



HAL
open science

Contrôle de la prolifération par le trafic intracellulaire dans un modèle d'organoïde intestinal murin

Maela Duclos

► **To cite this version:**

Maela Duclos. Contrôle de la prolifération par le trafic intracellulaire dans un modèle d'organoïde intestinal murin. Biologie cellulaire. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENB027 . tel-04308368

HAL Id: tel-04308368

<https://theses.hal.science/tel-04308368>

Submitted on 27 Nov 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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637

Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : *Biologie Cellulaire, Biologie du Développement*

Par

Maela DUCLOS

Contrôle de la prolifération par le trafic intracellulaire dans un modèle d'organoïde intestinal murin

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 6 juillet 2023

Unité de recherche : Institut Génétique et Développement de Rennes

Rapporteurs avant soutenance :

Audrey FERRAND
Nathalie SAUVONNET

CR- Institut de recherche en santé digestive
DR-Institut Pasteur

Composition du Jury :

Président : Gaëlle BOUDRY
Examineurs : Massiullah SHAFQA-ZADAH
Audrey FERRAND
Nathalie SAUVONNET

DR- Institut Nutrition, Métabolisme et Cancer
CR-Institut Curie
CR- Institut de Recherche en Santé digestive
DR-Institut Pasteur

Dir. de thèse : Grégoire MICHAUX

DR-Institut Génétique et Développement de Rennes

Co-encadrant de thèse : Aurélien BIDAUD-MEYNARD

MCF- Institut Génétique et Développement de Rennes

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mes travaux. Merci à Audrey Ferrand et Nathalie Sauvonnet d'avoir accepté d'être mes rapportrices, merci à Gaëlle Boudry et Massiullah Shafaq-Zadah d'avoir accepté d'être examinateurs.

J'aimerais ensuite remercier mes encadrants de thèse, pour m'avoir permis de travailler sur ce projet passionnant. Merci Grégoire de m'avoir acceptée dans ton équipe en catastrophe en plein milieu de thèse et de m'avoir fait confiance. Merci pour tes remarques et tes conseils bienveillants.

Un énorme merci à Aurélien, pour m'avoir encadrée et suivie au long de ces 2 années et demi. Merci pour toutes les discussions scientifiques, que ce soit sur ce projet ou non, pour ton aide, tes conseils, ta disponibilité et ton écoute. Merci aussi pour ta bonne humeur et les bons moments passés à discuter d'autres choses que de la stricte science. Merci aussi pour les blagues, bien que nos références ne soient pas toujours partagées à cause d'un certain écart de génération, j'ai quand même bien ri ! J'espère que cette première expérience d'encadrement de thèse te laissera un bon souvenir, malgré les circonstances un peu particulières de mon arrivée.

Ces années à l'IGDR n'auraient pas été les mêmes sans tous mes collègues, qui ont largement contribué aux bons souvenirs que je garderais de cette expérience. Merci à toutes et tous pour les discussions scientifiques et un soutien global autour mon projet de thèse, mais également pour toutes vos qualités humaines. Un grand merci à mes collègues de l'équipe, notamment à mes partenaires de bureau. Ophélie, pour ta gentillesse, ton attention, ta bienveillance et le chocolat (évidemment !) ; Joris, pour nos nombreuses discussions animées entrecoupées de références internet et un flegme à toute épreuve ; et Guillaume, le dernier arrivé, pour de nombreuses discussions très intéressantes, en particulier sur certaines bizarreries scientifiques. Merci aussi évidemment à Anne B. pour ton aide précieuse pour les manip, mais également pour les chouettes moments de discussions au labo ou dans les bureaux. Merci à Céline et Anne pour leur sympathie et leurs conseils dans les moments scientifiques comme informels.

Merci également à Céline Bruelle, pour ton aide scientifique, ta présence et ton écoute, indispensables lors de mon début de thèse. Merci aussi à Vincent Guen, pour m'avoir transmis l'amour des organoïdes et des cellules souches (ainsi que les compétences techniques nécessaires pour s'en occuper), pour ta sympathie, ta disponibilité et ta proposition de participer à la publication du protocole JoVE. Merci à tous ceux côtoyés à l'IGDR pendant ces années, pour toutes les discussions dans les couloirs ou à la cafétéria : Laurent, Stéphane, Géraldine, Mathieu, Marta, Manu, Hadi, Anne-Marie, Siham, Sébastien, Emmanuelle, Louis, Nadine, Bénédicte, Jacques ... Merci à Stéphanie et Xavier de la plateforme microscopie, et à Pascale de la plateforme histologie, pour leur aide et leurs conseils. Enfin, merci à Flora et Nina, maintenant Dr Demouchy et Dr Soler, pour les fous rires, les trrrrrs nombreuses discussions, et leur grand soutien.

Merci à Maxime Mahé et Eric Chevet, membres de mon comité de suivi de thèse (le deuxième), pour leurs conseils pertinents et leurs encouragements.

Merci à mes parents, pour m'avoir permis de faire les études que je voulais, et pour avoir toujours été là. Merci à Erell et Sklaerenn, à toute ma famille, et à ma belle-famille, pour leur joie de vivre, leur présence et leur intérêt pour ma thèse, malgré le fait que les sujets ne soient pas toujours faciles à comprendre.

Merci infini à tous mes amis, Elise, Alice, Kevin, Maureen, Enora, Robin, Thomas, Axel, Max, Louenn, Nathan, Ewan, Aliaume, Mathilde, Jérôme, Hugo pour leur présence nécessaire, leur amitié, leur humour, leur affection, leur soutien, et tous les moments passés ensemble. Je n'y serais pas arrivée sans vous.

Enfin et surtout, merci à Gaël, pour tout. Il n'y aura jamais assez de mots.

Liste des abréviations

AMOT : Angiomotin
AMOTL-2 : Angiomotin-like protein 2
AP : Adaptor Protein (ou Assembly Polypeptide)
AQP : Aquaporine
ARH : Autosomal recessive hypercholesterolemia
ARHGAP17 : Rho GTPase Activating Protein 17
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
Arp2/3 : Actin related protein 2/3
ATOH1 : Atonal BHLH Transcription Factor 1
ATP : Adenosine TriPhosphate
B-cat : β -caténine
BME2 : Basement membrane extract type 2
CaCo-2 : Colorectal adenoCarcinoma-2 cells
Cas9 : CRISPR-associated protein 9
c-Cbl : Casitas B lineage lymphoma
CD : Cluster of Differentiation
CD2AP : CD2-associated protein
C-ERMAD : COOH-terminal ERM association domain
c-Myc : Cellular Myc
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CtBP3/BARS : C-terminal binding protein/ BFA-dependent ADP-ribosylation substrate
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DSC2 : Desmocollin-2
DSG2 : Desmoglein-2
E-cad : E-cadhérine
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
ENR : EGF, Noggin, R-spondin
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
ERM-1 : Ezrin/Radixin/Moesin-1
FARP2 : FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 2
FERM-1 : 4.1 protein/ Ezrin/Radixin/Moesin-1
FIP : Rab11 family interacting proteins
FRAP : Fluorescence recovery after photobleaching
GAP : GTPase Activating Protein
GDI : GDP-Dissociation Inhibitor
GDP : Guanosine DiPhosphate
GEF : Guanine Exchange Factor
GFP : Green Fluorescent Protein
GLI1 : Glioma-Associated Oncogene Homolog 1
GPI : GlycosylPhosphatidyInositol
HeLa : Henrietta Lacks
IECs : Intestinal Epithelial Cells
IFB-2 : Intermediate Filament B-2
IWP-2 : Inhibitor of WNT Production-2
JNK : c-Jun N-terminal kinase
KIF : Kinesin superfamily
KO : Knocked-Out
Lamp2 : Lysosomal associated membrane protein-2

LIMK : LIM kinase
MAL/VIP17 : Myelin and lymphocyte-associated protein/ Vesicle integral protein of 17 kDa
MDCK : Madin-Darby Canine Kidney
MRCK : Myotonic dystrophy-related Cdc42-binding kinases
mTOR : Mammalian target of rapamycin
MVID : MicroVillus Inclusion Disease
MYO5B : Myosine 5B
NHERF : Na⁺-H⁺ exchanger regulatory factor
NF2 : Neurofibromatosis type 2
Olfm4 : Olfactomedine 4
OPT-2 : OligoPeptide Transporter-2
PAR : Partitioning defective
PATJ : PALS1-associated tight junction
PDGFA : Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha
PDZ : PSD95 Dlg1 Zo-1 domain
PEPT-1 : Intestinal peptide transporter 1
PH3 : Phospho-histone 3
PIP2 : Phosphatidylinositide 4,5 biPhosphate
PIP3 : Phosphatidylinositide 3,4,5 triPhosphate
PI4P : Phosphatidylinositol 4-Phosphate
PTEN : Phosphatase and tensin homolog
qRT-PCR : Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
Rab : Ras-related proteins in brain
Rac : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RANKL : Receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand
RAS : Rat Sarcoma virus
RBPJ : Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
Rho : Ras homologous
RhoA : Ras homologous family member A
RNAi : RNA interference
ROCK : Rho-associated protein kinase
Rok : Rho kinase
RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction
SCRIB : Scribble
SFRP1 : Secreted Frizzled related protein 1
SH3BP1 : SH3 Domain binding protein 1
SHP2 : Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2
SOX : SRY-Box Transcription Factor
TAZ : Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif
t-SNARE : target-Soluble NSF Attachment protein Receptor
TI-VAMP : Tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein
TGN : Trans-Golgi network
VAMP : Vesicle-associated membrane protein
V-ATPase : Vacuolar H⁺ -ATPases
v-SNARE : Vesicle-Soluble NSF Attachment Protein REceptor
WASP : Wiskott–Aldrich Syndrome protein
WNT : Wingless/Integrated
YAP : Yes associated protein

Liste des figures

Figure 1 : Architecture de l'épithélium intestinal mammifère.....	10
Figure 2 : Rôle de la R-spondine dans la signalisation WNT canonique.	15
Figure 3 : (A) Vue simplifiée de la signalisation EGF ; (B) Sources cellulaires des ligands et récepteurs de cette voie.	16
Figure 4 : Vue simplifiée de la signalisation Hippo.....	18
Figure 5 : Spécification du lignage dans l'épithélium intestinal.....	22
Figure 6 : Formation et morphologie des organoïdes intestinaux.....	28
Figure 7 : Organisation d'une cellule épithéliale intestinale polarisée.	33
Figure 8 : Localisation des facteurs de polarité et interactions antagonistes.....	36
Figure 9 : La perte de CDC42 dans les ISCs entraîne une hyperprolifération dépendante d'une voie YAP-EREG-mTOR.	42
Figure 10 : Différentes routes du trafic polarisé.....	45
Figure 11 : Structure du complexe AP-1.	49
Figure 12 : AP-1 régule la polarité apico-basale dans l'intestin chez C. elegans.	52
Figure 13 : L'absence d'AP-1 entraîne la formation de lumières ectopiques.....	55
Figure 14 : AP-1B régule la prolifération cellulaire intestinale.	57
Figure 15 : Temporalité des différents traitements lors de la culture des organoïdes.	59
Figure 16 : La voie E-cadhérine-β-caténine ne semble pas être activée de façon importante dans les organoïdes mutés pour Ap1m2.....	63
Figure 17 : Illustration des phénotypes d'extrusion ou de délamination cellulaire dans les organoïdes mutés pour Ap1m2.....	64
Figure 18 : Les défauts de polarité, l'hyperplasie des cryptes et la désorganisation de la couche épithéliale sont retrouvées dans les souris VillinCreERT2 Ap1m2^{f/f}, contrairement aux défauts de localisation de CDC42 ou des endosomes Rab11+.	66

Les schémas présents sur les figures ont été réalisés avec BioRender.

Table des matières

Introduction.....	9
I. Epithélium de l'intestin grêle mammifère	9
1. Description.....	9
a. Architecture.....	9
b. Types cellulaires	9
2. Prolifération intestinale homéostatique	11
a. Cellules souches intestinales.....	11
b. La niche des ISCs.....	11
1. Niche épithéliale : les cellules sécrétoires	11
2. Niche mésenchymateuse.....	13
c. Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération homéostatique	14
1. La voie WNT	14
2. La voie EGF	15
3. La voie Hippo	17
3. Différenciation intestinale	18
a. Migration le long de l'axe crypte/villosité.....	18
b. Lignage sécrétoire ou absorbant ? Le rôle de Notch.....	19
c. Différenciation des cellules de Paneth.....	19
d. Différenciation des cellules calciformes.....	20
e. Différenciation des cellules entéro-endocrines	23
f. Différenciation des cellules tuft	24
g. Différenciation des cellules M.....	24
h. Différenciation des entérocytes	25
4. Modèles d'étude.....	26
a. Organismes modèles	26
b. Modèles cellulaires.....	26
1. Modèles 2D	26
2. Modèles 3D	27
3. Explants.....	28
II. Polarité des cellules épithéliales intestinales.....	29
1. Organisation polarisée des cellules épithéliales intestinales	29
a. Pôle apical	29
1. Bordure en brosse.....	29
2. Réseau terminal	30
b. Jonctions bicellulaires	30
1. Jonctions serrées (TJ).....	31
2. Jonctions adhérentes (AJ)	31
3. Desmosomes.....	32
c. Pôle basolatéral.....	32
2. Facteurs de polarité.....	33
a. Pôle apical	34
b. Jonctions latérales apicales	34
c. Pôle basolatéral.....	35
3. CDC42	36
a. Description	36
b. Morphogénèse de la membrane apicale	37
c. Maturation et assemblage des jonctions	37
1. Axe CDC42-PAK4	37

2.	Rôle des GEFs et GAPs	38
d.	Luminogénèse	39
e.	Prolifération	40
III.	Trafic polarisé.....	42
1.	Différentes routes de trafic	43
a.	Route directe.....	43
b.	Transcytose	43
c.	Route aléatoire.....	43
d.	Voie de recyclage	44
2.	Signaux d'adressage	45
a.	Signaux d'adressage apical	45
b.	Signaux d'adressage basolatéral	46
3.	Trafic des vésicules	47
a.	Transport.....	47
b.	Attachement et fusion	48
c.	Rab GTPases	48
IV.	L'adaptateur de clathrine AP-1B.....	49
1.	Description.....	49
a.	Complexe AP	49
b.	AP-1B	49
c.	AP-1A dans les cellules épithéliales.....	50
2.	Fonctions d'AP-1 dans différents organismes et tissus	51
a.	<i>Caenorhabditis elegans</i> , tri basolatéral et apical	51
b.	<i>Drosophila melanogaster</i> , régulation de la signalisation Notch	52
c.	Poisson-zèbre	53
d.	Souris.....	54
1.	Développement	54
2.	Polarité des cellules intestinales	54
e.	Pathologies humaines	55
3.	Fonctions d'AP-1 dans la migration et la prolifération chez les mammifères	56
a.	Migration.....	56
b.	Prolifération	56
V.	Objectifs de la thèse.....	57
Matériel et méthodes	58	
I.	Traitements lors de la culture cellulaire	58
II.	Matériel et méthodes des résultats complémentaires	59
1.	Culture	59
2.	Immunofluorescence.....	59
3.	Tissus de souris.....	60
4.	Immunohistochimie.....	60
Résultats	60	
I.	Article.....	60
II.	Résultats complémentaires	62
1.	Analyse de la localisation de l'E-cadhérine et de l'activation de la voie de signalisation de la β -caténine.....	62
2.	Analyse des phénotypes d'extrusion ou de délamination cellulaire	63
3.	Analyse phénotypique des souris <i>VillinCreERT2 Ap1m2^{fl/fl}</i>	64

III. Contribution à d'autres travaux	67
1. V0-ATPase downregulation induces MVID-like brush border defects independently of apical trafficking in the mammalian intestine (Bidaud-Meynard et al., 2022).....	67
2. Three-Dimensional Imaging of Organoids to Study Primary Ciliogenesis During ex vivo Organogenesis (Duclos et al., 2021)	68
Discussion.....	69
I. AP-1B contribue au maintien de la polarité cellulaire intestinale	69
1. AP-1B ne joue pas un rôle majeur dans le maintien de la bordure en brosse apicale	70
2. Les mutations d' <i>Ap1m2</i> entraînent des défauts d'organisation des jonctions serrées et adhérentes	70
3. AP-1B contrôle l'enrichissement apical de CDC42	71
II. Voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération par AP-1B	72
1. Activation de la voie EGFR	72
a. Rôle possible de CDC42	72
b. Rôle du trafic	74
1. Trafic des ligands.....	74
2. Trafic des récepteurs	75
c. Rôle de Merlin	76
2. Activation de la signalisation YAP.....	77
a. Rôle de la polarité	77
b. Rôle des endosomes Rab11+	77
3. Rôle de la signalisation mTOR	78
3. Pas d'activation apparente de la voie WNT/ β -caténine	78
III. AP-1B contrôle la différenciation intestinale.....	79
1. Perturbations de la différenciation du lignage sécrétoire	79
a. Perturbations de la signalisation Notch	79
b. Identité et rôle des cellules intermédiaires ?	80
c. Défauts de migration des cellules de Paneth	81
2. Expansion de la zone des cellules souches/progénitrices	81
IV. Conclusion.....	82

Introduction

I. Épithélium de l'intestin grêle mammifère

1. Description

a. Architecture

L'épithélium de l'intestin grêle, long de plusieurs mètres, forme une barrière permettant l'absorption sélective des nutriments et empêchant le passage d'éléments nocifs pour l'organisme vers la circulation générale. L'architecture de l'intestin, composé de cryptes et de villosités (aussi appelées villi), facilite l'absorption des nutriments. En effet, les villosités sont de larges protrusions orientées vers la lumière intestinale qui permettent d'augmenter la surface d'absorption. Celles-ci contiennent des cellules différenciées, en grande majorité des entérocytes, spécialisées dans l'absorption des nutriments. Les cryptes sont quant à elles des structures invaginées à la base des villosités, et sont le lieu de la prolifération cellulaire (Fig.1).

