 16/02/2022).
- [26] Cécile CROSNIER, Despina STAMATAKI et Julian LEWIS. “Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control”. en. In : *Nature Reviews Genetics* 7.5 (mai 2006), p. 349-359. ISSN : 1471-0056, 1471-0064. DOI : 10.1038/nrg1840. URL : <http://www.nature.com/articles/nrg1840> (visité le 17/02/2022).
- [27] Joseph D’ALESSANDRO et al. “Cell migration guided by long-lived spatial memory”. en. In : *Nature Communications* 12.1 (déc. 2021), p. 4118. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/s41467-021-24249-8. URL : <http://www.nature.com/articles/s41467-021-24249-8> (visité le 05/01/2022).

- [28] Joseph D’ALESSANDRO et al. “Contact enhancement of locomotion in spreading cell colonies”. en. In : *Nature Physics* 13.10 (oct. 2017), p. 999-1005. ISSN : 1745-2481. DOI : 10.1038/nphys4180. URL : <https://www.nature.com/articles/nphys4180> (visité le 07/04/2022).
- [29] Shoichi DATE et Toshiro SATO. “Mini-Gut Organoids: Reconstitution of the Stem Cell Niche”. en. In : *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 31.1 (nov. 2015), p. 269-289. ISSN : 1081-0706, 1530-8995. DOI : 10.1146/annurev-cellbio-100814-125218. URL : <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-100814-125218> (visité le 18/02/2022).
- [30] Jeffrey J. DEHMER et al. “Expansion of Intestinal Epithelial Stem Cells during Murine Development”. en. In : *PLoS ONE* 6.11 (nov. 2011). Sous la dir. de Marcello ROTA, e27070. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0027070. URL : <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0027070> (visité le 17/02/2022).
- [31] Elise S. DEMITRACK et Linda C. SAMUELSON. “Notch regulation of gastrointestinal stem cells: Notch regulates GI stem cells”. en. In : *The Journal of Physiology* 594.17 (sept. 2016), p. 4791-4803. ISSN : 00223751. DOI : 10.1113/JP271667. URL : <http://doi.wiley.com/10.1113/JP271667> (visité le 07/06/2022).
- [32] J. M. DIAMOND. “Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence”. eng. In : *The Physiologist* 20.1 (fév. 1977), p. 10-18. ISSN : 0031-9376.
- [33] Kevin DOXZEN et al. “Guidance of collective cell migration by substrate geometry”. en. In : *Integrative Biology* 5.8 (2013), p. 1026. ISSN : 1757-9694, 1757-9708. DOI : 10.1039/c3ib40054a. URL : <https://academic.oup.com/ib/article/5/8/1026-1035/5204204> (visité le 17/04/2022).
- [34] Jarno DROST et al. “Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells”. en. In : *Nature* 521.7550 (mai 2015), p. 43-47. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature14415. URL : <http://www.nature.com/articles/nature14415> (visité le 18/02/2022).
- [35] Jarno DROST et al. “Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer”. en. In : *Science* 358.6360 (oct. 2017), p. 234-238. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : 10.1126/science.aao3130. URL : <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aao3130> (visité le 18/02/2022).

- [36] Sirio DUPONT et al. “Role of YAP/TAZ in mechanotransduction”. en. In : *Nature* 474.7350 (juin 2011), p. 179-183. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature10137. URL : <http://www.nature.com/articles/nature10137> (visité le 20/02/2022).
- [37] Devanjali DUTTA, Inha HEO et Hans CLEVERS. “Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems”. en. In : *Trends in Molecular Medicine* 23.5 (mai 2017), p. 393-410. ISSN : 14714914. DOI : 10.1016/j.molmed.2017.02.007. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491417300278> (visité le 18/02/2022).
- [38] George T. EISENHOFER et al. “Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia”. en. In : *Nature* 484.7395 (avr. 2012), p. 546-549. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature10999. URL : <http://www.nature.com/articles/nature10999> (visité le 18/04/2022).
- [39] Michael EISENSTEIN. “Organoids: the body builders”. en. In : *Nature Methods* 15.1 (jan. 2018), p. 19-22. ISSN : 1548-7091, 1548-7105. DOI : 10.1038/nmeth.4538. URL : <http://www.nature.com/articles/nmeth.4538> (visité le 18/02/2022).
- [40] Alberto ELOSEGUI-ARTOLA et al. “Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores”. en. In : *Cell* 171.6 (nov. 2017), 1397-1410.e14. ISSN : 00928674. DOI : 10.1016/j.cell.2017.10.008. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867417311923> (visité le 20/02/2022).
- [41] Alberto ELOSEGUI-ARTOLA et al. “Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity”. en. In : *Nature Cell Biology* 18.5 (mai 2016), p. 540-548. ISSN : 1476-4679. DOI : 10.1038/ncb3336. URL : <https://www.nature.com/articles/ncb3336> (visité le 15/02/2022).
- [42] W. ENGL et al. “Actin dynamics modulate mechanosensitive immobilization of E-cadherin at adherens junctions”. en. In : *Nature Cell Biology* 16.6 (juin 2014), p. 584-591. ISSN : 1476-4679. DOI : 10.1038/ncb2973. URL : <https://www.nature.com/articles/ncb2973> (visité le 16/02/2022).
- [43] Adam J. ENGLER et al. “Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification”. en. In : *Cell* 126.4 (août 2006), p. 677-689. ISSN : 00928674. DOI : 10.1016/j.cell.2006.06.044. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406009615> (visité le 05/01/2022).

- [44] Rajaraman ERI et Marcello CHIEPPA. “Messages from the Inside. The Dynamic Environment that Favors Intestinal Homeostasis”. In : *Frontiers in Immunology* 4 (2013). ISSN : 1664-3224. DOI : 10.3389/fimmu.2013.00323. URL : <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00323/abstract> (visité le 17/02/2022).
- [45] Dmitry ERSHOV et al. *Bringing TrackMate into the era of machine-learning and deep-learning*. en. preprint. Bioinformatics, sept. 2021. DOI : 10.1101/2021.09.03.458852. URL : <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.09.03.458852> (visité le 21/04/2022).
- [46] Johan H. van ES et al. “A Critical Role for the Wnt Effector Tcf4 in Adult Intestinal Homeostatic Self-Renewal”. en. In : *Molecular and Cellular Biology* 32.10 (mai 2012), p. 1918-1927. ISSN : 0270-7306, 1098-5549. DOI : 10.1128/MCB.06288-11. URL : <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MCB.06288-11> (visité le 18/04/2022).
- [47] Johan H. van ES et al. “Notch/-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells”. en. In : *Nature* 435.7044 (juin 2005), p. 959-963. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature03659. URL : <http://www.nature.com/articles/nature03659> (visité le 18/04/2022).
- [48] Henner F. FARIN, Johan H. VAN ES et Hans CLEVERS. “Redundant Sources of Wnt Regulate Intestinal Stem Cells and Promote Formation of Paneth Cells”. en. In : *Gastroenterology* 143.6 (déc. 2012), 1518-1529.e7. ISSN : 00165085. DOI : 10.1053/j.gastro.2012.08.031. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508512012541> (visité le 18/04/2022).
- [49] Tea FEVR et al. “Wnt/-Catenin Is Essential for Intestinal Homeostasis and Maintenance of Intestinal Stem Cells”. en. In : *Molecular and Cellular Biology* 27.21 (nov. 2007), p. 7551-7559. ISSN : 0270-7306, 1098-5549. DOI : 10.1128/MCB.01034-07. URL : <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MCB.01034-07> (visité le 18/04/2022).
- [50] Laurens G. van der FLIER et Hans CLEVERS. “Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium”. en. In : *Annual Review of Physiology* 71.1 (mars 2009), p. 241-260. ISSN : 0066-4278, 1545-1585. DOI : 10.1146/annurev.physiol.010908.163145. URL : <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physiol.010908.163145> (visité le 17/02/2022).