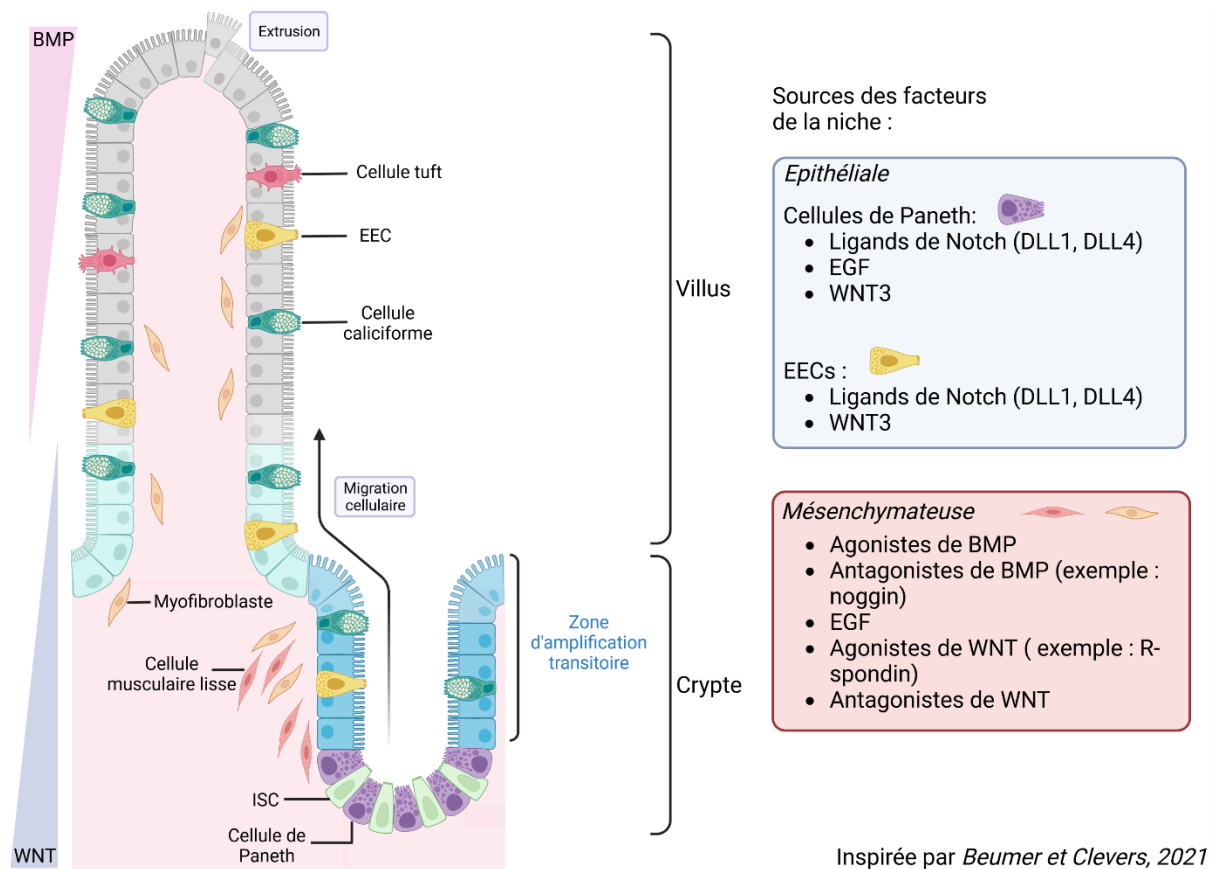
b. Types cellulaires

Six lignages cellulaires différents sont présents dans l'intestin grêle. Ceux-ci peuvent être divisés en deux grandes catégories : les cellules sécrétoires et celles responsables de l'absorption intestinale, que ce soit en nutriments ou en eau. Comme mentionné plus haut, ces dernières sont les entérocytes. Ces cellules très polarisées possèdent une bordure en brosse composée de microvillosités, permettant d'agrandir leur surface d'absorption. Les cellules *microfold* (cellules M), qui n'appartiennent à aucune des deux catégories, sont quant à elles impliquées dans la transcytose des antigènes luminaux vers les cellules immunitaires des plaques de Peyer, permettant ainsi une réponse immunitaire efficace (Mabbott et al., 2013).

Les cellules sécrétoires comprennent les cellules caliciformes, les cellules de Paneth, les cellules tuft, et les cellules entéro-endocrines. Les cellules caliciformes sécrètent du mucus, qui lubrifie et protège la paroi intestinale. Les cellules de Paneth produisent des peptides anti-microbiens et des facteurs supportant la niche des cellules souches. Les cellules tuft sont des cellules chimiosensorielles rares impliquées dans les réponses immunitaires de type 2 (Gerbe et al., 2016). Enfin, les cellules entéro-endocrines (EECs) sécrètent différentes hormones en fonction de l'absorption des aliments. Ces hormones participent à la régulation de différents processus physiologiques, comme la digestion ou la régulation de la prise alimentaire.

L'épithélium intestinal possède un très haut taux de renouvellement cellulaire, les cellules très différenciées ne vivant que 3 à 5 jours avant d'être extrudées dans la lumière (Park et al., 2016), en haut de la villosité. Les cellules de Paneth constituent cependant une exception : elles peuvent vivre 1 à 2 mois dans le fond de la crypte intestinale, et seront éliminées par des macrophages à la fin de leur durée de vie (Ireland et al., 2005). Le renouvellement cellulaire intestinal, rapide et continu, est permis par la présence de cellules souches intestinales (ISCs), très prolifératives, au fond des cryptes. Ces cellules donnent naissance à des cellules progénitrices de la zone d'amplification transitoire (cellules

TA) (Fig.1), qui se divisent ensuite deux à cinq fois supplémentaires avant de se différencier en entérocytes. Les progéniteurs sécrétoires quant à eux sont directement issus de la division de la cellule souche (Basak et al., 2014). Les différents types cellulaires, qu'ils appartiennent au lignage absorbant ou sécrétoire, sont tous issus des ISCs.



Inspirée par Beumer et Clevers, 2021

Figure 1 : Architecture de l'épithélium intestinal mammifère. L'épithélium intestinal contient deux types de structures : la crypte, site de prolifération, et la villosité. Les cellules exprimant le Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5) sont les cellules souches intestinales. Celles-ci sont intercalées entre les cellules de Paneth, qui sécrètent des ligands WNT et Notch, essentiels pour le maintien du potentiel souche, ainsi que du facteur de croissance épidermique (EGF), nécessaire à la prolifération des ISCs. Les cellules de Paneth sécrètent également des peptides anti-microbiens (comme le lysozyme), ce qui protège l'épithélium d'infiltrations bactériennes. Les cellules filles des ISCs migrent vers le long de l'axe crypte-villosité, et sont ainsi exposées à des niveaux décroissants de WNT, tandis que les niveaux de protéine osseuse morphogénétique (BMP) augmentent. Les gradients de WNT et BMP sont établis grâce à l'expression différentielle d'agonistes et d'antagonistes le long de l'axe crypte-villosité. En plus des ISCs et des cellules de Paneth, les cryptes contiennent des cellules TA qui se diviseront plusieurs fois avant d'être complètement matures, mais aussi des cellules sécrétoires fonctionnelles (les cellules entéro-endocrines (EEC) produisant des hormones, des cellules caliciformes produisant du mucus, et des cellules tuft, impliquées dans la régulation des réponses immunitaires). La villosité contient également les différents types de cellules sécrétoires, mais aussi et surtout, les entérocytes, nécessaires à la fonction d'absorption intestinale. A la fin de leur durée de vie, les cellules présentes dans la villosité sont extrudées en haut de celle-ci. La niche épithéliale et la niche mésenchymateuse produisent les différents facteurs impliqués dans le maintien de la fonction souche, souvent de manière redondante. Cependant, la R-spondine, potentialisateur de la signalisation WNT, et les agonistes ou antagonistes de BMP, sont uniquement produits par la niche mésenchymateuse. Les ligands Notch (Delta-like ligand (DLL)), quant à eux, proviennent uniquement de la niche épithéliale. La niche épithéliale comprend les cellules de Paneth et les EECs, ces dernières semblant constituer une

niche de réserve. De nombreux types cellulaires constituent la niche mésenchymateuse : parmi eux les cellules musculaires lisses, les myofibroblastes ou les télocytes.

2. Prolifération intestinale homéostatique

a. Cellules souches intestinales

En 1974, Cheng et Leblond identifient des cellules fines entre les cellules de Paneth, facilement identifiables grâce à leur contenu granulaire. Ces cellules seront nommées *crypt-base columnar cells*. (Cheng and Leblond, 1974). Des expériences de lignage utilisant une technique de marquage par mutagenèse chimique ont ensuite mis en évidence un flux de nouvelles cellules partant de la crypte vers la villosité. Deux types de clones ont été identifiés en fonction de leur durée de vie : longue (mois) et courte (jours) ; ce qui est cohérent avec la présence de cellules souches mais aussi de cellules progénitrices au sein de la crypte (Bjerknes and Cheng, 1999; Winton et al., 1988).

La découverte du gène *Lgr5*, marqueur des ISCs et cible de la signalisation WNT, elle-même nécessaire au renouvellement intestinal, marque un tournant dans l'étude des ISCs. L'utilisation de souris *Lgr5*-knock-in permet la réalisation d'expériences de lignage qui révèlent que les *crypt-base columnar cells* ont des caractéristiques propres aux cellules souches : elles prolifèrent, sont toujours présentes à l'âge adulte et peuvent engendrer les quatre types cellulaires intestinaux principaux (Barker et al., 2007). Les cellules M et tuft, découvertes ensuite, proviennent également des ISCs LGR5+ (de Lau et al., 2012; Gerbe et al., 2011). Ces ISCs peuvent être isolées à partir des cryptes et être maintenues en culture indéfiniment dans un milieu contenant certains facteurs de croissance. De plus, elles sont capables de générer des organoïdes intestinaux contenant les six types cellulaires présents dans l'intestin (Sato, 2009). Ces expériences confirment les caractéristiques de cellules souches adultes des cellules LGR5+ : la capacité à s'auto-renouveler ainsi qu'à générer les différents types cellulaires composant le tissu concerné.

b. La niche des ISCs

L'environnement des ISCs, nommé la niche, comprend des facteurs permettant de maintenir l'identité de ces cellules, et donc leur capacité d'auto-renouvellement. La compétition pour ces facteurs dans un espace limité au fond de la crypte permet de réguler le nombre d'ISCs. Ces facteurs sont sécrétés par les cellules présentes dans le stroma, mais également par des cellules épithéliales, comme les cellules de Paneth.

1. Niche épithéliale : les cellules sécrétoires

Différentes voies de signalisation impliquées dans la prolifération et différenciation intestinale ont été mises en lumière : WNT, R-spondine-LGR, Notch, celle du facteur de croissance épidermique (EGF), qui sont toutes activées dans les ISCs, et celle de la protéine osseuse morphogénétique (BMP), qui est inhibée dans les ISCs. Ces voies contrôlent l'équilibre entre auto-renouvellement et différenciation des ISCs. Le fait que des organoïdes intestinaux puissent être maintenus en culture sans cellules du stroma

souligne l'importance des facteurs épithéliaux. Ces expériences de culture permettent également de définir quels facteurs de la niche stromale sont absolument nécessaires. Les ISCs LGR5+ génèrent des organoïdes intestinaux lorsqu'elles sont cultivées en présence d'EGF, de R-spondine (activateur de la voie WNT), de Noggin (inhibiteur de BMP), et incluses dans un gel de matrice extracellulaire, comme du Matrigel (Sato, 2009). Les facteurs de la niche épithéliale sont sécrétés par les cellules de Paneth, situées à côté des ISCs dans le fond de la crypte (Fig.1).

Les cellules de Paneth présentent un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi étendus, signes de leur haute activité sécrétoire. Leurs sécrétions dans la lumière incluent des peptides antimicrobiens comme les α -défensines, le lysozyme, la phospholipase A2, les ribonucléases ; mais elles produisent aussi du WNT3 et de l'EGF (Bevins and Salzman, 2011). De plus, elles expriment des ligands de la voie Notch, comme Delta-like 1 (DLL1) et DLL4, qui activent les récepteurs NOTCH1 et NOTCH2, présents dans les ISCs. La signalisation Notch nécessite des contacts cellulaires, et le positionnement des cellules de Paneth au sein de la crypte permet l'optimisation de cette signalisation. Les ISCs dépendent de la signalisation Notch pour le maintien de leur identité. La délétion des ligands DLL1 et DLL4 ou l'inhibition pharmacologique de Notch induit la perte des cellules souches via leur différenciation en cellules sécrétoires (Pellegrinet et al., 2011; VanDussen et al., 2012). Bien que les ISCs LGR5+ puissent générer des organoïdes même cultivées seules, l'ajout de cellules de Paneth, à travers la mise en culture de la crypte entière, permet grandement d'améliorer le processus de génération de ces organoïdes (Sato et al., 2011b). Les cellules de Paneth jouent donc un rôle important dans le maintien et la fonction des ISCs.

L'architecture de la crypte participe à sa propre homéostasie et permet la régulation du nombre d'ISCs. En effet, les ISCs se divisent de façon symétrique et entrent dans une *compétition neutre* : la compétition pour l'espace contenant les facteurs de la niche, entretenue par des divisions constantes (Lopez-Garcia et al., 2010; Snippert et al., 2010). Cette compétition pour l'espace a été confirmée par des expériences d'imagerie *in vivo*, en utilisant un rapporteur GFP pour suivre les cellules LGR5+. Ces expériences ont également montré que les cellules qui étaient « poussées » hors de la niche se différenciaient immédiatement. De plus, la position d'une ISC au sein de la crypte a une importance sur son devenir : les ISCs plus proches de la périphérie de la niche ont plus de chances d'en être exclues, contrairement aux ISCs situées au fond de la crypte (Ritsma et al., 2014). La perte d'expression de *Lgr5* pourrait quant à elle être corrélée avec cette sortie de la niche et la différenciation. Le séquençage de l'ARN de cellules exprimant différents niveaux de *Lgr5* révèlent une augmentation graduelle de marqueurs de différenciation lorsque l'expression de *Lgr5* diminue (Muñoz et al., 2012). Les expériences de séquençage d'ARN sur cellules uniques montrent quant à elles la présence de deux clusters : des cellules LGR5^{high} exprimant d'autres marqueurs d'ISCs, comme *Olfm4*, et des cellules LGR5^{low} exprimant des marqueurs de cellules sécrétoires ou absorbatives (Kim et al., 2016b). L'architecture de la crypte conditionne donc le nombre d'ISCs à travers la compétition de celles-ci pour les facteurs de la niche, présents dans un espace restreint.