- [51] Katherine Ellen FOLEY. “Organoids: a better in vitro model”. en. In : *Nature Methods* 14.6 (juin 2017), p. 559-562. ISSN : 1548-7105. DOI : 10.1038/nmeth.4307. URL : <https://www.nature.com/articles/nmeth.4307> (visité le 18/02/2022).
- [52] Jennifer FOULKE-ABEL et al. “Human Enteroids as a Model of Upper Small Intestinal Ion Transport Physiology and Pathophysiology”. en. In : *Gastroenterology* 150.3 (mars 2016), 638-649.e8. ISSN : 00165085. DOI : 10.1053/j.gastro.2015.11.047. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508515017333> (visité le 18/02/2022).
- [53] Andrew M. FREDDO et al. “Coordination of signaling and tissue mechanics during morphogenesis of murine intestinal villi: a role for mitotic cell rounding”. en. In : *Integrative Biology* 8.9 (2016), p. 918-928. ISSN : 1757-9694, 1757-9708. DOI : 10.1039/C6IB00046K. URL : <https://academic.oup.com/ib/article/8/9/918-928/5115304> (visité le 18/02/2022).
- [54] Masayuki FUJII et al. “Efficient genetic engineering of human intestinal organoids using electroporation”. en. In : *Nature Protocols* 10.10 (oct. 2015), p. 1474-1485. ISSN : 1754-2189, 1750-2799. DOI : 10.1038/nprot.2015.088. URL : <http://www.nature.com/articles/nprot.2015.088> (visité le 18/02/2022).
- [55] François GERBE, Catherine LEGRAVEREND et Philippe JAY. “The intestinal epithelium tuft cells: specification and function”. en. In : *Cellular and Molecular Life Sciences* 69.17 (sept. 2012), p. 2907-2917. ISSN : 1420-682X, 1420-9071. DOI : 10.1007/s00018-012-0984-7. URL : <http://link.springer.com/10.1007/s00018-012-0984-7> (visité le 16/02/2022).
- [56] N. GJOREVSKI et al. “Tissue geometry drives deterministic organoid patterning”. en. In : *Science* 375.6576 (jan. 2022), eaaw9021. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : 10.1126/science.aaw9021. URL : <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aaw9021> (visité le 19/02/2022).
- [57] Nikolce GJOREVSKI et Matthias P LUTOLF. “Synthesis and characterization of well-defined hydrogel matrices and their application to intestinal stem cell and organoid culture”. en. In : *Nature Protocols* 12.11 (nov. 2017), p. 2263-2274. ISSN : 1754-2189, 1750-2799. DOI : 10.1038/nprot.2017.095. URL : <http://www.nature.com/articles/nprot.2017.095> (visité le 01/06/2022).

- [58] Nikolce GJOREVSKI et al. “Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture”. en. In : *Nature* 539.7630 (nov. 2016), p. 560-564. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature20168. URL : <http://www.nature.com/articles/nature20168> (visité le 19/02/2022).
- [59] Laurent GOLÉ et al. “A Quorum-Sensing Factor in Vegetative Dictyostelium Discoideum Cells Revealed by Quantitative Migration Analysis”. en. In : *PLOS ONE* 6.11 (nov. 2011), e26901. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0026901. URL : <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0026901> (visité le 07/04/2022).
- [60] K. J. GREEN et al. “Intercellular Junction Assembly, Dynamics, and Homeostasis”. en. In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2.2 (fév. 2010), a000125-a000125. ISSN : 1943-0264. DOI : 10.1101/cshperspect.a000125. URL : <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a000125> (visité le 16/02/2022).
- [61] Gediminas GREICIUS et al. “*PDGFR*⁺ pericryptal stromal cells are the critical source of Wnts and RSPO3 for murine intestinal stem cells in vivo”. en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.14 (avr. 2018). ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1713510115. URL : <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1713510115> (visité le 18/04/2022).
- [62] Caitriona M. GUINANE et Paul D. COTTER. “Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ”. eng. In : *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 6.4 (juill. 2013), p. 295-308. ISSN : 1756-283X. DOI : 10.1177/1756283X13482996.
- [63] Barry M. GUMBINER et Pierre D. MCCREA. “Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins”. en. In : *Journal of Cell Science* 1993.Supplement_17 (déc. 1993), p. 155-158. ISSN : 1477-9137, 0021-9533. DOI : 10.1242/jcs.1993.Supplement_17.22. URL : https://journals.biologists.com/jcs/article/1993/Supplement_17/155/58274/Catenins-as-mediators-of-the-cytoplasmic-functions (visité le 16/02/2022).
- [64] Mukund GUPTA et al. “Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing”. en. In : *Nature Communications* 6.1 (nov. 2015), p. 7525. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/ncomms8525. URL : <http://www.nature.com/articles/ncomms8525> (visité le 16/02/2022).