Enfin, les EECs semblent constituer une niche épithéliale de réserve (Fig.1). En effet, il a été montré que l'ablation des cellules de Paneth (via l'insertion d'un récepteur à la toxine diphtérique au locus de *Lyz1*) n'a pas d'effet à court terme sur les ISCs. En l'absence des cellules de Paneth, des cellules tuft et des EECs ont été observées entre les ISCs (van Es et al., 2019). Les cellules tuft et les EECs expriment les ligands de Notch DLL1 et DLL4, et permettent donc le maintien de l'activité de la signalisation Notch dans les ISCs. Le séquençage de l'ARN des cellules adjacentes aux ISCs révèle que les EECs sont les cellules ayant la plus grande probabilité d'occuper cette place, après les cellules de Paneth (Boisset et al., 2018).

2. Niche mésenchymateuse

La crypte est entourée de cellules immunitaires, de neurones du système entérique, de cellules endothéliales et de myofibroblastes. Ces populations cellulaires contribuent à la niche des ISC en apportant un soutien mécanique, mais également en sécrétant des facteurs de la signalisation WNT, R-spondine, et des inhibiteurs de BMP, qui sont nécessaires à la croissance des organoïdes *in vitro* (Sato, 2009) (Fig.1). En effet, le knock-out (KO) du gène *Porcupine* (*Porcn*), une enzyme nécessaire à la maturation de WNT, dans les cellules intestinales épithéliales et sub-épithéliales ne produit pas de phénotype ; cela suggère donc la présence d'une source alternative de WNT (San Roman et al., 2014). De plus, la délétion de *Wnt3*, bien qu'empêchant la croissance des organoïdes, peut être compensée par une co-culture avec des cellules mésenchymateuses ou une supplémentation du milieu en WNT (Farin et al., 2012). D'autres études ont été nécessaires à l'identification plus précise des types cellulaires impliqués dans cette niche.

Les télocytes, des cellules stromales possédant des prolongements cytoplasmiques et entourant l'épithélium (Kondo and Kaestner, 2019), sont des sources importantes de WNT2B, WNT5A et R-spondin3 (R-SPO3) (Shoshkes-Carmel et al., 2018). L'ablation de cette population entraîne une réduction de la prolifération des ISCs et la perte de l'activité de la signalisation WNT (Aoki et al., 2015). Des cellules stromales identifiées par leur expression de CD34, PDGFRA ou encore GLI1 produisent les mêmes agonistes de WNT que les télocytes (Degirmenci et al., 2018; Greicius et al., 2018; Stzpourginski et al., 2017) et leur sont très similaires (Kondo and Kaestner, 2019). Cependant, les facteurs niche nécessaires et suffisants sécrétés par les cellules mésenchymateuses n'ont pas encore été identifiés avec certitude. L'EGF et la R-spondine constituent de bons candidats, étant nécessaires à la culture des organoïdes car trop insuffisamment produits par la niche épithéliale (Sato, 2009). Les ligands WNT seuls ne permettent pas une activation suffisante des gènes cibles de la voie WNT, seule la R-spondine le permet (Yan et al., 2017). En effet, la délétion de *R-spo3* dans les cellules PDGFRA+ induit une diminution de l'activité de la signalisation WNT dans l'épithélium (Greicius et al., 2018). De plus, les ISCs disparaissent lorsque la sécrétion de WNT par les cellules PDGFRA+, ou par les télocytes, est bloquée. Cela suggère que la niche mésenchymateuse est la principale source de WNT (Aoki et al., 2015; Greicius et al., 2018). Ces observations semblent cependant contradictoires avec le fait que des organoïdes intestinaux puissent croître sans source de WNT. Les cellules stromales situées à la base de la crypte expriment des inhibiteurs de WNT, SFRP1 et DKK3 (Shoshkes-Carmel et al., 2018). Il est possible que la sécrétion de WNT par l'épithélium soit suffisante en culture isolée, mais que la perte des agonistes de WNT dans les cellules stromales les transforme en cellules uniquement inhibitrices de cette signalisation, expliquant la perte des ISCs.

Les cellules mésenchymateuses, en plus d'être une source essentielle de WNT, sont également une source de ligands de la signalisation EGF (Abud et al., 2021). Les organoïdes intestinaux ne peuvent être cultivés sans EGF exogène, ce qui suggère que les cellules de Paneth n'en constituent pas une source suffisante. Les populations cellulaires mésenchymateuses, notamment les cellules PDGFRA+ et les macrophages, expriment fortement la neuréguline 1 (NRG1), un ligand des récepteurs EGF et ErbB (Jardé et al., 2020). D'autres ligands sont également exprimés dans le compartiment stromal, comme l'amphiréguline (AREG) ou l'épiréguline (EREG) (Inatomi et al., 2006; Shao and Sheng, 2010). La niche mésenchymateuse joue donc un rôle crucial dans l'homéostasie intestinale, permettant le maintien des cellules souches via la sécrétion de ligands et d'agonistes de la signalisation WNT, et leur prolifération, soutenue par la sécrétion de ligands de la signalisation EGF.

c. Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération homéostatique

1. La voie WNT

La voie canonique de WNT, dont l'effecteur principal est la β -caténine, est très bien caractérisée. Les ligands WNT, agissant de manière autocrine ou paracrine, se lient et forment un complexe avec deux récepteurs : Frizzled (Fzd) et le low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LPR5)/LPR6. Cette dimérisation entraîne une cascade de signalisation impliquant le recrutement et l'activation de Dishevelled (Dvl) et des changements de conformation qui conduisent à la destruction d'un complexe comprenant l'Axine, l'adenomatous polyposis coli (APC), la casein kinase I (CKI) et la glycogène synthase kinase 3β (GSK3 β). Ce complexe est impliqué dans la dégradation de la β -caténine cytosolique par le protéasome. Celui-ci étant détruit, la β -caténine cytosolique transloque vers le noyau et s'associe avec l'hétérodimère lymphoïde enhancer factor (LEF) /T-cell factor (TCF), ce qui promeut la transcription des gènes cibles de la voie WNT, comme *c-myc*, *CD44* ou *Axin2* (Fig.2). Ces gènes sont essentiels à la fonction des cellules souches (Clevers, 2006). La délétion de *Tcf4* chez la souris, en développement ou adulte, conduit à la perte des ISCs (Korinek et al., 1998; van Es et al., 2012a). La surexpression de l'antagoniste de WNT Dickkopf 1 (DKK1) produit un phénotype semblable (Kuhnert et al., 2004; Pinto et al., 2003).

La R-spondine, activateur de la voie WNT, interagit avec le leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5). Cette interaction abolit un rétrocontrôle négatif intégré dans la voie WNT : les E3 ubiquitine ligases zinc and ring finger 3 (ZNR3) et ring finger 43 (RNF43), également des cibles de la voie WNT, promeuvent la dégradation des récepteurs Fzd et LPR5/6, inhibant la voie WNT par la même occasion (Hao et al., 2012; Koo et al., 2012) (Fig.2). La R-spondine forme un complexe avec le récepteur LGR5 ; ce complexe se lie aux E3 ubiquitine ligases et inhibe leur activité, ce qui entraîne une hausse d'activité de la signalisation WNT (Xie et al., 2013). La R-spondine est nécessaire pour atteindre l'activité de signalisation WNT suffisante au maintien des cellules souches. En effet, des fortes quantités de ligands WNT seuls ne sont pas suffisants (Yan et al., 2017).

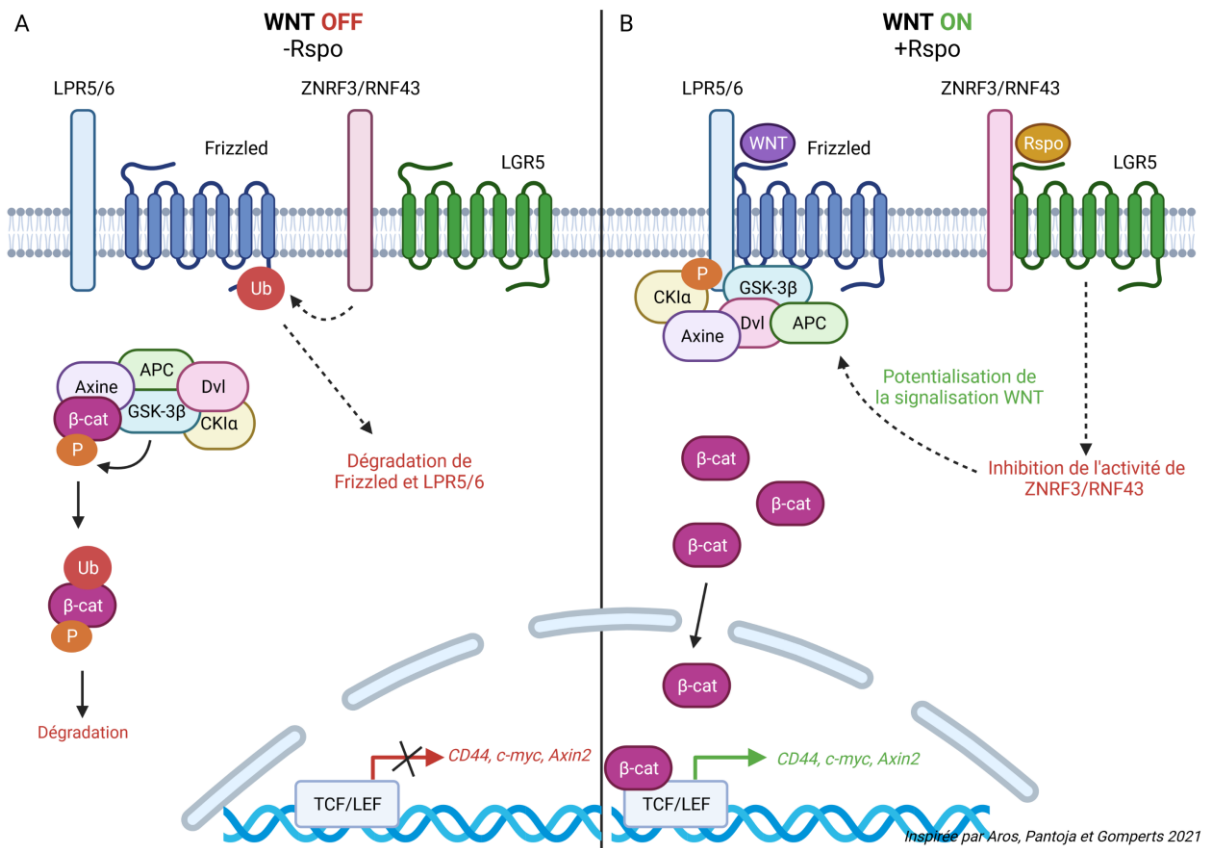


Figure 2 : Rôle de la R-spondine dans la signalisation WNT canonique. La R-spondine permet d'abolir un rétrocontrôle négatif de la voie WNT. **(A)** Lorsque la R-spondine est absente, les E3 ubiquitin ligases ZNRF3 et RNF43, également des cibles de la voie WNT, promeuvent la dégradation des récepteurs Fzd LPR5/6, inhibant la voie WNT. La β -caténine cytosolique est donc phosphorylée par GSK3 β et CKI, présentes dans un complexe comprenant aussi l'axine, APC et Dvl. Cela entraîne l'ubiquitination de la β -caténine et sa dégradation. **(B)** Au contraire, lorsque la R-spondine se fixe sur son récepteur LGR5, ce complexe se lie aux E3 ubiquitin ligases et inhibe leur activité. Les récepteurs Fzd et LPR5/6 ne sont donc plus dégradés et un ligand WNT peut s'y fixer. La dimérisation des récepteurs après fixation d'un ligand WNT entraîne une cascade d'événements aboutissant au démantèlement du complexe de dégradation de la β -caténine. La β -caténine cytosolique peut s'accumuler, transloquer vers le noyau et s'associer avec l'hétérodimère LEF/TCF, activant ainsi la transcription de gènes cibles de la voie WNT, comme CD44, c-myc ou Axin2.

2. La voie EGF

La famille des ligands de la voie EGF comprend : l'EGF, l'EREG, l'AREG, les NRGs (1-4) la bétacelluline (BTC), l'heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), et le transforming growth factor α (TGF- α). Lorsqu'un de ceux-ci se lie à son récepteur ErbB (1-4), cela induit une dimérisation du récepteur (homo/hétérodimères). Cela entraîne l'activation du domaine kinase intrinsèque et la phosphorylation de résidus tyrosine spécifiques. Ces tyrosines phosphorylées servent de point d'ancrage aux protéines à domaine SH2 qui permettent l'interaction avec d'autres protéines. Différentes cascades de signalisation peuvent en découler, impliquant la mitogen-activated protein kinase (MAPK), l'axe phosphoinositide 3-kinase (PI3K)- Akt ou Janus kinase (JAK)- signal transducer and activator of transcription (STAT) (Abud et al., 2021) (Fig.3).

Les cellules de Paneth constituent la source épithéliale de l'EGF, celui-ci se lie au récepteur de l'EGF (EGFR/ErbB1), fortement exprimé dans les ISCs (Abud et al., 2021; Sato et al., 2011b) (Fig.3). Bloquer ErbB1 entraîne la quiescence des ISCs, mais pas leur différenciation, excepté un léger biais vers le lignage entéro-endocrine, ce qui suggère que leur identité proliférative est au moins en partie découplée de leur potentiel souche (Basak et al., 2017). La stimulation de la voie RAS/MAPK (une des conséquences de l'activation de la signalisation EGF) à travers l'activation de mutations *Kras*, induit quant à elle un avantage clonal pour les ISCs LGR5+ (Snippert et al., 2014).

Les organoïdes intestinaux ont permis d'affiner les connaissances sur les rôles joués par les autres ligands de la voie EGF. La NRG1 peut substituer à l'EGF dans le milieu de culture des organoïdes, elle induit une robuste prolifération cellulaire, plus importante que l'EGF, via l'activation des signalisations MAPK et Akt (Jardé et al., 2020). La croissance des organoïdes humains dans un milieu contenant de l'HB-EGF est similaire à celle observée avec de l'EGF. L'EREG quant à elle ne permet pas cette croissance (Fujii et al., 2018). Enfin, des différences phénotypiques sont observées lorsque des organoïdes foetaux humains sont cultivés avec de l'EGF ou de la NRG1. La NRG1 favorise une plus grande diversité cellulaire et la maturation des ISCs, tandis que l'EGF soutient la prolifération cellulaire (Holloway et al., 2021; Yu et al., 2021). Les différents ligands de la signalisation EGF semblent donc avoir des fonctions différentes dans l'épithélium intestinal.

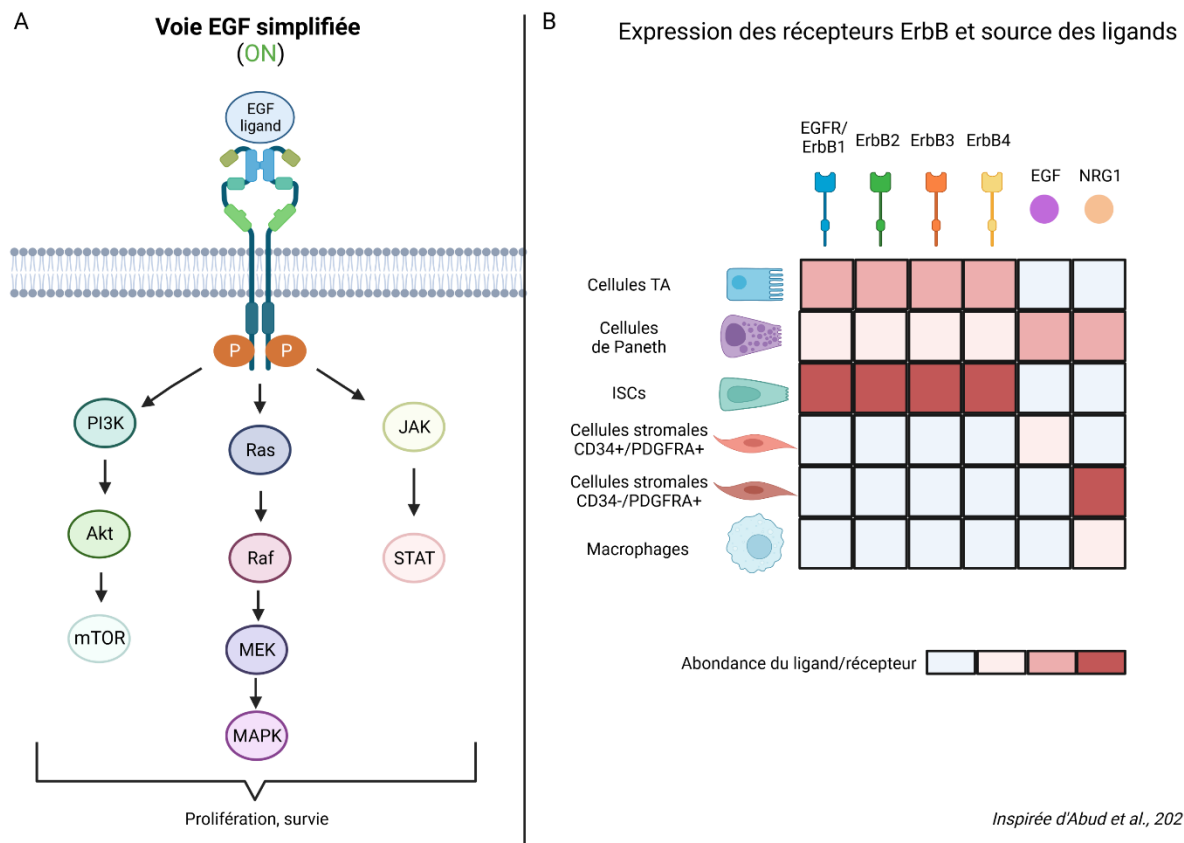


Figure 3 : (A) Vue simplifiée de la signalisation EGF ; (B) Sources cellulaires des ligands et récepteurs de cette voie. (A) Lorsque le ligand se fixe sur son récepteur (ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4), celui-ci s'homohétéro dimérise, activant ainsi le domaine kinase intrinsèque et entraînant la phosphorylation des résidus tyrosine kinase. Cet événement peut entraîner différentes cascades de signalisation. Parmi celles-ci : la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt-mammalian target of rapamycin (mTOR), la voie dite des mitogen- activated protein kinase (MAPK), et la voie Janus kinase (JAK)- signal transducer and activator of transcription (STAT), impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire. **(B)** Les cellules de Paneth, les cellules TA et les ISCs expriment des récepteurs ErbB, les ISCs étant le type cellulaire dans

lequel cette expression est la plus forte. Ces types cellulaires ne sécrètent cependant pas les ligands, excepté les cellules de Paneth. Les cellules stromales CD34-/PDGFRA+ sont des sources très importantes d'EGF, tandis que les cellules stromales CD34+/PDGFRA+ sont des sources de neuréguline 1 (NRG1). Les macrophages constituent également des sources d'EGF, mais plus faibles que les cellules de Paneth ou les cellules CD34-/PDGFRA+.

3. La voie Hippo

La voie Hippo est majoritairement étudiée dans le champ de la régénération intestinale. Pourtant, certains travaux semblent montrer que cette voie pourrait jouer un rôle dans l'auto-renouvellement homéostatique de l'intestin, bien que celui-ci reste à éclaircir.

Lorsque cette voie est active, la kinase mammalian STE20-like kinase (MST1/2) phosphoryle la large tumour suppressor kinase (LATS1/2), qui à son tour phosphoryle les régulateurs transcriptionnels YAP et TAZ, ce qui entraîne leur inactivation et leur rétention dans le cytoplasme. Lorsque ces régulateurs ne sont pas phosphorylés, ils peuvent transloquer vers le noyau où ils vont se lier à des facteurs de transcription, notamment les membres de famille TEA domain (TEAD) et induire la transcription des gènes cibles (Fig.4). Certains de ces gènes encodent pour des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, comme des cyclines et leurs régulateurs, ou des kinases mitotiques (Totaro et al., 2018). De façon intéressante, une des cibles de YAP1 est *Ereg*, le gène codant pour l'EGF, un des ligands de la voie EGF (Gregorieff et al., 2015).

Dans le tissu intestinal, YAP est localisé au niveau du cytoplasme des cellules TA (Zhou et al., 2011) et des noyaux des cellules LGR5+ (Barry et al., 2013). Il a été montré que YAP joue un rôle important dans la régénération des ISCs et dans la tumorigénèse (Barry et al., 2013). Cependant, la perte de YAP ou TAZ, concomitante ou non, ne semble pas perturber l'homéostasie intestinale (Barry et al., 2013; Cai et al., 2015; Gregorieff et al., 2015), ce qui suggère que YAP et TAZ ne sont pas nécessaires dans ce contexte. Ces résultats sont contradictoires avec ceux d'une autre étude. En effet, une perte de l'expression de YAP et TAZ par *short hairpin RNA* entraîne une diminution de la prolifération dans les cryptes, de l'expression de marqueurs d'ISCs et du nombre d'ISCs, ainsi qu'une diminution du nombre de cellules caliciformes (Imajo et al., 2015). Le rôle de YAP et TAZ dans l'homéostasie intestinale reste donc à éclaircir.

Plusieurs études ont montré des interactions entre la voie Hippo et la voie WNT. Par exemple, dans des cellules en culture, YAP/TAZ s'associent au complexe de dégradation de la β -caténine. Lors de la stimulation par un ligand WNT, YAP/TAZ se détachent du complexe, transloquent vers le noyau et activent l'expression de gènes cibles (Azzolin et al., 2014). YAP/TAZ seraient donc en aval de la signalisation WNT. D'un autre côté, l'augmentation de l'expression de YAP suite à des dommages atténue la signalisation WNT, restreignant l'expansion des ISCs et la différenciation en cellules de Paneth (Barry et al., 2013; Gregorieff et al., 2015). La voie Hippo interagit également avec les voies EGF et Notch. Comme mentionné plus haut, un des gènes cibles de YAP encode l'EGF, et est up-régulé lors de la régénération intestinale (Gregorieff et al., 2015). En ce qui concerne la voie Notch, une étude récente a montré que l'expression variable de YAP dans des organoïdes symétriques induit l'expression de DLL1 dans un nombre limité de cellules (celles avec le plus haut niveau d'expression de YAP), et celles-ci deviennent ensuite des cellules de Paneth (Serra et al., 2019). La voie Hippo interagit avec trois des voies impliquées dans la prolifération et la différenciation intestinale homéostatique. Déterminer l'importance et la portée de ces interactions demandera d'autres travaux.

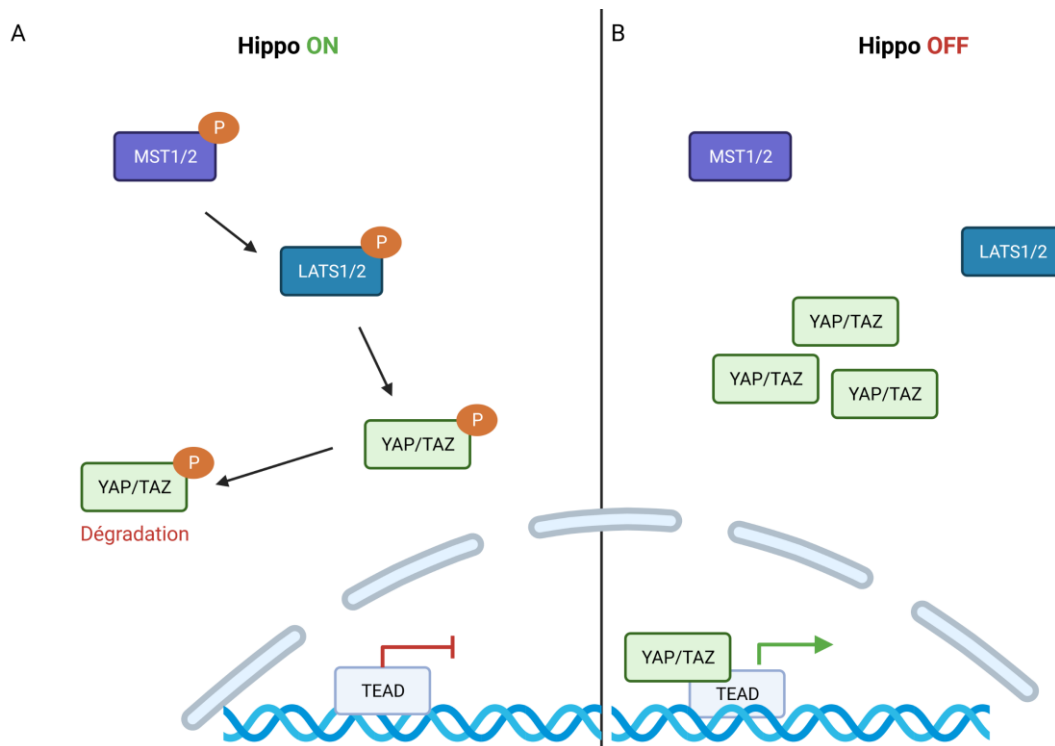


Figure 4 : Vue simplifiée de la signalisation Hippo. (A) Lorsque la signalisation Hippo est activée, la kinase mammalian STE20-like kinase (MST1/2) phosphoryle la large tumour suppressor kinase (LATS1/2). Celle-ci phosphoryle à son tour YAP et TAZ, ce qui entraîne leur inactivation et in fine leur dégradation par le protéasome. **(B)** Lorsque la signalisation Hippo est désactivée, les YAP et TAZ ne sont pas phosphorylés, restent donc actifs et peuvent transloquer dans le noyau. Dans le noyau, il se lie à des facteurs de transcription, notamment ceux de la famille TEA domain (TEAD), et induisent la transcription d'une variété de gènes cibles.

3. Différenciation intestinale

a. Migration le long de l'axe crypte/villosité

Les cellules filles des ISCs sont graduellement déplacées sur l'axe crypte/villosité au fur et à mesure des nouvelles divisions des ISCs. A la fin de leur durée de vie, les cellules arrivent au haut de la villosité et sont extrudées, entraînant leur mort par anoïkis ou « anoïkose ». La migration des cellules le long de l'axe est généralement pensée comme un processus passif. De nouvelles cellules arrivant des cryptes en flux continu prendraient naturellement la place laissée par les cellules extrudées (Heath, 1996). Cependant, de récents travaux ont montré l'existence d'un processus de migration active à l'aide de protrusions basales riches en actine (Krndija et al., 2019). Perturber le réseau d'actine présent dans ces protrusions entraîne une réduction de la vitesse de migration le long de la villosité. Contrairement aux autres, les cellules de Paneth migrent vers le fond de la crypte, la plus vieille étant celle la plus proche du centre (Bjerknes and Cheng, 1981). Cette migration est dépendante de la signalisation Eph-Ephrin. Celle-ci génère une répulsion entre les cellules exprimant Ephrin B3 ou Ephrin B2, soit les cellules de Paneth et les ISCs respectivement, et les cellules de la villosité exprimant Ephrin B (Batlle et al., 2002; Merlos-Suárez et al., 2011). Cette répulsion est régulée par le contrôle de la dynamique du cytosquelette dans plusieurs autres tissus (Klein, 2012). La perte d'Ephrin B3 entraîne

une délocalisation des cellules de Paneth vers le haut de la crypte, puis vers la villosité lorsque cette perte est concomitante à celle d'Ephrin B2 (Batlle et al., 2002). Les gènes *EPHB2* et *EPHB3* sont des cibles de la voie WNT (van de Wetering et al., 2002). La migration des cellules le long de l'axe crypte/villosité est dépendant, au moins en partie, de la formation de protrusions basales riches en actine, et de la signalisation Eph-Ephrin, sous le contrôle de la signalisation WNT.

b. Lignage sécrétoire ou absorptif ? Le rôle de Notch

Lorsque les cellules filles des ISCs quittent la niche, celles-ci sont exposées à des niveaux différents des signaux WNT, Notch ou EGF et ceux-ci vont déterminer leur destin cellulaire. La culture d'organoïdes permet de manipuler les niveaux de ces voies de signalisation afin de mieux disséquer leurs rôles, ainsi que d'enrichir les organoïdes en certains types cellulaires. L'engagement des progéniteurs vers un des deux grands types de lignage, absorptif ou sécrétoire, se fait en fonction de la signalisation Notch (Fre et al., 2005). Les progéniteurs qui ne sont plus exposés aux ligands Notch sécrétés par les cellules de Paneth augmentent l'expression de leurs propres ligands Notch, DLL1 et DLL4. Ces progéniteurs s'engagent donc vers le lignage sécrétoire (Fig.5), et permettent de soutenir l'activation de la voie Notch dans six à huit cellules voisines, qui se différencieront ensuite en entérocytes (van Es et al., 2012b). Ce processus, l'inhibition latérale, permet d'obtenir un ratio fixe de cellules sécrétoires pour un nombre plus important d'entérocytes.

La signalisation Notch est dépendante des contacts cellulaires entre deux cellules. Une d'entre elles produit le ligand, l'autre possède le récepteur et reçoit le signal. L'interaction entre les deux, entraîne une cascade de signalisation qui aboutit au clivage du domaine intracellulaire du récepteur, le Notch Intracellular domain (NICD) (Bray, 2016; Zamfirescu et al., 2022). Le NICD s'associe ensuite à la protéine de liaison à l'ADN RBPJ, et induit la transcription du gène *Hairy and enhancer of split 1* (*Hes1*). *Hes1* réprime de nombreux facteurs de transcription hélice-boucle-hélice (bHLH) impliqués dans la différenciation, notamment ATOH1 (aussi connu sous le nom de MATH1), un facteur de transcription pro-sécrétoire. La perte de *Hes1* conduit à une différenciation excessive en cellules sécrétoires (Jensen et al., 2000; Suzuki et al., 2005). Un phénotype similaire est observé après l'inhibition pharmacologique de Notch (VanDussen et al., 2012). La perte d'ATOH1 entraîne quant à elle la disparition du lignage sécrétoire (Yang et al., 2001). ATOH1 active l'expression des ligands Delta, renforçant l'inhibition latérale (Kim et al., 2014). Il active également l'expression de facteurs de transcription spécifiques à certains types cellulaires sécrétoires, qui seront détaillés dans les sections correspondant à ces types cellulaires. HES1 réprime les inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes p27^{KIP1} et p57^{KIP2}, ce qui promeut la prolifération des ISCs, mais aussi des cellules TA destinées à devenir des entérocytes (Riccio et al., 2008). Les cellules TA destinées à devenir des cellules sécrétoires ont quant à elles tendance à être post-mitotiques (Basak et al., 2014). La signalisation Notch joue donc un rôle critique dans le contrôle du ratio entérocytes/ cellules sécrétoires à travers l'inhibition latérale. Les facteurs HES1, dont l'expression est induite par la signalisation Notch, et ATOH1, dont l'expression est réprimée par HES1, sont cruciaux dans la détermination de l'identité cellulaire des cellules intestinales.

c. Différenciation des cellules de Paneth

La signalisation WNT joue deux rôles dans la différenciation des cellules de Paneth : en contrôlant la migration des progéniteurs de Paneth vers le fond de la crypte (via Ephrin B3), et en induisant leur différenciation via la régulation de l'expression de SOX9 (Fig.5). SOX9 est un facteur de transcription, et le gène qui l'encode est une cible de la voie WNT. Son inactivation conduit à la disparition des cellules de Paneth (Bastide et al., 2007; Mori-Akiyama et al., 2007). La différenciation des cellules de Paneth requiert donc la présence de la signalisation WNT et l'absence de la signalisation Notch (Fig.5). Cela permet d'expliquer le rapide retour des cellules de Paneth après leur ablation chimique (Sawada et al., 1991; Sawada et al., 1993). En effet, les ISCs, qui ont une forte activité de la voie WNT, ne sont plus exposées aux ligands Notch d'habitude sécrétés par les cellules de Paneth. Cette combinaison permet leur différenciation en cellules de Paneth (Beumer and Clevers, 2021).