- [65] Shijie HE et al. *Stiffness Regulates Intestinal Stem Cell Fate*. en. preprint. Cell Biology, mars 2021. DOI : 10.1101/2021.03.15.435410. URL : <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.03.15.435410> (visité le 20/04/2022).
- [66] Xi C HE et al. “BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt–catenin signaling”. en. In : *Nature Genetics* 36.10 (oct. 2004), p. 1117-1121. ISSN : 1061-4036, 1546-1718. DOI : 10.1038/ng1430. URL : <http://www.nature.com/articles/ng1430> (visité le 17/02/2022).
- [67] B. van der HEE et al. “Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture system from porcine intestinal organoids”. en. In : *Stem Cell Research* 28 (avr. 2018), p. 165-171. ISSN : 18735061. DOI : 10.1016/j.scr.2018.02.013. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1873506118300576> (visité le 18/02/2022).
- [68] David M. HELFMAN et al. “Caldesmon Inhibits Nonmuscle Cell Contractility and Interferes with the Formation of Focal Adhesions”. en. In : *Molecular Biology of the Cell* 10.10 (oct. 1999). Sous la dir. de Tony HUNTER, p. 3097-3112. ISSN : 1059-1524, 1939-4586. DOI : 10.1091/mbc.10.10.3097. URL : <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.10.10.3097> (visité le 15/02/2022).
- [69] David M. HELFMAN et al. “Caldesmon Inhibits Nonmuscle Cell Contractility and Interferes with the Formation of Focal Adhesions”. In : *Molecular Biology of the Cell* 10.10 (oct. 1999), p. 3097-3112. ISSN : 1059-1524. DOI : 10.1091/mbc.10.10.3097. URL : <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.10.10.3097> (visité le 16/02/2022).
- [70] Xian HU et al. “Cooperative Vinculin Binding to Talin Mapped by Time-Resolved Super Resolution Microscopy”. en. In : *Nano Letters* 16.7 (juill. 2016), p. 4062-4068. ISSN : 1530-6984, 1530-6992. DOI : 10.1021/acs.nanolett.6b00650. URL : <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.nanolett.6b00650> (visité le 15/02/2022).
- [71] Meritxell HUCH et al. “The hope and the hype of organoid research”. en. In : *Development* 144.6 (mars 2017), p. 938-941. ISSN : 0950-1991, 1477-9129. DOI : 10.1242/dev.150201. URL : <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.150201> (visité le 18/02/2022).

- [72] Jonathan D. HUMPHRIES, Adam BYRON et Martin J. HUMPHRIES. “Integrin ligands at a glance”. en. In : *Journal of Cell Science* 119.19 (oct. 2006), p. 3901-3903. ISSN : 1477-9137, 0021-9533. DOI : 10.1242/jcs.03098. URL : <https://journals.biologists.com/jcs/article/119/19/3901/29120/Integrin-ligands-at-a-glance> (visité le 15/02/2022).
- [73] Richard O. HYNES. “Integrins”. en. In : *Cell* 110.6 (sept. 2002), p. 673-687. ISSN : 00928674. DOI : 10.1016/S0092-8674(02)00971-6. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867402009716> (visité le 15/02/2022).
- [74] Jordan JACOBELLI et al. “Confinement-optimized three-dimensional T cell amoeboid motility is modulated via myosin IIA-regulated adhesions”. en. In : *Nature Immunology* 11.10 (oct. 2010), p. 953-961. ISSN : 1529-2908, 1529-2916. DOI : 10.1038/ni.1936. URL : <http://www.nature.com/articles/ni.1936> (visité le 11/04/2022).
- [75] Christina Tobin KÅHRSTRÖM, Nonia PARIENTE et Ursula WEISS. “Intestinal microbiota in health and disease”. en. In : *Nature* 535.7610 (juill. 2016), p. 47-47. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/535047a. URL : <http://www.nature.com/articles/535047a> (visité le 17/02/2022).
- [76] L. KARLSSON et al. “Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR-(alpha) deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties in villus morphogenesis”. en. In : *Development* 127.16 (août 2000), p. 3457-3466. ISSN : 1477-9129, 0950-1991. DOI : 10.1242/dev.127.16.3457. URL : <https://journals.biologists.com/dev/article/127/16/3457/40868/Abnormal-gastrointestinal-development-in-PDGF-A> (visité le 17/02/2022).
- [77] Bernard KHOR, Agnès GARDET et Ramnik J. XAVIER. “Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease”. en. In : *Nature* 474.7351 (juin 2011), p. 307-317. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature10209. URL : <http://www.nature.com/articles/nature10209> (visité le 17/02/2022).
- [78] Maura C. KIBBEY. “Maintenance of the EHS sarcoma and Matrigel preparation”. en. In : *Journal of Tissue Culture Methods* 16.3-4 (sept. 1994), p. 227-230. ISSN : 0271-8057, 1573-0603. DOI : 10.1007/BF01540656. URL : <http://link.springer.com/10.1007/BF01540656> (visité le 20/02/2022).

- [79] Raehyun KIM et al. “Formation of arrays of planar, murine, intestinal crypts possessing a stem/proliferative cell compartment and differentiated cell zone”. en. In : *Lab on a Chip* 18.15 (2018), p. 2202-2213. ISSN : 1473-0197, 1473-0189. DOI : 10.1039/C8LC00332G. URL : <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8LC00332G> (visité le 19/02/2022).
- [80] A. J. KOCH et H. MEINHARDT. “Biological pattern formation: from basic mechanisms to complex structures”. In : *Reviews of Modern Physics* 66.4 (oct. 1994), p. 1481-1507. DOI : 10.1103/RevModPhys.66.1481. URL : <https://link.aps.org/doi/10.1103/RevModPhys.66.1481> (visité le 10/02/2022).
- [81] Ute KOCH, Rajwinder LEHAL et Freddy RADTKE. “Stem cells living with a Notch”. en. In : *Development* 140.4 (fév. 2013), p. 689-704. ISSN : 1477-9129, 0950-1991. DOI : 10.1242/dev.080614. URL : <https://journals.biologists.com/dev/article/140/4/689/76741/Stem-cells-living-with-a-Notch> (visité le 07/06/2022).
- [82] Åsa KOLTERUD et al. “Paracrine Hedgehog Signaling in Stomach and Intestine: New Roles for Hedgehog in Gastrointestinal Patterning”. en. In : *Gastroenterology* 137.2 (août 2009), p. 618-628. ISSN : 00165085. DOI : 10.1053/j.gastro.2009.05.002. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650850900746X> (visité le 17/02/2022).
- [83] Cynthia KOSINSKI et al. “Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors”. en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.39 (sept. 2007), p. 15418-15423. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.0707210104. URL : <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0707210104> (visité le 18/04/2022).
- [84] Denis KRNDIJA et al. “Active cell migration is critical for steady-state epithelial turnover in the gut”. en. In : *Science* 365.6454 (août 2019), p. 705-710. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : 10.1126/science.aau3429. URL : <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aau3429> (visité le 17/02/2022).
- [85] Frank KUHNERT et al. “Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1”. en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101.1 (jan. 2004), p. 266-271. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.2536800100. URL : <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2536800100> (visité le 18/04/2022).

- [86] Jean-Cheng KUO. “Focal Adhesions Function as a Mechanosensor”. en. In : *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. T. 126. Elsevier, 2014, p. 55-73. ISBN : 9780123946249. DOI : 10.1016/B978-0-12-394624-9.00003-8. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123946249000038> (visité le 15/02/2022).
- [87] Jean-Cheng KUO et al. “Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation”. en. In : *Nature Cell Biology* 13.4 (avr. 2011), p. 383-393. ISSN : 1465-7392, 1476-4679. DOI : 10.1038/ncb2216. URL : <http://www.nature.com/articles/ncb2216> (visité le 15/02/2022).
- [88] Ohman KWON, Tae-Su HAN et Mi-Young SON. “Intestinal Morphogenesis in Development, Regeneration, and Disease: The Potential Utility of Intestinal Organoids for Studying Compartmentalization of the Crypt-Villus Structure”. In : *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (oct. 2020), p. 593969. ISSN : 2296-634X. DOI : 10.3389/fcell.2020.593969. URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.593969/full> (visité le 17/02/2022).
- [89] Eric C. LAI. “Notch signaling: control of cell communication and cell fate”. en. In : *Development* 131.5 (mars 2004), p. 965-973. ISSN : 1477-9129, 0950-1991. DOI : 10.1242/dev.01074. URL : <https://journals.biologists.com/dev/article/131/5/965/42659/Notch-signaling-control-of-cell-communication-and> (visité le 17/04/2022).
- [90] Madeline A. LANCASTER et Juergen A. KNOBLICH. “Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies”. en. In : *Science* 345.6194 (juill. 2014), p. 1247125. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1247125. URL : <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1247125> (visité le 18/02/2022).
- [91] Enara LARRAÑAGA CARRICAJO. “Effects of substrate-derived cues in driving the selforganization of organoid-derived intestinal epithelia”. eng. Ph.D. Thesis. Universitat de Barcelona, mai 2021. URL : <http://www.tdx.cat/handle/10803/672277> (visité le 02/06/2022).
- [92] G W LAURIE, C P LEBLOND et G R MARTIN. “Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes.” en. In : *Journal of Cell Biology* 95.1 (oct. 1982), p. 340-344. ISSN : 0021-9525, 1540-8140. DOI : 10.1083/jcb.95.1.340. URL :

<https://rupress.org/jcb/article/95/1/340/19776/Localization-of-type-IV-collagen-laminin-heparan> (visité le 17/02/2022).

- [93] Huy Quang LE et al. “Mechanical regulation of transcription controls Polycomb-mediated gene silencing during lineage commitment”. en. In : *Nature Cell Biology* 18.8 (août 2016), p. 864-875. ISSN : 1476-4679. DOI : 10.1038/ncb3387. URL : <https://www.nature.com/articles/ncb3387> (visité le 17/04/2022).
- [94] Yanchun LIU et al. “Production of Tissue-Engineered Small Intestine in Rats with Different Ages of Cell Donors”. en. In : *Tissue Engineering Part A* 25.11-12 (juin 2019), p. 878-886. ISSN : 1937-3341, 1937-335X. DOI : 10.1089/ten.tea.2018.0226. URL : <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tea.2018.0226> (visité le 18/02/2022).
- [95] Catriona Y. LOGAN et Roel NUSSE. “THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE”. en. In : *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20.1 (nov. 2004), p. 781-810. ISSN : 1081-0706, 1530-8995. DOI : 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126. URL : <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126> (visité le 10/02/2022).
- [96] James L. MADARA. “Maintenance of the macromolecular barrier at cell extrusion sites in intestinal epithelium: Physiological rearrangement of tight junctions”. en. In : *The Journal of Membrane Biology* 116.2 (juin 1990), p. 177-184. ISSN : 0022-2631, 1432-1424. DOI : 10.1007/BF01868675. URL : <http://link.springer.com/10.1007/BF01868675> (visité le 18/04/2022).
- [97] Blair B. MADISON et al. “Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis”. en. In : *Development* 132.2 (jan. 2005), p. 279-289. ISSN : 1477-9129, 0950-1991. DOI : 10.1242/dev.01576. URL : <https://journals.biologists.com/dev/article/132/2/279/42855/Epithelial-hedgehog-signals-pattern-the-intestinal> (visité le 18/02/2022).
- [98] Jerzy G. MAJ et al. “Microvascular function regulates intestinal crypt response to radiation”. eng. In : *Cancer Research* 63.15 (août 2003), p. 4338-4341. ISSN : 0008-5472.
- [99] Kevin J. MALOY et Fiona POWRIE. “Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease”. en. In : *Nature* 474.7351 (juin 2011), p. 298-306. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature10208. URL : <http://www.nature.com/articles/nature10208> (visité le 17/02/2022).

- [100] Felix MARGADANT et al. “Mechanotransduction In Vivo by Repeated Talin Stretch-Relaxation Events Depends upon Vinculin”. en. In : *PLOS Biology* 9.12 (2011), e1001223. ISSN : 1545-7885. DOI : 10.1371/journal.pbio.1001223. URL : <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1001223> (visité le 15/02/2022).
- [101] Mami MATANO et al. “Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids”. en. In : *Nature Medicine* 21.3 (mars 2015), p. 256-262. ISSN : 1078-8956, 1546-170X. DOI : 10.1038/nm.3802. URL : <http://www.nature.com/articles/nm.3802> (visité le 18/02/2022).
- [102] Kyle W MCCRACKEN et al. “Generating human intestinal tissue from pluripotent stem cells in vitro”. en. In : *Nature Protocols* 6.12 (déc. 2011), p. 1920-1928. ISSN : 1754-2189, 1750-2799. DOI : 10.1038/nprot.2011.410. URL : <http://www.nature.com/articles/nprot.2011.410> (visité le 18/02/2022).
- [103] René Marc MÈGE et Noboru ISHIYAMA. “Integration of Cadherin Adhesion and Cytoskeleton at *Adherens* Junctions”. en. In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9.5 (mai 2017), a028738. ISSN : 1943-0264. DOI : 10.1101/cshperspect.a028738. URL : <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a028738> (visité le 16/02/2022).
- [104] Laween MERAN, Anna BAULIES et Vivian S. W. LI. “Intestinal Stem Cell Niche: The Extracellular Matrix and Cellular Components”. en. In : *Stem Cells International* 2017 (2017), p. 1-11. ISSN : 1687-966X, 1687-9678. DOI : 10.1155/2017/7970385. URL : <https://www.hindawi.com/journals/sci/2017/7970385/> (visité le 17/02/2022).
- [105] Sabine MIDDENDORP et al. “Adult Stem Cells in the Small Intestine Are Intrinsically Programmed with Their Location-Specific Function”. en. In : *STEM CELLS* 32.5 (mai 2014), p. 1083-1091. ISSN : 1066-5099, 1549-4918. DOI : 10.1002/stem.1655. URL : <https://academic.oup.com/stemcls/article/32/5/1083-1091/6444530> (visité le 18/02/2022).
- [106] Hiroyuki MIYOSHI et Thaddeus S STAPPENBECK. “In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture”. en. In : *Nature Protocols* 8.12 (déc. 2013), p. 2471-2482. ISSN : 1754-2189, 1750-2799. DOI : 10.1038/nprot.2013.153. URL : <http://www.nature.com/articles/nprot.2013.153> (visité le 05/01/2022).