Les cellules de Paneth proviennent de progéniteurs proliférant peu, appelés les label-retaining cells (LRC) (Fig.5). Ces cellules expriment fortement *Lgr5*, cible de la voie WNT (Buczacki et al., 2013; Roth et al., 2012). Dans les organoïdes, l'expression de *Wnt3* augmente le nombre de cellules de Paneth (Farin et al., 2012). Les ligands de WNT agissent sur une courte distance, ce qui est dû en partie à leur faible solubilité, causée par des modifications lipidiques (Alexandre et al., 2014). La visualisation de WNT3 marqué génétiquement par le peptide HA a permis de mettre en évidence l'existence d'un gradient de WNT3 sur une courte distance dans les cryptes d'organoïdes intestinaux. En effet, WNT3 reste lié à la membrane des cellules voisines des cellules productrices de ce ligand, via leurs récepteurs Fzd. Les ISCs sont donc en contact avec une grande quantité de WNT3, mais lorsque leurs cellules filles sortent de la niche et se divisent, WNT3 se dilue (Farin et al., 2012). La faible prolifération des LRCs leur permet donc probablement de se maintenir dans ce gradient, et de garder une forte activité de la signalisation WNT.

d. Différenciation des cellules caliciformes

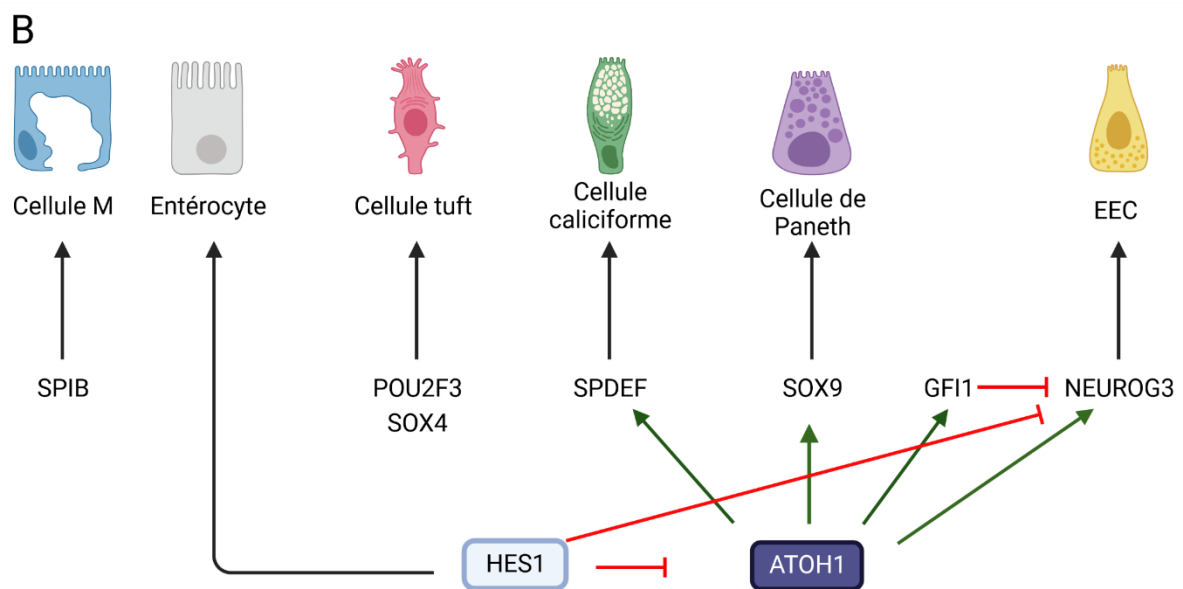
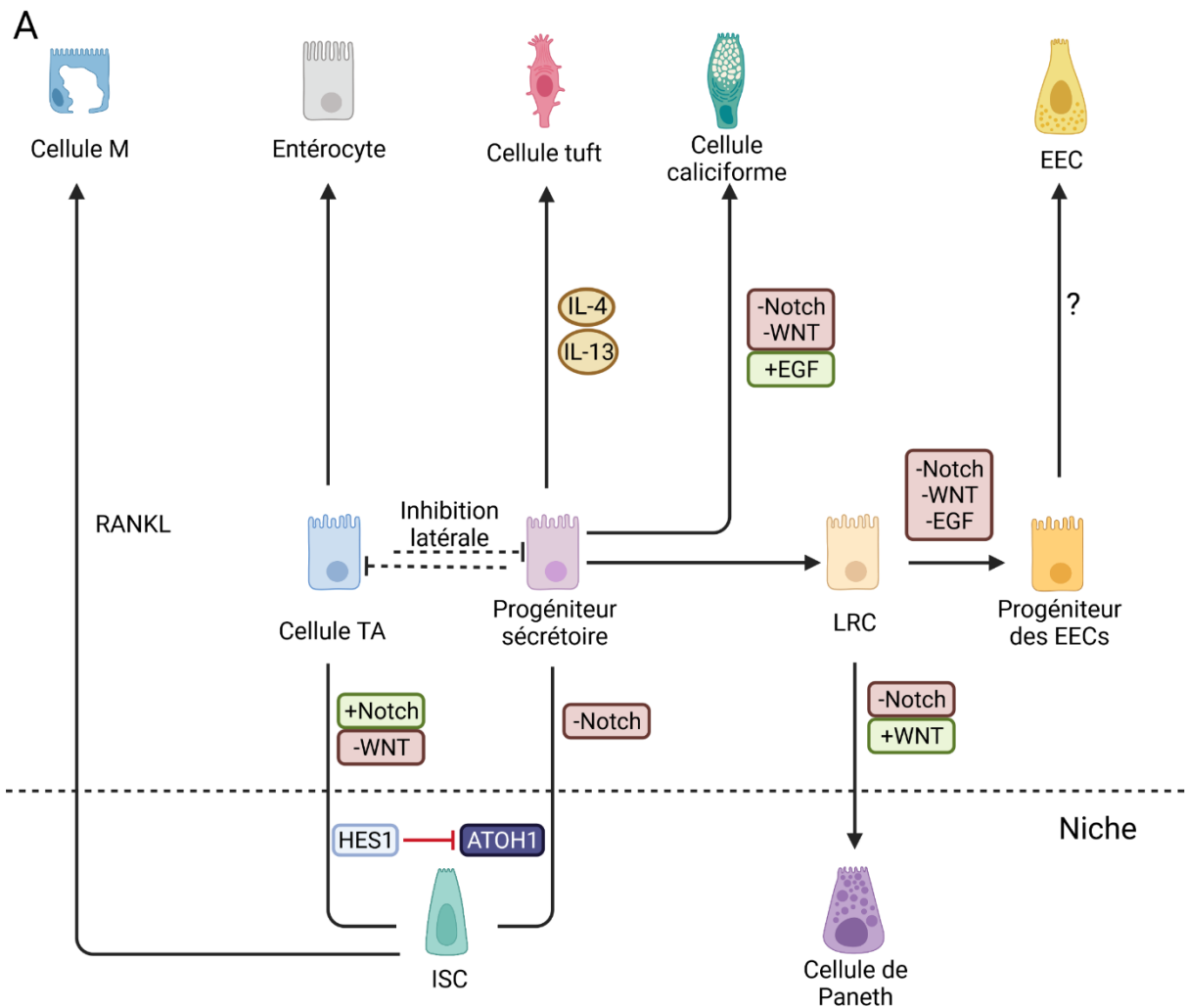
Contrairement à celle des cellules de Paneth, la différenciation des cellules caliciformes requiert l'absence de la signalisation WNT (Fig.5). Une haute activité de cette signalisation, causée par la perte d'APC (membre du complexe de dégradation de la β -caténine), conduit à la disparition des cellules caliciformes (Sansom et al., 2004). La perte inductible de la β -caténine n'a quant à elle aucun effet sur le nombre de ces cellules (Fevr et al., 2007). Les progéniteurs n'étant exposés ni à la signalisation Notch, ni à la signalisation WNT, sont destinés à devenir des cellules caliciformes. L'inhibition conjointe de ces signalisations permet d'enrichir fortement les organoïdes en cellules caliciformes (Yin et al., 2014).

La génération des cellules caliciformes est également dépendante de la signalisation MAPK. La perte de SHP2, régulateur de la signalisation MAPK, entraîne celle de cette signalisation et aboutit à la diminution du nombre de cellules caliciformes. Leur nombre peut être restauré par l'expression d'une protéine mutante ERK (agissant en aval de SHP2) gain de fonction (Heuberger et al., 2014) .

Le facteur de transcription SAM pointed domain ETS factor (SPDEF) est aussi impliqué dans la différenciation des cellules caliciformes (Fig.5). Ce facteur est dépendant de l'expression d'ATOH1, et sa sur-expression induit une augmentation du nombre de ces cellules dans le colon (Noah et al., 2010). Sa perte entraîne quant à elle une réduction du nombre de cellules caliciformes dans le colon et l'intestin grêle, ainsi qu'une altération de leur maturation. Ces observations s'appliquent également aux cellules de Paneth dans l'intestin grêle (Gregorieff et al., 2009).

Enfin, le facteur de transcription Krüppel-like factor 4 (KLF4), réprimé par la signalisation Notch via HES1 (Ghaleb et al., 2008) semble important pour la différenciation des cellules caliciformes. La délétion de *Klf4* réduit drastiquement le nombre de cellules caliciformes dans le colon, cependant cet effet est moins important dans l'intestin grêle (Katz et al., 2002).

La différenciation des cellules caliciformes est donc caractérisée par l'absence des signalisations WNT et Notch. Elle est dépendante de la voie MAPK, et de l'expression des facteurs SPEDF et KLF4.



Inspirée par *Beumer et Clevers, 2021*

Figure 5 : Spécification du lignage dans l'épithélium intestinal. (A) La différenciation des cellules filles des ISCs débute dès la sortie de la niche. La première décision est dépendante de l'accès à la signalisation Notch. Les cellules qui ne seront plus en contact avec des ligands Notch seront dirigées

vers le lignage sécrétoire, et exprimeront ATOH1. Les cellules toujours exposées à la signalisation Notch maintiennent l'expression de HES1, qui réprime l'expression de facteurs pro-sécrétoires, et deviendront des entérocytes matures après plusieurs divisions dans la zone d'amplification transitoire. Les cellules sécrétoires sécrètent des ligands Notch à destination des progéniteurs des entérocytes, établissant ainsi l'inhibition latérale. Les cellules sécrétoires exposées à un niveau suffisant de signalisation WNT à la sortie de la niche expriment EphB2/EphB3, et retourneront dans le fond de la crypte pour se différencier en cellules de Paneth. Les cellules insuffisamment exposées à la signalisation WNT se différencieront en cellules calciformes ou en EECs. Une signalisation MAPK réduite ainsi que la quiescence favorisent le destin entéro-endocrine. Les EECs et les cellules de Paneth dérivent du même des mêmes cellules progénitrices, les LRCs. Tous les sous-types d'EECs proviennent d'une même cellule progénitrice exprimant la neurogénine 3 (NEUROG3). De nombreux facteurs de transcription sont impliqués dans la spécification des cinq lignages d'EECs, mais les signalisations en amont de ces facteurs n'ont pour l'instant pas été identifiées. Les cellules tuft dérivent des cellules progénitrices sécrétoires, mais leur spécification ne dépend d'aucun des facteurs de transcription classiques de ce lignage. Ce sont les cytokines interleukines 13 et 4 (IL-13 et IL-4), sécrétées par les innate lymphoid cells 2 (ILC2) qui sont responsables de la différenciation des cellules tuft. La différenciation des cellules M est quant à elle dépendante de RANKL, sécrété dans le stroma. L'exposition à RANKL induit l'expression du facteur de transcription SPIB, nécessaire à la différenciation des cellules M. **(B)** Réseau d'interaction des facteurs de transcription connus régissant la spécification des cellules intestinales. Les flèches vertes représentent une activation, les rouges une inhibition.

e. Différenciation des cellules entéro-endocrines

Les cellules entéro-endocrines sont rares et présentent des phénotypes différents, leur étude est donc difficile. Plus de 20 hormones différentes sont produites par au moins cinq lignages entéro-endocrines.

Les cellules entéro-endocrines présentent des caractéristiques phénotypiques similaires à celles des neurones, ce qui a conduit à penser qu'elles dérivent de la crête neurale (Schonhoff et al., 2004). Les progéniteurs d'EECs sont définis par l'expression de neurogénine 3 (NEUROG3), un facteur de transcription bHLH, sous le contrôle de HES1 (Lee et al., 2001) (Fig.5). La délétion de *Neurog3* aboutit à la disparition des EECs (Jenny et al., 2002), tandis que sa sur-expression transgénique augmente leur nombre (López-Díaz et al., 2007). GFI1, un répresseur transcriptionnel à doigts de zinc, est également important pour la spécification des EECs. La perte de GFI1 augmente le nombre d'EECs, tout en diminuant celui des cellules calciformes et des cellules de Paneth (Shroyer et al., 2005). Ces cellules expriment GFI1, qui réprime NEUROG3. La perte de GFI1 induit donc la conversion des autres lignages sécrétoires en EECs (Bjerknes and Cheng, 2010).

La différenciation des EECs est indépendante de la voie WNT. En effet, la délétion ou stabilisation de la β -caténine n'a aucun effet sur la spécification de ces cellules (Wang et al., 2007). Les EECs, comme les cellules calciformes, requièrent l'absence des voies WNT et Notch, ce qui permet leur séparation des cellules de Paneth et du lignage absorbant. Les EECs sont par contre issues des LRCs, contrairement aux cellules calciformes (Buczacki et al., 2013). Les ISC ne proliférant plus, phénotype induit par l'inhibition de la voie EGF dans les organoïdes, se différencient préférentiellement en EECs (plutôt qu'en cellules calciformes) lorsque leur cycle cellulaire est réactivé (Basak et al., 2017). De plus, les cellules prolifératives de la crypte, y compris les cellules TA, se différencient en cellules calciformes lorsque la voie Notch est inhibée, ce qui suggère que la division inhibe la différenciation en EECs (Riccio et al., 2008; van Es et al., 2005). Il a été montré récemment que des kinases cycline-

dépendantes phosphorylent NEUROG3, ce qui stimule sa dégradation protéosomale (Azzarelli et al., 2017; Krentz et al., 2017). Cette régulation pourrait expliquer l'incompatibilité entre division cellulaire et destin entéro-endocrine.

f. Différenciation des cellules tuft

Les cellules tuft sont des cellules chimiosensorielles, sensibles à une variété de stimuli, comme les infections ou l'hypoxie. Ces cellules sont impliquées dans la régulation de l'immunité mucoale à travers l'action de récepteurs couplés aux protéines G. Leur absence perturbe la réponse immunitaire à l'infection intestinale par les helminthes par exemple (Gerbe et al., 2016). Elles dérivent de progéniteurs DLL1+, comme les autres cellules du lignage sécrétoire (van Es et al., 2012b). Cependant, la perte d'ATOH1 (pro-sécrétoire) ou de NEUROG3, SOX9 ou GFI1 n'affecte pas leur différenciation (Gerbe et al., 2011; Herring et al., 2018). Bien que leur différenciation soit indépendante d'ATOH1, l'inhibition pharmacologique de la voie Notch augmente leur nombre, comme celui des autres types cellulaires du lignage sécrétoire (VanDussen et al., 2012).