- [107] Jonathan P. MOCHEL et al. “Intestinal Stem Cells to Advance Drug Development, Precision, and Regenerative Medicine: A Paradigm Shift in Translational Research”. en. In : *The AAPS Journal* 20.1 (jan. 2018), p. 17. ISSN : 1550-7416. DOI : 10.1208/s12248-017-0178-1. URL : <http://link.springer.com/10.1208/s12248-017-0178-1> (visité le 18/02/2022).
- [108] Mandar Deepak MUZUMDAR et al. “A global double-fluorescent Cre reporter mouse”. en. In : *genesis* 45.9 (sept. 2007), p. 593-605. ISSN : 1526954X, 1526968X. DOI : 10.1002/dvg.20335. URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvg.20335> (visité le 11/04/2022).
- [109] C. M. NELSON et al. “Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics”. en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.33 (août 2005), p. 11594-11599. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.0502575102. URL : <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0502575102> (visité le 12/02/2022).
- [110] Mikhail NIKOLAEV et al. “Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis”. en. In : *Nature* 585.7826 (sept. 2020), p. 574-578. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/s41586-020-2724-8. URL : <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2724-8> (visité le 19/02/2022).
- [111] Daichi ONOZATO et al. “Efficient generation of human and cynomolgus monkey induced pluripotent stem cell-derived intestinal organoids with pharmacokinetic functions”. en. In : *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 33.1 (jan. 2018), S66. ISSN : 13474367. DOI : 10.1016/j.dmpk.2017.11.223. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1347436717304548> (visité le 18/02/2022).
- [112] Paloma ORDÓÑEZ-MORÁN, éd. *Intestinal Stem Cells: Methods and Protocols*. en. T. 2171. Methods in Molecular Biology. New York, NY : Springer US, 2020. ISBN : 9781071607466 9781071607473. DOI : 10.1007/978-1-0716-0747-3. URL : <http://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-0747-3> (visité le 05/01/2022).
- [113] E. R. ORSKOV et C. FRASER. “The effects of processing of barley-based supplements on rumen pH, rate of digestion of voluntary intake of dried grass in sheep”. eng. In : *The British Journal of Nutrition* 34.3 (nov. 1975), p. 493-500. ISSN : 0007-1145. DOI : 10.1017/s0007114575000530.

- [114] J. Thomas PARSONS, Alan Rick HORWITZ et Martin A. SCHWARTZ. “Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension”. en. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11.9 (sept. 2010), p. 633-643. ISSN : 1471-0072, 1471-0080. DOI : 10.1038/nrm2957. URL : <http://www.nature.com/articles/nrm2957> (visité le 16/02/2022).
- [115] Robert J. PELHAM et Yu-li WANG. “Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility”. en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94.25 (déc. 1997), p. 13661-13665. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.94.25.13661. URL : <https://www.pnas.org/content/94/25/13661> (visité le 13/02/2022).
- [116] Luca PELLEGRINET et al. “Dll1- and Dll4-Mediated Notch Signaling Are Required for Homeostasis of Intestinal Stem Cells”. en. In : *Gastroenterology* 140.4 (avr. 2011), 1230-1240.e7. ISSN : 00165085. DOI : 10.1053/j.gastro.2011.01.005. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508511000394> (visité le 18/04/2022).
- [117] Carlos PÉREZ-GONZÁLEZ et al. “Digesting the mechanobiology of the intestinal epithelium”. en. In : *Current Opinion in Genetics & Development* 72 (fév. 2022), p. 82-90. ISSN : 0959437X. DOI : 10.1016/j.gde.2021.10.005. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959437X21001258> (visité le 17/02/2022).
- [118] Carlos PÉREZ-GONZÁLEZ et al. “Mechanical compartmentalization of the intestinal organoid enables crypt folding and collective cell migration”. en. In : *Nature Cell Biology* 23.7 (juill. 2021), p. 745-757. ISSN : 1465-7392, 1476-4679. DOI : 10.1038/s41556-021-00699-6. URL : <http://www.nature.com/articles/s41556-021-00699-6> (visité le 19/02/2022).
- [119] Grégoire PEYRET et al. “Sustained Oscillations of Epithelial Cell Sheets”. en. In : *Biophysical Journal* 117.3 (août 2019), p. 464-478. ISSN : 00063495. DOI : 10.1016/j.bpj.2019.06.013. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349519305028> (visité le 11/04/2022).
- [120] Stefano PICCOLO, Hanna Lucie SLADITSCHKEK-MARTENS et Michelangelo CORDENONSI. “Mechanotransduction in vertebrate development”. en. In : *Developmental Biology* 488 (août 2022), p. 54-67. ISSN : 00121606. DOI : 10.1016/j.ydbio.2022.05.005. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160622000872> (visité le 01/06/2022).

- [121] Holly M. POLING et al. “Mechanically induced development and maturation of human intestinal organoids *in vivo*”. en. In : *Nature Biomedical Engineering* 2.6 (juin 2018), p. 429-442. ISSN : 2157-846X. DOI : 10.1038/s41551-018-0243-9. URL : <http://www.nature.com/articles/s41551-018-0243-9> (visité le 17/02/2022).
- [122] Robin H. POWELL et Michael S. BEHNKE. “WRN conditioned media is sufficient for *in vitro* propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals”. en. In : *Biology Open* (jan. 2017), bio.021717. ISSN : 2046-6390. DOI : 10.1242/bio.021717. URL : <https://journals.biologists.com/bio/article/doi/10.1242/bio.021717/256746/WRN-conditioned-media-is-sufficient-for-in-vitro> (visité le 18/02/2022).
- [123] Robin H. POWELL et Michael S. BEHNKE. “WRN conditioned media is sufficient for *in vitro* propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals”. en. In : *Biology Open* (jan. 2017), bio.021717. ISSN : 2046-6390. DOI : 10.1242/bio.021717. URL : <https://journals.biologists.com/bio/article/doi/10.1242/bio.021717/256746/WRN-conditioned-media-is-sufficient-for-in-vitro> (visité le 18/02/2022).
- [124] Sara RAHMANI et al. “Intestinal organoids: A new paradigm for engineering intestinal epithelium *in vitro*”. en. In : *Biomaterials* 194 (fév. 2019), p. 195-214. ISSN : 01429612. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2018.12.006. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961218308287> (visité le 18/02/2022).
- [125] J. RASPOPOVIC et al. “Digit patterning is controlled by a Bmp-Sox9-Wnt Turing network modulated by morphogen gradients”. en. In : *Science* 345.6196 (août 2014), p. 566-570. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1252960. URL : <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1252960> (visité le 10/02/2022).
- [126] Maria RESCIGNO. “The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity”. en. In : *Trends in Immunology* 32.6 (juin 2011), p. 256-264. ISSN : 14714906. DOI : 10.1016/j.it.2011.04.003. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490611000585> (visité le 17/02/2022).
- [127] Armando del RIO et al. “Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding”. en. In : *Science* 323.5914 (jan. 2009), p. 638-641. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1162912. URL : <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1162912> (visité le 15/02/2022).

- [128] Manolis ROULIS et Richard A. FLAVELL. “Fibroblasts and myofibroblasts of the intestinal lamina propria in physiology and disease”. en. In : *Differentiation* 92.3 (sept. 2016), p. 116-131. ISSN : 03014681. DOI : 10.1016/j.diff.2016.05.002. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301468116300172> (visité le 18/04/2022).
- [129] Sami Alom RUIZ et Christopher S. CHEN. “Emergence of Patterned Stem Cell Differentiation Within Multicellular Structures”. en. In : *Stem Cells* 26.11 (nov. 2008), p. 2921-2927. ISSN : 1066-5099, 1549-4918. DOI : 10.1634/stemcells.2008-0432. URL : <https://academic.oup.com/stemcls/article/26/11/2921-2927/6415528> (visité le 12/02/2022).
- [130] Verena RUPRECHT et al. “How cells respond to environmental cues – insights from bio-functionalized substrates”. en. In : *Journal of Cell Science* (jan. 2016), jcs.196162. ISSN : 1477-9137, 0021-9533. DOI : 10.1242/jcs.196162. URL : <https://journals.biologists.com/jcs/article/doi/10.1242/jcs.196162/265188/How-cells-respond-to-environmental-cues-insights> (visité le 15/02/2022).
- [131] Steven A. SAENZ, Betsy C. TAYLOR et David ARTIS. “Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites”. en. In : *Immunological Reviews* 226.1 (déc. 2008), p. 172-190. ISSN : 01052896, 1600065X. DOI : 10.1111/j.1600-065X.2008.00713.x. URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.2008.00713.x> (visité le 17/02/2022).
- [132] Yoshiki SASAI, Mototsugu EIRAKU et Hidetaka SUGA. “In vitro organogenesis in three dimensions: self-organising stem cells”. en. In : *Development* 139.22 (nov. 2012), p. 4111-4121. ISSN : 1477-9129, 0950-1991. DOI : 10.1242/dev.079590. URL : <https://journals.biologists.com/dev/article/139/22/4111/45594/In-vitro-organogenesis-in-three-dimensions-self> (visité le 18/02/2022).
- [133] Toshiro SATO et Hans CLEVERS. “Growing Self-Organizing Mini-Guts from a Single Intestinal Stem Cell: Mechanism and Applications”. en. In : *Science* 340.6137 (juin 2013), p. 1190-1194. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1234852. URL : <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1234852> (visité le 18/02/2022).
- [134] Toshiro SATO et Hans CLEVERS. “SnapShot: Growing Organoids from Stem Cells”. en. In : *Cell* 161.7 (juin 2015), 1700-1700.e1. ISSN : 00928674. DOI :

- 10.1016/j.cell.2015.06.028. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415007126> (visité le 11/04/2022).
- [135] Toshiro SATO et al. “Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett’s Epithelium”. en. In : *Gastroenterology* 141.5 (nov. 2011), p. 1762-1772. ISSN : 00165085. DOI : 10.1053/j.gastro.2011.07.050. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508511011085> (visité le 18/02/2022).
- [136] Toshiro SATO et al. “Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts”. en. In : *Nature* 469.7330 (jan. 2011), p. 415-418. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature09637. URL : <http://www.nature.com/articles/nature09637> (visité le 18/02/2022).
- [137] Toshiro SATO et al. “Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche”. en. In : *Nature* 459.7244 (mai 2009), p. 262-265. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature07935. URL : <http://www.nature.com/articles/nature07935> (visité le 18/02/2022).
- [138] Thuan Beng SAW et al. “Topological defects in epithelia govern cell death and extrusion”. en. In : *Nature* 544.7649 (avr. 2017), p. 212-216. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature21718. URL : <http://www.nature.com/articles/nature21718> (visité le 17/02/2022).
- [139] Herbert B SCHILLER et al. “Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins”. en. In : *EMBO reports* 12.3 (mars 2011), p. 259-266. ISSN : 1469-221X, 1469-3178. DOI : 10.1038/embor.2011.5. URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/embor.2011.5> (visité le 15/02/2022).
- [140] Gerald SCHWANK et al. “Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients”. en. In : *Cell Stem Cell* 13.6 (déc. 2013), p. 653-658. ISSN : 19345909. DOI : 10.1016/j.stem.2013.11.002. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590913004931> (visité le 18/02/2022).
- [141] François SCHWEISGUTH et Francis CORSON. “Self-Organization in Pattern Formation”. en. In : *Developmental Cell* 49.5 (juin 2019), p. 659-677. ISSN : 15345807. DOI : 10.1016/j.devcel.2019.05.019. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580719303910> (visité le 10/02/2022).

- [142] Amy E. SHYER et al. “Bending Gradients: How the Intestinal Stem Cell Gets Its Home”. en. In : *Cell* 161.3 (avr. 2015), p. 569-580. ISSN : 00928674. DOI : 10.1016/j.cell.2015.03.041. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741500361X> (visité le 17/02/2022).
- [143] Amy E. SHYER et al. “Emergent cellular self-organization and mechanosensation initiate follicle pattern in the avian skin”. en. In : *Science* 357.6353 (août 2017), p. 811-815. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : 10.1126/science.aai7868. URL : <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aai7868> (visité le 10/02/2022).
- [144] Quinton SMITH et al. “Cytoskeletal tension regulates mesodermal spatial organization and subsequent vascular fate”. en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.32 (août 2018), p. 8167-8172. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1808021115. URL : <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1808021115> (visité le 17/04/2022).
- [145] Jérôme SOLON et al. “Fibroblast Adaptation and Stiffness Matching to Soft Elastic Substrates”. en. In : *Biophysical Journal* 93.12 (déc. 2007), p. 4453-4461. ISSN : 00063495. DOI : 10.1529/biophysj.106.101386. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000634950771696X> (visité le 16/02/2022).
- [146] Jason R. SPENCE, Ryan LAUF et Noah F. SHROYER. “Vertebrate intestinal endoderm development”. en. In : *Developmental Dynamics* 240.3 (mars 2011), p. 501-520. ISSN : 10588388. DOI : 10.1002/dvdy.22540. URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvdy.22540> (visité le 17/02/2022).
- [147] Jason R. SPENCE et al. “Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro”. en. In : *Nature* 470.7332 (fév. 2011), p. 105-109. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature09691. URL : <http://www.nature.com/articles/nature09691> (visité le 18/02/2022).
- [148] Carsen STRINGER et al. “Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation”. en. In : *Nature Methods* 18.1 (jan. 2021), p. 100-106. ISSN : 1548-7091, 1548-7105. DOI : 10.1038/s41592-020-01018-x. URL : <http://www.nature.com/articles/s41592-020-01018-x> (visité le 21/04/2022).
- [149] Kaelyn D. SUMIGRAY, Michael TERWILLIGER et Terry LECHLER. “Morphogenesis and Compartmentalization of the Intestinal Crypt”. en. In : *Developmental Cell* 45.2 (avr. 2018), p. 183-197.e5. ISSN : 15345807. DOI : 10.1016/