Le nombre de cellules tuft, comme celui des cellules caliciformes, augmente lors d'une infection par les helminthes (Grencis, 2015; Miller and Nawa, 1979; Spits and Cupedo, 2012). Cette augmentation est dépendante de la production d'interleukines 13 et 4 (IL-13 et IL-4) par les innate lymphoid cells 2 (ILC2) (Inaba et al., 2021) (Fig.5). Cette production par les ILC2 est elle-même stimulée par IL-25, qui est sécrétée par les cellules tuft en réponse à l'infection par les helminthes (Howitt et al., 2016; von Moltke et al., 2016). La spécification de cellules tuft requiert le facteur de transcription POU2F3, sa perte entraîne la disparition complète de ces cellules (Gerbe et al., 2016). L'expression de ce facteur est directement stimulée par IL-13 (Goto et al., 2019). SOX4 est également important pour la différenciation de cellules tuft, et agit indépendamment de ATOH1. La perte de SOX4 entraîne une diminution du nombre de cellules tuft et de ECCs (Gehart et al., 2019). De plus, supplémenter le milieu d'organoïdes avec IL-13 ou inhiber la voie Nocth augmente le niveau de ARNm *Sox4* (Gracz et al., 2018). La différenciation des cellules tuft est donc principalement dépendante de leur exposition aux IL-13 et IL-4, produites par les ILC2.

g. Différenciation des cellules M

Les cellules M recouvrent les tissus lymphoïdes muqueux, et sont impliquées dans le transport des antigènes et bactéries présents dans la lumière vers les cellules immunitaires. La génération des cellules M dépend de RANKL, une cytokine de la famille TNF (Dillon and Lo, 2019) (Fig.5). En effet, les souris RANKL^{-/-} n'ont plus qu'environ 2% du nombre total de cellules M (Knoop et al., 2009), et la supplémentation du milieu en RANKL suffit à induire la présence de cellules M dans des organoïdes (de Lau et al., 2012) et dans l'intestin de souris (Kanaya et al., 2012).

Les neurones intestinaux sécrétant le neuropeptide calcitonin related peptide (CGRP) ont aussi été identifiés comme des régulateurs de la spécification des cellules M. Ces neurones nocicepteurs ont un rôle de senseurs de pathogène et sécrètent du CGRP en réponse, ce qui module le nombre de cellules M. Perturber la fonction de ces neurones, et donc la régulation du nombre de cellules M, rend les souris plus sensibles à l'infection par *Salmonella* (Lai et al., 2020).

Le facteur de transcription SPIB agit en aval de RANKL, et la perte de ce facteur entraîne la disparition totale des cellules M. L'activation de lymphocytes T dans ces modèles est perturbée (de Lau et al., 2012; Kanaya et al., 2012). SPIB est également exprimé dans les cellules tuft (van Es et al., 2019).

h. Différenciation des entérocytes

Les entérocytes constituent le type cellulaire le plus représenté dans l'intestin, ainsi que le support de la fonction absorbative de l'intestin. Bien que ce soit l'absence d'activité de la voie Notch qui caractérise la différenciation vers le lignage sécrétoire, la signalisation Notch ne joue pas un rôle majeur dans la différenciation des entérocytes, en dehors de la répression du facteur pro-sécrétoire ATOH1 (Fig.5). En effet, l'inhibition de la voie Notch dans un modèle *Atoh1*^{-/-} n'a pas d'effet sur leur différenciation (Kazanjian et al., 2010; Kim and Shivdasani, 2011).

La différenciation des entérocytes est plutôt caractérisée par l'absence de signalisation WNT. L'inhibition de cette voie dans les organoïdes intestinaux conduit à une forte augmentation du nombre d'entérocytes (Mosa et al., 2018; Yin et al., 2014).

Les études sur les motifs de liaison à l'ADN ont identifié les facteurs hépatocyte nuclear factor 4 alpha/gamma (HNF4A/G) comme pouvant jouer un rôle dans la différenciation des entérocytes. Ce rôle a été confirmé par des expériences de délétion de *Hnf4g* seul ou des doubles délétions de *Hnf4g* et *Hnf4a*, dans des organoïdes comme dans des intestins murins. Ces délétions entraînent une forte réduction du nombre d'entérocytes (Chen et al., 2019; Lindeboom et al., 2018).

L'identité des entérocytes varie en fonction de leur position dans la villosité. Ceux les plus bas expriment des gènes anti-bactériens. En remontant la villosité, ils expriment séquentiellement des gènes impliqués dans l'absorption des glucides, des peptides, et des lipides (Moor et al., 2018). Il a été démontré récemment que cette zonation est dépendante du gradient de BMP, et que les cellules caliciformes expriment aussi différenciellement certains gènes en fonction de ce gradient (Beumer et al., 2022).

Les BMPs sont des facteurs de croissance de la famille des facteurs de croissance β . La signalisation implique la formation d'un complexe hétérotétramérique constitué de récepteurs de type 1 et de type 2 (Wang et al., 2014). Dans l'intestin, les principales BMPs (dont BMP2 et BMP4, reconnues par le récepteur BMPR1A), sont produites par les cellules mésenchymateuses, et leurs niveaux sont les plus élevés au niveau du haut de la villosité. Les cellules stromales, comme les myofibroblastes et les cellules musculaires lisses, entourant la base de la crypte, sécrètent des antagonistes de la signalisation BMP, comme les noggin, chordin et gremlin (Kosinski et al., 2007). La liaison de BMP2/4 à BMPR1A conduit à la formation du complexe avec BMPR2, la phosphorylation et l'activation des protéines SMAD, qui contrôlent la transcription génétique. (Wang et al., 2014). Les protéines SMAD phosphorylées recrutent des histones déacétylases, ce qui entraîne la répression des gènes clés des ISCs, restreignant ainsi le compartiment des ISCs au fond de la crypte (Qi et al., 2017).

L'identité des entérocytes dépend donc du gradient BMP, mais aussi de la répression du facteur pro-sécrétoire ATOH1 et de l'absence de signalisation WNT.

4. Modèles d'étude

a. Organismes modèles

Plusieurs organismes modèles sont utilisés pour étudier le développement, l'homéostasie, mais aussi les pathologies intestinales. Parmi les invertébrés, on trouve *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans*.

Le nématode *C. elegans* est étudié par de nombreux biologistes du développement. En effet, son lignage cellulaire a été bien caractérisé : il est stéréotypé et presque invariant d'un individu à un autre (Sulston et al., 1983). De plus, le nématode et ses embryons sont transparents, ce qui facilite son observation au microscope. Son intestin est constitué de 20 entérocytes, organisés en 9 anneaux intestinaux pour former un tube creux. Le nombre d'entérocytes est fixe, et ces cellules ne se divisent pas chez l'adulte.

L'épithélium intestinal de *Drosophila* est divisé en 6 régions anatomiques majeures, possédant des fonctions distinctes (Buchon and Osman, 2015). Cet épithélium est constitué de 4 types cellulaires : les cellules souches intestinales, les entéroblastes (cellules filles des cellules souches encore non différenciées), les cellules entéro-endocrines et les entérocytes. Les cellules souches sont responsables, comme chez les mammifères, du maintien de la population épithéliale. Leur activité est contrôlée par des grandes voies de signalisation, notamment la voie Notch et WNT (Wg chez *Drosophila*) (Jiang and Edgar, 2012).

Chez le poisson-zèbre adulte, l'épithélium intestinal est organisé en crêtes villositaires irrégulières avec des poches inter-villosités qui contiennent les cellules souches. Cinq types cellulaires matures sont également présents : entérocytes, cellules caliciformes, cellules entéro-endocrines, entérocytes endocytiques, ressemblant aux cellules M, et les cellules tuft (Thottacherry et al., 2023). Les cellules filles des cellules souches migrent vers le haut des crêtes en 5-10 jours. Le poisson zèbre est notamment utilisé pour étudier l'inflammation intestinale, la carcinogénèse, et l'interaction avec le microbiote (Brugman, 2016; Flores et al., 2020; Lobert et al., 2016).

La souris est utilisée comme modèle de l'intestin mammifère, dont la structure, la prolifération et la différenciation sont décrites en détails plus haut. De nombreux modèles ont été développés pour mimer les pathologies humaines, comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) ou le syndrome du côlon irritable (Accarie and Vanuytsel, 2020; Jiminez et al., 2015).

b. Modèles cellulaires

1. Modèles 2D

Plusieurs lignées cellulaires épithéliales intestinales existent, la plus utilisée étant la lignée cellulaire de l'adénocarcinome du côlon, ou Caco-2. Elle peut former une monocouche de cellules polarisées ressemblant à des entérocytes. Les cellules de la lignée HT-29 peuvent quant à elles se différencier en cellules productrices de mucus, ressemblant aux cellules caliciformes (Liévin-Le Moal and Servin, 2013). Cultiver ces lignées est simple et peu coûteux, cependant elles ne récapitulent pas la complexité de l'épithélium intestinal et ont une pertinence physiologique limitée. Leur culture sur

des supports perméables, comme un insert *transwell*, permet néanmoins d'étudier le transport de molécules et la perméabilité (Spinks et al., 2017).

Ces cellules peuvent également être cultivées sur d'autres structures qui reflètent mieux l'architecture de l'épithélium intestinal, comme un échafaudage poreux constitué de fibroïne de soie pouvant accueillir des myofibroblastes intestinaux (Chen et al., 2015). La technique du *gut-on-chip*, qui consiste à cultiver des cellules ou des explants sur un échafaudage poreux (généralement constitué de polydiméthylsiloxane (PDMS)), lui-même situé dans une cellule microfluidique, est aussi utilisée avec ces lignées (Kim et al., 2016a; Shin et al., 2020). Cette technique permet d'appliquer un flux permanent sur la couche épithéliale, mais aussi des contractions cycliques mimant le péristaltisme. Enfin, un dernier niveau de complexité peut être atteint avec la co-culture des cellules épithéliales avec d'autres types cellulaires, comme les cellules immunitaires (Lozoya-Agullo et al., 2017).

Néanmoins, ces lignées conservent leur nature tumorale et peuvent différer fortement, notamment en termes d'expression protéique, du tissu épithélial physiologique. Afin de combiner la pertinence physiologique avec les avantages de la culture 2D, des cultures en monocouche de cellules de patients ont été réalisées. Une des difficultés majeures de ces cultures est d'obtenir suffisamment de matériel biologique. Dès 1998, des cellules épithéliales intestinales (IEC) ont pu être isolées et cultivées à partir d'intestins grêles entiers de fœtus avortés (Perreault and Beaulieu, 1998). Les tissus provenant des résections sont également utilisés pour cultiver de plus grandes quantités de cellules intestinales épithéliales (Graves et al., 2014; Scott et al., 2016). Cependant ces tissus proviennent de patients touchés par différentes pathologies, et ne constituent pas de bons modèles pour étudier l'intestin sain. Une alternative consiste à mettre en culture des cellules issues de biopsies du côlon (Pedersen et al., 2000).

2. Modèles 3D

Les cellules LGR5+ ou les cryptes intestinales peuvent être isolées et cultivées dans du Matrigel, une substance mimant la matrice extracellulaire, dans un milieu riche en facteurs de croissance définis, et croître en organoïdes intestinaux (Sato, 2009). Ces organoïdes sont prolifératifs, récapitulent la structure intestinale, avec des cryptes et des villosités (Fig.6), et peuvent générer tous les types cellulaires intestinaux, suivant les conditions de culture (Beumer and Clevers, 2021).

Les organoïdes peuvent être générés à partir de tissu adulte (Sato et al., 2011c) ou par la différenciation des cellules souches pluripotentes induites (IPS) (Spence et al., 2011). Les organoïdes issus de cellules IPS présentent un phénotype fœtal et contiennent des cellules stromales, contrairement à ceux issus de tissu épithélial adulte (Spence et al., 2011; Watson et al., 2014). Il est cependant possible de leur faire acquérir un phénotype plus mature en les transplantant dans la capsule rénale d'une souris (Finkbeiner et al., 2015; Watson et al., 2014). Les organoïdes sont principalement d'origine épithéliale, ce qui présente des avantages comme des inconvénients. Cela permet de déchiffrer les mécanismes propres à l'épithélium, comme déterminer l'origine des sources de certains facteurs de niche par exemple (Farin et al., 2012). Néanmoins, ces organoïdes ne possèdent pas de compartiment stromal, de système immunitaire ou de système nerveux entérique, ce qui limite les possibilités d'études. La co-culture des organoïdes avec d'autres types cellulaires, comme les cellules lymphoïdes intra-épithéliales (Nozaki et al., 2016), permet de palier en partie cette limitation. Il est également possible de cultiver des organoïdes issus de cellules IPS avec des cellules des crêtes neurales, elles-aussi dérivées de cellules IPS, afin de former un système nerveux entérique autour du

tissu épithélial (Workman et al., 2017). La technique *gut-on-chip*, évoquée plus haut, peut également être pratiquée avec des cellules issues d'organoïdes (Kasendra et al., 2018; Shin and Kim, 2022).

Plusieurs études utilisent les organoïdes comme modèles de pathologies intestinales. Des organoïdes dérivés de patients atteints de mucoviscidose ont notamment été utilisés, via l'évaluation de gonflement induit par la forskolin, pour cibler des composés thérapeutiques pouvant restaurer la fonction du cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) (Dekkers et al., 2013). Des modèles d'organoïdes ont également été utilisés dans des études sur la rectocolite hémorragique (Dotti et al., 2017; Mora-Buch et al., 2016; Noben et al., 2017), permettant notamment d'identifier des gènes différenciellement exprimés dans les ISC en fonction du statut pathologique. Enfin, les organoïdes peuvent servir de modèles pour des pathologie génétiques, comme la maladie des inclusions microvillositaires (MVID) (Mosa et al., 2018; Wiegerinck et al., 2014).

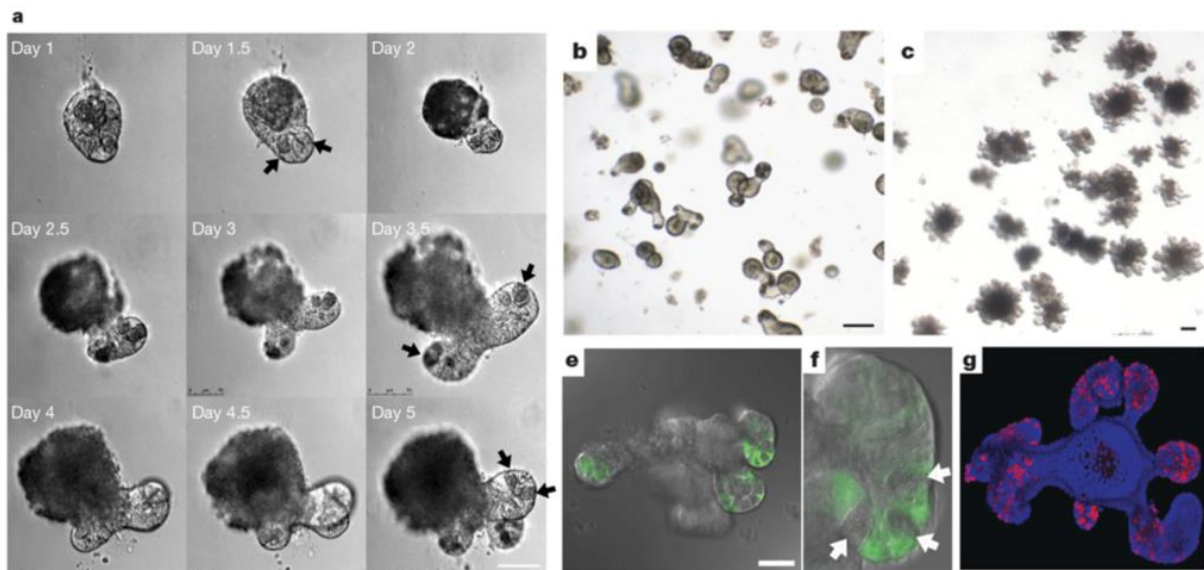


Figure 6 : Formation et morphologie des organoïdes intestinaux. Images tirées de Sato et al., 2009. **(A)** Croissance d'une crypte isolée mise en culture en cours du temps. Les flèches montrent des cellules de Paneth contenant des granules. **(B,C)** Formation d'organoïdes à partir de cryptes isolées, au jour 5 **(B)** et au jour 14 **(C)**. **(E,F)** Organoïde formé après 14 jours de culture de cellules LGR5-GFP^{hi}. Les cellules de Paneth sont indiquées par les flèches. **(G)** Organoïdes cultivé avec l'analogue de la thymidine EdU (rouge) pendant 1h. Barre d'échelle : 50µm.

3. Explants

Des biopsies intestinales peuvent également être mises en culture. Ces explants peuvent être utilisés pour étudier la fonction barrière de l'intestin en utilisant les chambres de Ussing (Herrmann and Turner, 2016), la réponse aux cytokines (Jarry et al., 2016) ou à l'exposition à des bactéries, pathogéniques ou non (Tsilingiri et al., 2012). Une étude a quant à elle développé un modèle d'explant murin cultivé sur un dispositif microfluidique organotypique (Richardson et al., 2020). Malheureusement, la durée de vie des explants en culture est courte, ce qui limite les possibilités d'expérimentation.

II. Polarité des cellules épithéliales intestinales

1. Organisation polarisée des cellules épithéliales intestinales

La couche épithéliale intestinale est soumise à des agressions chimiques, mécaniques et biologiques, tout en devant maintenir sa fonction de barrière et d'absorption des nutriments. Pour exercer leurs fonctions, les cellules épithéliales doivent être polarisées, c'est-à-dire posséder un pôle apical et un pôle basolatéral distincts. Leurs compositions protéiques et lipidiques sont donc différentes, ce qui permet la spécialisation de leurs fonctions. Je m'intéresserai principalement aux entérocytes dans cette partie, car ce sont les cellules les plus abondantes de l'épithélium intestinal, mais également les plus polarisées.

a. Pôle apical

La membrane plasmique des IECs est une bicouche lipidique. La couche interne est riche en phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2), tandis que la couche externe contient des glycosphingolipides et du cholestérol. Cette couche est capable de former des micro-domaines, appelés radeaux lipidiques, qui constituent des zones privilégiées pour l'activité de certaines protéines qui y sont intégrées (Danielsen and Hansen, 2008).

1. Bordure en brosse

Les entérocytes présentent une bordure en brosse au niveau de leur pôle apical. Celle-ci est constituée d'extrusions, nommées microvillosités, disposées de manière très ordonnée (Crawley et al., 2014b). Elles permettent d'agrandir fortement la surface apicale, facilitant donc l'absorption et la lutte contre les pathogènes (Maroux et al., 1988; Shifrin and Tyska, 2012). Chaque microvillosité est constituée de filaments d'actine, connectés à plusieurs protéines dont la villine, la plastine, l'espine et l'epidermal growth factor receptor kinase substrate 8 (EPS8) (Crawley et al., 2014b; Heintzelman and Mooseker, 1992; Revenu et al., 2012). Les trois premières relient les filaments d'actine en faisceau, la dernière permettrait de réguler la taille des microvillosités (Tocchetti et al., 2010). L'ancrage de ces microvillosités dans le réseau terminal d'actine subapical se fait via la myosine II (Heintzelman and Mooseker, 1992). Enfin, la liaison entre les filaments d'actine au cœur des microvillosités et la membrane plasmique se fait quant à elle grâce à la myosine IA (Mazerik and Tyska, 2012), la myosine VI (Hegan et al., 2012) et l'eitrine (Saotome et al., 2004) (Fig.7).

Les microvillosités sont également stabilisées entre elles par le complexe d'adhésion intermicrovillositaire (IMAC), formé de deux protocadhérines (CDHR2 et CDHR5) et leurs partenaires cytoplasmiques. La perte de CDHR2 ou de ses partenaires entraîne une désorganisation générale de la bordure en brosse, soulignant l'importance de l'IMAC (Crawley et al., 2014a; Weck et al., 2016).

Pour pouvoir se lier aux filaments d'actine et à la membrane plasmique, l'eitrine doit être phosphorylée. En effet, dans le cytoplasme, l'eitrine possède une conformation « fermée », permise par la liaison de son domaine FERM en N-ter avec son domaine C-ERMAD en C-ter. La liaison du domaine FERM avec les lipides PIP2 et la phosphorylation de la Thréonine 567 induisent un

changement de conformation de l'ézrine, ce qui permet son interaction avec les filaments d'actine (Crawley et al., 2014b; Sauvanet et al., 2015).

La perte des protéines connectant les filaments d'actine ou de celles les liant au réseau terminal ou à la membrane plasmique aboutit à des défauts variés de formation de la bordure en brosse, comprenant le raccourcissement des microvillosités (Grimm-Günter et al., 2009; Tocchetti et al., 2010), la diminution de leur nombre (Saotome et al., 2004) ou la fusion des microvillosités adjacentes (Hegan et al., 2012; Tyska et al., 2005).

2. Réseau terminal

Comme évoqué plus haut, les filaments d'actine présents dans les microvillosités s'ancrent dans une structure subapicale du cytosquelette. Celle-ci est constituée par les racines des faisceaux d'actine provenant des microvillosités, et par des filaments orientés perpendiculairement à ceux-ci (Hirokawa et al., 1982; Mooseker and Tilney, 1975; Mukherjee and Staehelin, 1971). Cette structure se nomme le réseau terminal, et différentes couches de cytosquelette la composent. Elle procure une stabilisation structurale et mécanique de la bordure en brosse (Fath et al., 1993).

Les racines des filaments d'actine provenant des microvillosités sont reliées entre elles par des réseaux de spectrine, tropomyosine et myosine II. Ces racines sont également ancrées dans le réseau de filaments d'actine perpendiculaire aux microvillosités. En dessous de celui-ci, se trouve un réseau de filaments intermédiaires (Fath et al., 1993), composé de polypeptides de kératine (Fig.7). Ceux-ci incluent : kératine 8 (KRT8) (kératine de type II) et KRT18, KRT19, KRT20 (kératines de type I). KRT18 est exprimé préférentiellement dans les cryptes, contrairement à KRT20 qui l'est dans la villosité (Coch and Leube, 2016). Les kératines de type I s'associent entre elles pour former le premier groupe d'assemblage. Elles se lient ensuite aux kératines de type II pour former *in fine* des hétérodimères, qui s'associent antiparallèlement pour former des tétramères (Coch and Leube, 2016). Les étapes d'assemblage suivantes sont mal connues. Huit tétramères s'associent latéralement pour former un filament d'environ 60 nm. Ensuite, ces filaments s'attachent longitudinalement, s'allongeant pour former des filaments intermédiaires de 10 nm de diamètre (Coch and Leube, 2016).

La perte de KRT8 peut provoquer un prolapsus anal et une hyperplasie colorectale, avec diarrhée et inflammation (Baribault et al., 1994). L'absence de kératines pourrait conduire à une sensibilité accrue aux antigènes luminaux (Dignass et al., 2004; Shen and Turner, 2006). Cette absence a d'ailleurs été associée à la compromission de l'intégrité de la barrière intestinale (Zupancic et al., 2014).

b. Jonctions bicellulaires

Les jonctions cellulaires sont essentielles à l'homéostasie des tissus épithéliaux. Elles permettent notamment d'assurer le maintien de la barrière de perméabilité et de la barrière mécanique. Elles garantissent l'intégrité de l'épithélium et jouent également des rôles dans la régulation de la prolifération et de la migration cellulaire.

1. Jonctions serrées (TJ)

Chez les vertébrés, les jonctions serrées sont les plus apicales, situées à l'apex des membranes plasmiques latérales. Elles forment une ceinture autour de la cellule contrôlant la diffusion paracellulaire, soit la diffusion des ions et des solutés entre les cellules adjacentes.

Elles sont composées de deux familles de protéines transmembranaires, les claudines et les occludines, qui forment des dimères homotypiques (Van Itallie and Anderson, 2014) (Fig.7). Les clusters linéaires de claudines forment les brins caractéristiques des TJs, observables à la microscopie électronique *freeze-fracture* (Furuse et al., 1998). L'assemblage de ces brins entre deux cellules adjacentes produit un réseau complexe de pores, à travers lequel diffuseraient les ions et les solutés (Van Itallie and Anderson, 2006; Zihni et al., 2016). La régulation du passage spécifique de certains ions, en fonction de leur taille et de leur charge, se fait par la présence de différents acides aminés présents dans les domaines extracellulaires des claudines. La diffusion paracellulaire varie donc en fonction des types de claudines exprimés (Van Itallie and Anderson, 2006).

Le rôle des occludines est peu défini. En effet, les souris *occludine*^{-/-} sont viables, ne présentent pas de défauts morphologiques au niveau des TJs ni de défauts de perméabilité au niveau de la barrière intestinale (Saitou et al., 1998; Saitou et al., 2000). Les occludines semblent cependant jouer un rôle dans la régulation du flux des macromolécules larges (Al-Sadi et al., 2011).

Les claudines et les occludines se lient à des protéines échafaudage cytoplasmiques, elles-mêmes liées au cytosquelette d'actine (Fanning et al., 2012; Umeda et al., 2004; Van Itallie et al., 2009). Ces protéines comprennent une famille à domaine PSD-95/discs-large/zonula occludens-1 (PDZ), les protéines zonula occludens (ZO) ZO-1, ZO-2, ZO-3 ; ainsi que la cinguline et des protéines additionnelles. Les protéines ZO-1 et ZO-2 interagissent avec les claudines, les occludines (Fig.7), entre elles, mais également avec les filaments d'actine (Furuse, 2010). La perte de ces protéines provoquent une létalité embryonnaire (Katsuno et al., 2008; Xu et al., 2008). Enfin, ZO-1 se lie à l' α -caténine et à l'afadine, des protéines des jonctions adhérentes (AJ) (Itoh et al., 1997; Müller et al., 2005).

Les junctional adhesion molecules (JAM) sont des membres de la superfamille des immunoglobulines (Ebnet et al., 2004). Elles se localisent au niveau des contacts cellulaires et interagissent avec les protéines des TJs et des AJs (Monteiro et al., 2013). La perte de JAM-A induit une hyperprolifération (Nava et al., 2011), des altérations de la barrière épithéliale, et une inflammation (Laukoetter et al., 2007).

Les jonctions serrées sont donc formées de protéines transmembranaires, les claudines et les occludines, qui forment des contacts entre les cellules, créant une barrière sélective. Les JAM quant à elles stabiliseraient les jonctions serrées. Ces différentes protéines sont liées aux protéines cytoplasmiques ZO-1, ZO-2 ou ZO-3, qui possèdent une grande diversité de protéines partenaires, et permettent notamment la liaison au cytosquelette cortical.

2. Jonctions adhérentes (AJ)

Les AJs génèrent et maintiennent l'adhésion cellulaire, régulent l'organisation du cytosquelette d'actine sous-jacent (Takeichi, 2014), et jouent un rôle dans la prolifération cellulaire, notamment via le β -caténine, impliquée dans la voie WNT canonique. Bien que fortement enrichies au niveau du pôle

apical, les protéines composant les jonctions adhérentes sont localisées tout le long de la membrane latérale.

Les cadhérines classiques, comme la E-cadhérine, sont des protéines transmembranaires qui interagissent de façon homotypique avec celles des cellules adjacentes via une liaison *trans*- de leur premier domaine extracellulaire (Shapiro and Weis, 2009). La perte de fonction des cadhérines dans l'intestin est associée avec des perturbations des contacts cellulaires, mais aussi de la migration des entérocytes et une perte de leur polarité (Hermiston and Gordon, 1995). La E-cadhérine forme un complexe ternaire avec la β -caténine et l' α -caténine, via des liaisons avec son domaine cytoplasmique (Fig.7). L' α -caténine se lie ensuite à la F-actine, de façon dépendante des forces mécaniques (Buckley et al., 2014). Ce complexe peut aussi se lier aux microtubules (Meng et al., 2008). La p120-caténine se lie également à l'E-cadhérine et participe à la régulation de sa fonction (Anastasiadis and Reynolds, 2000), par exemple en contrôlant son renouvellement (Davis et al., 2003). La vinculine participe au renforcement des contacts adhésifs cellule-cellule. Elle est recrutée au niveau des AJs, et se lie à la β -caténine (Peng et al., 2010).

Les nectines sont des protéines transmembranaires se liant aux afadines via leur domaine extracellulaire. L'afadine peut quant à elle interagir avec l' α -caténine (Takai et al., 2008). Malgré cette interaction, il semble que les AJs soient formées de clusters de nectines et de cadhérines indépendants (Indra et al., 2013) (Fig.7).

3. Desmosomes

Les interactions cellule-cellule dépendent également des desmosomes, un autre type de jonctions cellulaires, présentes sur toute la membrane latérale (Fig.7). Les contacts adhésifs sont médiés par les cadhérines desmosomales. Les deux isoformes exprimés dans l'intestin sont DSC2 et DSG2 (Holthöfer et al., 2007). Via leur domaine cytoplasmique, celles-ci s'associent avec la plakoglobine et la plakophiline, qui interagissent avec la desmoplakine, ce qui permet d'ancrer le complexe dans les filaments intermédiaires (Kowalczyk and Green, 2013). Les desmosomes jouent un rôle dans le maintien de la barrière intestinale. En effet, la perte de DSG2 entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale ainsi que d'une diminution de l'expression de composants des TJs (Gross et al., 2018).

c. Pôle basolatéral

La membrane basolatérale est riche en PIP3, et joue un rôle crucial dans les interactions avec les cellules adjacentes, ainsi qu'avec la membrane basale.

Les interactions avec la membrane basale se font quant à elles grâce aux hémidesmosomes, présents à la base des cellules épithéliales (Fig.7). L'intégrine $\alpha 6 \beta 4$, protéine transmembranaire, se lie à la laminine-332 présente dans la membrane basale. Via son domaine cytoplasmique, l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ est aussi liée à la plectine, qui se lie en retour aux kératines (Stutzmann et al., 2000). La perturbation du contact entre les IECs et lame basale, provoquée par la perte de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$, conduit au développement de lésions inflammatoires évoluant en dysplasie puis en carcinome (Arcangelis et al., 2017).