- j . devcel . 2018 . 03 . 024. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580718302442> (visité le 17/02/2022).
- [150] Takuya SUZUKI. “Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions”. en. In : *Cellular and Molecular Life Sciences* 70.4 (fév. 2013), p. 631-659. ISSN : 1420-682X, 1420-9071. DOI : 10.1007/s00018-012-1070-x. URL : <http://link.springer.com/10.1007/s00018-012-1070-x> (visité le 17/02/2022).
- [151] Vinay SWAMINATHAN et Clare M. WATERMAN. “The molecular clutch model for mechanotransduction evolves”. en. In : *Nature Cell Biology* 18.5 (mai 2016), p. 459-461. ISSN : 1465-7392, 1476-4679. DOI : 10.1038/ncb3350. URL : <http://www.nature.com/articles/ncb3350> (visité le 15/02/2022).
- [152] Joe SWIFT et al. “Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation”. en. In : *Science* 341.6149 (août 2013), p. 1240104. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1240104. URL : <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1240104> (visité le 20/02/2022).
- [153] M. TAKEICHI. “The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis”. en. In : *Development* 102.4 (avr. 1988), p. 639-655. ISSN : 1477-9129, 0950-1991. DOI : 10.1242/dev.102.4.639. URL : <https://journals.biologists.com/dev/article/102/4/639/36060/The-cadherins-cell-cell-adhesion-molecules> (visité le 01/06/2022).
- [154] David Wei-Min TAN et Nick BARKER. “Intestinal Stem Cells and Their Defining Niche”. en. In : *Current Topics in Developmental Biology*. T. 107. Elsevier, 2014, p. 77-107. ISBN : 9780124160224. DOI : 10.1016/B978-0-12-416022-4.00003-2. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124160224000032> (visité le 17/02/2022).
- [155] Curtis A. THORNE et al. “Enteroid Monolayers Reveal an Autonomous WNT and BMP Circuit Controlling Intestinal Epithelial Growth and Organization”. en. In : *Developmental Cell* 44.5 (mars 2018), 624-633.e4. ISSN : 15345807. DOI : 10.1016/j.devcel.2018.01.024. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580718300595> (visité le 05/01/2022).
- [156] Jean-Yves TINEVEZ et al. “TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking”. en. In : *Methods* 115 (fév. 2017), p. 80-90. ISSN : 10462023. DOI : 10.1016/j.ymeth.2016.09.016. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202316303346> (visité le 21/04/2022).

- [157] L. TRICHET et al. “Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness”. en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.18 (mai 2012), p. 6933-6938. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1117810109. URL : <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1117810109> (visité le 16/02/2022).
- [158] Jerry S. TRIER et Moxey PAMELA COLONY. “Morphogenesis of the Small Intestine During Fetal Development”. In : *Novartis Foundation Symposia*. Sous la dir. de Katherine ELLIOTT et Julie WHELAN. Chichester, UK : John Wiley & Sons, Ltd., mai 2008, p. 3-29. ISBN : 9780470720530 9780444901019. DOI : 10.1002/9780470720530.ch2. URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470720530.ch2> (visité le 17/02/2022).
- [159] Yu-Hwai TSAI et al. “A Method for Cryogenic Preservation of Human Biopsy Specimens and Subsequent Organoid Culture”. en. In : *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 6.2 (2018), 218-222.e7. ISSN : 2352345X. DOI : 10.1016/j.jcmgh.2018.04.008. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352345X18300687> (visité le 18/02/2022).
- [160] Alan Mathison TURING. “The chemical basis of morphogenesis”. In : *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 237.641 (août 1952), p. 37-72. DOI : 10.1098/rstb.1952.0012. URL : <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.1952.0012> (visité le 10/02/2022).
- [161] Gregory H. UNDERHILL et al. “Bioengineering Methods for Analysis of Cells In Vitro”. en. In : *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28.1 (nov. 2012), p. 385-410. ISSN : 1081-0706, 1530-8995. DOI : 10.1146/annurev-cellbio-101011-155709. URL : <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-101011-155709> (visité le 11/02/2022).
- [162] Kelli L. VANDUSSEN et al. “Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells”. en. In : *Development* 139.3 (fév. 2012), p. 488-497. ISSN : 1477-9129, 0950-1991. DOI : 10.1242/dev.070763. URL : <https://journals.biologists.com/dev/article/139/3/488/45537/Notch-signaling-modulates-proliferation-and> (visité le 18/04/2022).
- [163] Miguel VICENTE-MANZANARES et al. “Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration”. en. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10.11 (nov. 2009), p. 778-790. ISSN : 1471-0072, 1471-0080. DOI :

- 10.1038/nrm2786. URL : <http://www.nature.com/articles/nrm2786> (visité le 16/02/2022).
- [164] K. D. WALTON et al. “Hedgehog-responsive mesenchymal clusters direct patterning and emergence of intestinal villi”. en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.39 (sept. 2012), p. 15817-15822. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1205669109. URL : <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1205669109> (visité le 17/02/2022).
- [165] Katherine D. WALTON et al. “Generation of intestinal surface: an absorbing tale”. en. In : *Development* 143.13 (juill. 2016), p. 2261-2272. ISSN : 1477-9129, 0950-1991. DOI : 10.1242/dev.135400. URL : <https://journals.biologists.com/dev/article/143/13/2261/47430/Generation-of-intestinal-surface-an-absorbing-tale> (visité le 18/02/2022).
- [166] James H.-C. WANG. “Mechanobiology of tendon”. en. In : *Journal of Biomechanics* 39.9 (jan. 2006), p. 1563-1582. ISSN : 00219290. DOI : 10.1016/j.jbiomech.2005.05.011. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021929005002265> (visité le 14/02/2022).
- [167] Yi WANG et al. “Long-Term Culture Captures Injury-Repair Cycles of Colonic Stem Cells”. en. In : *Cell* 179.5 (nov. 2019), 1144-1159.e15. ISSN : 00928674. DOI : 10.1016/j.cell.2019.10.015. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867419311651> (visité le 18/04/2022).
- [168] Yuli WANG et al. “A microengineered collagen scaffold for generating a polarized crypt-villus architecture of human small intestinal epithelium”. en. In : *Biomaterials* 128 (juin 2017), p. 44-55. ISSN : 01429612. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2017.03.005. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961217301412> (visité le 19/02/2022).
- [169] Aryeh WARMFLASH et al. “A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells”. en. In : *Nature Methods* 11.8 (août 2014), p. 847-854. ISSN : 1548-7091, 1548-7105. DOI : 10.1038/nmeth.3016. URL : <http://www.nature.com/articles/nmeth.3016> (visité le 12/02/2022).
- [170] Carey L WATSON et al. “An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells”. en. In : *Nature Medicine* 20.11 (nov. 2014), p. 1310-1314. ISSN : 1078-8956, 1546-170X. DOI : 10.1038/nm.3737. URL : <http://www.nature.com/articles/nm.3737> (visité le 18/02/2022).

- [171] J. M. WILLIAMS et al. “Epithelial Cell Shedding and Barrier Function: A Matter of Life and Death at the Small Intestinal Villus Tip”. en. In : *Veterinary Pathology* 52.3 (mai 2015), p. 445-455. ISSN : 0300-9858, 1544-2217. DOI : 10.1177/0300985814559404. URL : <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985814559404> (visité le 17/02/2022).
- [172] Sabina E. WINOGRAD-KATZ et al. “The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease”. en. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15.4 (avr. 2014), p. 273-288. ISSN : 1471-0072, 1471-0080. DOI : 10.1038/nrm3769. URL : <http://www.nature.com/articles/nrm3769> (visité le 15/02/2022).
- [173] Yao WU, Pakorn KANCHANAWONG et Ronen ZAIDEL-BAR. “Actin-Delimited Adhesion-Independent Clustering of E-Cadherin Forms the Nanoscale Building Blocks of Adherens Junctions”. en. In : *Developmental Cell* 32.2 (jan. 2015), p. 139-154. ISSN : 15345807. DOI : 10.1016/j.devcel.2014.12.003. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580714008004> (visité le 16/02/2022).
- [174] Wang Xi et al. “Modulation of designer biomimetic matrices for optimized differentiated intestinal epithelial cultures”. en. In : *Biomaterials* 282 (mars 2022), p. 121380. ISSN : 01429612. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2022.121380. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961222000199> (visité le 09/04/2022).
- [175] Xufeng XUE et al. “Mechanics-guided embryonic patterning of neuroectoderm tissue from human pluripotent stem cells”. en. In : *Nature Materials* 17.7 (juill. 2018), p. 633-641. ISSN : 1476-1122, 1476-4660. DOI : 10.1038/s41563-018-0082-9. URL : <http://www.nature.com/articles/s41563-018-0082-9> (visité le 05/01/2022).
- [176] Qiutan YANG et al. “Cell fate coordinates mechano-osmotic forces in intestinal crypt formation”. en. In : *Nature Cell Biology* 23.7 (juill. 2021), p. 733-744. ISSN : 1476-4679. DOI : 10.1038/s41556-021-00700-2. URL : <https://www.nature.com/articles/s41556-021-00700-2> (visité le 18/04/2022).
- [177] Mingxi YAO et al. “Force-dependent conformational switch of -catenin controls vinculin binding”. en. In : *Nature Communications* 5.1 (déc. 2014), p. 4525. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/ncomms5525. URL : <http://www.nature.com/articles/ncomms5525> (visité le 13/06/2022).

- [178] Mingxi YAO et al. “Mechanical activation of vinculin binding to talin locks talin in an unfolded conformation”. en. In : *Scientific Reports* 4.1 (mai 2015), p. 4610. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/srep04610. URL : <http://www.nature.com/articles/srep04610> (visité le 15/02/2022).
- [179] Mingxi YAO et al. “The mechanical response of talin”. en. In : *Nature Communications* 7.1 (sept. 2016), p. 11966. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/ncomms11966. URL : <http://www.nature.com/articles/ncomms11966> (visité le 15/02/2022).
- [180] Tony YEUNG et al. “Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion”. en. In : *Cell Motility and the Cytoskeleton* 60.1 (jan. 2005), p. 24-34. ISSN : 0886-1544, 1097-0169. DOI : 10.1002/cm.20041. URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cm.20041> (visité le 16/02/2022).
- [181] Shigenobu YONEMURA et al. “-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development”. en. In : *Nature Cell Biology* 12.6 (juin 2010), p. 533-542. ISSN : 1465-7392, 1476-4679. DOI : 10.1038/ncb2055. URL : <http://www.nature.com/articles/ncb2055> (visité le 16/02/2022).
- [182] Yimin YU, Shanthi SITARAMAN et Andrew T. GEWIRTZ. “Intestinal Epithelial Cell Regulation of Mucosal Inflammation”. en. In : *Immunologic Research* 29.1-3 (2004), p. 055-068. ISSN : 0257-277X. DOI : 10.1385/IR:29:1-3:055. URL : <http://link.springer.com/10.1385/IR:29:1-3:055> (visité le 17/02/2022).
- [183] Ronen ZAIDEL-BAR et Benjamin GEIGER. “The switchable integrin adhesome”. en. In : *Journal of Cell Science* 123.9 (mai 2010), p. 1385-1388. ISSN : 1477-9137, 0021-9533. DOI : 10.1242/jcs.066183. URL : <https://journals.biologists.com/jcs/article/123/9/1385/31699/The-switchable-integrin-adhesome> (visité le 15/02/2022).
- [184] Ronen ZAIDEL-BAR et al. “Functional atlas of the integrin adhesome”. en. In : *Nature Cell Biology* 9.8 (août 2007), p. 858-867. ISSN : 1465-7392, 1476-4679. DOI : 10.1038/ncb0807-858. URL : <http://www.nature.com/articles/ncb0807-858> (visité le 15/02/2022).
- [185] Yingfan ZHANG et al. “Mouse models of MYH9-related disease: mutations in nonmuscle myosin II-A”. en. In : *Blood* 119.1 (jan. 2012), p. 238-250. ISSN : 0006-4971, 1528-0020. DOI : 10.1182/blood-2011-06-358853. URL : <https://ashpublications.org/blood/article/119/1/238/125690/Mouse-models-of-MYH9related-disease-mutations-in> (visité le 11/04/2022).

- [186] Zhechun ZHANG et al. “Mouse embryo geometry drives formation of robust signaling gradients through receptor localization”. en. In : *Nature Communications* 10.1 (déc. 2019), p. 4516. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/s41467-019-12533-7. URL : <http://www.nature.com/articles/s41467-019-12533-7> (visité le 12/02/2022).
- [187] Wei-Jie ZHOU et al. “Induction of intestinal stem cells by R-spondin 1 and Slit2 augments chemoradioprotection”. en. In : *Nature* 501.7465 (sept. 2013), p. 107-111. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature12416. URL : <http://www.nature.com/articles/nature12416> (visité le 18/04/2022).
- [188] Ceniz ZIHNI et al. “Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates”. en. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17.9 (sept. 2016), p. 564-580. ISSN : 1471-0072, 1471-0080. DOI : 10.1038/nrm.2016.80. URL : <http://www.nature.com/articles/nrm.2016.80> (visité le 12/02/2022).



Fin !