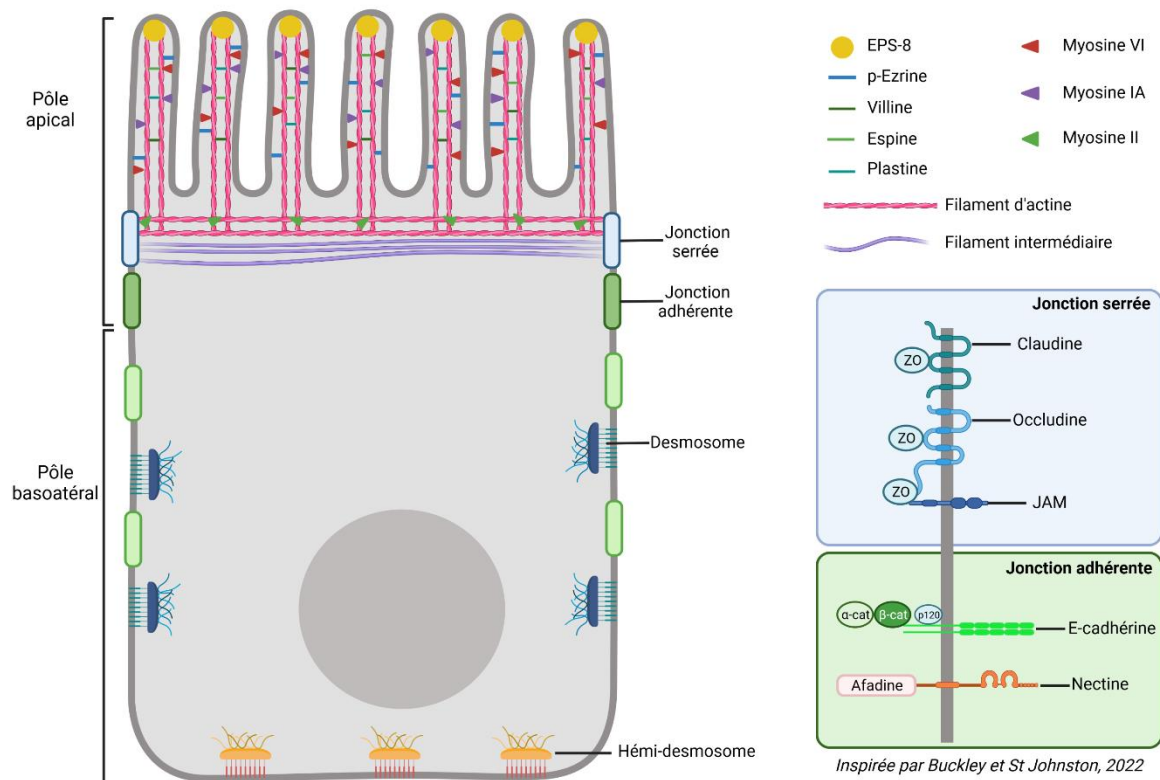


Figure 7 : Organisation d'une cellule épithéliale intestinale polarisée. Les cellules intestinales épithéliales présentent un pôle apical et basolatéral distincts. Les entérocytes possèdent une bordure en brosse constituée de microvillosités au niveau du pôle apical. Les filaments d'actine constituant ces microvillosités sont reliés entre eux par la villine, l'espine et la plastine. L'EPS-8 est également connectée au filaments d'actine et est localisée à l'apex des microvillosités. La phospho-ezrine, la myosine VI et la myosine IA sont quant à elles responsables de la liaison des filaments d'actine avec la membrane. En dessous des microvillosités se trouve le réseau terminal, constitué de filaments d'actine et de filaments intermédiaires. Les filaments d'actine des microvillosités s'ancrent dans ce réseau grâce à la myosine II. Les jonctions serrées sont constituées de protéines transmembranaires, les claudines et les occludines, organisées en homodimères. Celles-ci sont liées à des protéines échafaudage de la famille ZO. Les protéines transmembranaires JAM peuvent aussi se lier aux protéines ZO. Les jonctions adhérentes sont également constituées de protéines transmembranaires, l'E-cadhérine et les nectines. L'E-cadhérine forme un complexe avec l'α-caténine, la β-caténine et la p120-caténine. Les nectines sont quant à elles liées aux afadines. Ces complexes sont très enrichis au niveau apical, mais sont présents tout le long de la membrane latérale. Les desmosomes sont quant à eux présents dans la zone sous-jacent aux jonctions adhérentes. Enfin, les héli-desmosomes sont localisés au niveau de la membrane basale et médient le contact avec la lame basale.

2. Facteurs de polarité

L'organisation polarisée des IECs nécessite l'action de protéines appelées facteurs de polarité. Ceux-ci sont nécessaires aussi bien pour la mise en place de la polarité durant le développement, que pour son maintien une fois qu'elle est établie.

a. Pôle apical

L'identité du pôle apical est définie par un groupe de facteurs de polarité apicale : l'*atypical protein kinase C* (aPKC), CDC42, PAR-6 et le complexe Crumbs (Fig.8). Ce complexe est constitué de la protéine transmembranaire Crumbs et de la protéine d'échafaudage PALS1 qui recrute PATJ et LIN7 (Assémat et al., 2008). L'absence de ces protéines, exceptées PATJ et LIN7, conduit à la perte du domaine apical, donc de la polarisation, dans l'épithélium embryonnaire de *Drosophila* (Hutterer et al., 2004; Müller and Wieschaus, 1996).

aPKC est considéré comme étant l'effecteur principal de l'identité apicale, étant donné qu'il phosphoryle les facteurs latéraux et jonctionnels PAR-3, Lethal (2) giant larvae (LGL), PAR-1 et LULU2 (Yurt chez les invertébrés), ce qui les exclue du domaine apical (Betschinger et al., 2003; Nagai-Tamai et al., 2002; Suzuki et al., 2004; Yamanaka et al., 2003) (Fig.8). L'activité d'aPKC est dépendante des facteurs de polarité les plus apicaux. Tout d'abord, il forme un complexe avec PAR-6, ce qui est essentiel pour son activation et sa localisation (Suzuki et al., 2002). Cette liaison permet de mettre fin à la répression de son domaine actif (Graybill et al., 2012), bloqué par son domaine pseudo-substrate (PS). Ce domaine, une fois exposé par l'interaction avec PAR-6, permet la liaison d'aPKC à PI4P et PIP2 (Dong et al., 2020). L'activation complète d'aPKC requiert également CDC42 et Crumbs. PAR-6 se lie à CDC42-GTP, ce qui permet le recrutement du complexe aPKC-CDC42 à la membrane apicale (Hutterer et al., 2004). La liaison à CDC42-GTP change ensuite la structure du domaine PDZ de PAR-6, qui reconnaît désormais Crumbs. Cela conduit à l'activation totale d'aPKC et sa rétention au niveau de la membrane apicale (Whitney et al., 2016).

Cependant le rôle de Crumbs dans l'activation d'aPKC reste flou. Il n'est en effet pas essentiel dans toutes les cellules pour la formation du pôle apical. Par exemple, la délétion simultanée des trois orthologues de Crumbs chez *C. elegans* n'a pas d'effet sur la viabilité ou la polarité cellulaire (Waaijers et al., 2015). De plus, des données récentes en imagerie de super-résolution dans des cellules Caco-2 montrent que seulement une minorité de protéines CRB3 colocalise avec PAR-6 ou aPKC (Mangeol et al., 2022). Il semblerait que Crumbs ne soit pas nécessaire à l'activation d'aPKC, même si son action pourrait être redondante avec celle d'un autre facteur, ou seulement requise pour une activité maximale d'aPKC (Buckley and St Johnston, 2022).

aPKC est essentiel pour empêcher l'invasion du pôle apical par des facteurs latéraux, mais peu de ses substrats appartiennent à ce pôle. Parmi eux, JAM-A et l'occludine, qu'il phosphoryle, ce qui promeut la maturation des jonctions et la mise en place de la barrière de perméabilité (Iden et al., 2012; Jain et al., 2011).

b. Jonctions latérales apicales

La formation des jonctions serrées semble requérir PAR-3 (Chen and Macara, 2005; Hirose et al., 2006; Horikoshi et al., 2009; Ooshio et al., 2007). Le recrutement de PAR-3 aux jonctions serrées est dépendant de la présence redondante de ZO-1, ZO-2 et de l'afadine (Sapone et al., 2011). Ce recrutement est peut-être indirect, car ZO-1 et ZO-2 sont également requises pour recruter d'autres protéines d'échafaudage. Celles-ci s'associent ensuite à un complexe dépendant de PAR-3 pour son recrutement aux jonctions serrées (Matsuzawa et al., 2021; Sottocornola et al., 2010). Des résultats provenant de travaux sur la séparation de phase suggèrent que PAR-3 et les protéines ZO agissent de concert pour former des condensats à phases séparées qui organisent les jonctions serrées et les lient

au cytosquelette (Buckley and St Johnston, 2022) (Fig.8). Enfin, PAR-3 positionne et stabilise les jonctions apicales en ancrant les JAMs. Il se lie aux JAM 1-3, ainsi qu'aux nectines (Ebnet et al., 2001; Ebnet et al., 2003; Ooshio et al., 2007; Takekuni et al., 2003).

c. Pôle basolatéral

Les facteurs de polarité principaux définissant le pôle basolatéral sont : Scribble (SCRIB), Discs Large (DLG) et LGL ; souvent appelés le complexe Scribble (Fig.8). Leur rôle est principalement de servir d'antagonistes aux facteurs de polarité apicale. Cet antagonisme est souvent décrit comme un antagonisme entre LGL et aPKC. Si aPKC exclue LGL du domaine apical en le phosphorylant, le rôle de LGL vis-à-vis d'aPKC est plus flou (Buckley and St Johnston, 2022) (Fig.8). De nombreux paralogues de SCRIB (Scribble, Erbin, Lano, Densin), de DLG (DLG1-5) et de LGL (LGL1, LGL2) sont présents dans les cellules mammifères, ce qui soulève la question de la redondance de leurs fonctions en ce qui concerne la polarité apico-basale. En effet, la perte de protéines seules n'a pas d'effets aussi importants que ceux observés lors de la perte de facteurs de la polarité apicale (Ivanov et al., 2010; Qin et al., 2005; Russ et al., 2012; Sripathy et al., 2011). Les mutants pour *Scribble* ont d'abord été identifiés car ils perturbent la polarité planaire, qui est orthogonale à la polarité apico-basale, conduisant à des défauts de morphogénèse variés (Montcouquiol et al., 2003; Murdoch et al., 2003; Yates et al., 2013). Enfin, Erbin et SCRIB peuvent avoir un rôle de suppresseurs de tumeur en réprimant la voie de signalisation ERK/MAPK (Godde et al., 2014; Stephens et al., 2018; Stevens et al., 2018).

Contrairement aux simples délétions, la perte concomitante de Scribble, Erbin et Lano conduit à de fortes perturbations de la polarité apico-basale dans des cellules de carcinome de colon (Choi et al., 2019). La double délétion de *Lgl1* et *Lgl2* a des effets plus faibles, suggérant un rôle mineur dans la polarité de ces cellules. Le rôle des facteurs de polarité basolatéraux, notamment leur interaction avec aPKC, reste donc à éclaircir.

En plus du complexe Scribble, un autre facteur contribue à définir l'identité du pôle basolatéral : PAR-1, restreint au niveau latéral, où il joue un rôle dans l'organisation et la stabilisation des matrices de microtubules (Böhm et al., 1997; Doerflinger et al., 2003) (Fig.8). Chez *Drosophila*, il restreint l'étendue latérale de PAR-3 (Benton and Johnston, 2003). D'autres facteurs importants dans l'identité du domaine basolatéral ont été identifiés chez *Drosophila*, comme Yurt (Laprise et al., 2006), les protéines de jonction septées et RhoGAP19D, une CDC42GAP (Fic et al., 2021). Ceux-ci contribuent aux interactions antagonistiques avec les facteurs de polarité apicale.

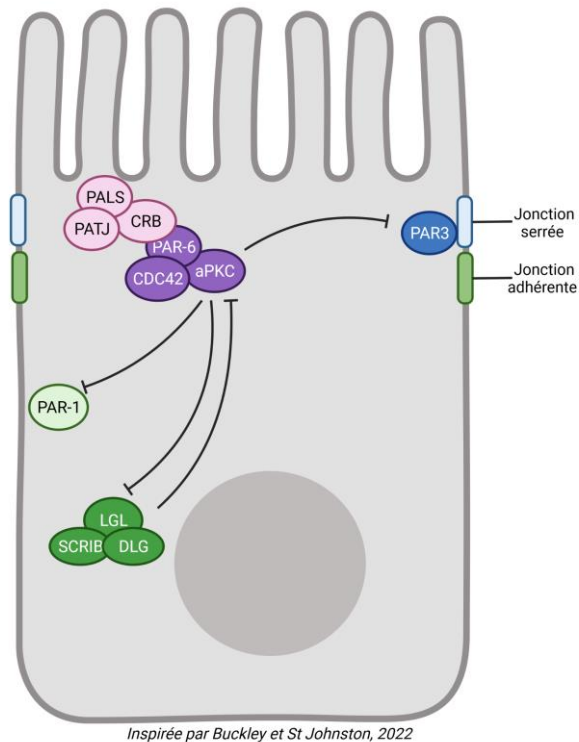


Figure 8 : Localisation des facteurs de polarité et interactions antagonistiques. Le pôle apical est défini par la présence du complexe aPKC-PAR-6-CDC42 et du complexe CRB, constitué de CRB, PALS et PATJ. Ces deux complexes interagissent ensemble, via liaison de CRB avec PAR-6. PAR3 est localisé au niveau des jonctions serrées, et participe à la formation et stabilisation des jonctions apicales. Le pôle basolatéral est quant à lui défini principalement par le complexe LGL-SCRIB-DLG. PAR-1 fait néanmoins également partie des facteurs présents au pôle latéral. aPKC restreint la localisation de LGL, PAR-1 et PAR-3 en les phosphorylant. Le complexe LGL-SCRIB-DLG est décrit comme antagoniste d'aPKC, mais les mécanismes par lesquels cet antagonisme prend place restent flous.

3. CDC42

a. Description

La petite GTPase *cell division control protein 42-homolog* (CDC42) a été découverte chez la levure et appartient à la famille des petites protéines se liant à la GTP (20-30 kDa) (Adams et al., 1990; Johnson and Pringle, 1990). Elle fait partie de la famille des Rho GTPases, qui comprend 20 membres, dont les RhoA et RacGTPases (Hall, 2012). La caractéristique principale de membres de cette famille est l'alternance entre un état « activé » lorsqu'ils sont liés à la GTP, et un état « inactivé » lorsqu'ils sont liés à la GDP. Ces protéines sont donc considérées comme des « switches moléculaires », donc l'activation/désactivation peut être contrôlée spatialement et temporellement (Diekmann et al., 1991; Hart et al., 1991). Leur activation spatiale est contrôlée par les facteurs d'échange de guanine (GEF), les protéines activatrices des GTPases (GAP) et les protéines inhibitrices de la dissociation du GDP (GDI). Les GEFs activent les petites GTPases en catalysant l'échange du GDP par un GTP. A l'inverse, les GAPs se lient à la forme active des petites GTPases et stimulent la réaction d'hydrolyse du GTP, les

ramenant à leur forme inactive. Enfin, les GDI se lient au Rho GTPases dans le cytoplasme pour les maintenir dans leur forme inactive, liées au GDP.

Les premières fonctions des Rho GTPases ont été identifiées en 1992, et concernaient le cytosquelette d'actine. Il a été montré que l'introduction dans des fibroblastes de protéines mutantes Rho et Rac, actives de façon constitutive, induisait la formation de fibres de stress (constituées de filaments d'actine et de myosine contractiles) et de protrusions riches en actine, respectivement (Ridley and Hall, 1992; Ridley et al., 1992). Quelques années plus tard, le rôle de CDC42 dans la formation de filopodes, des protrusions en forme de doigts, riches en actine, a été découvert (Nobes and Hall, 1995).

En plus de jouer un rôle dans une grande variété de processus cellulaires, CDC42 est un acteur crucial dans la mise en place de la polarité. Je détaillerai plus bas ses différents rôles spécifiques, mais je ne reviendrai pas sur l'axe aPKC/PAR-6/CDC42 décrit plus haut.

b. Morphogénèse de la membrane apicale

CDC42 participe à la morphogénèse de la membrane apicale. Dans les cellules Caco-2, cette fonction est liée au cytosquelette d'actomyosine et à la CDC42 GEF Dbl3 (Zihni et al., 2013). Dans ces cellules, Dbl3 est recruté à la membrane apicale via sa liaison à l'ezrine, qui fait le lien entre le cytosquelette d'actomyosine et la membrane plasmique. La signalisation CDC42-Dbl3 entraîne l'activation de MRCK, qui participe à la régulation du cytosquelette d'actomyosine via l'activation de la myosine II (Zihni et al., 2017). L'activation de la myosine II par MRCK au niveau du pôle apical participe à la ségrégation d'aPKC-PAR-6 et de PAR-3, définissant ainsi le domaine apical. La contractilité de l'actomyosine apicale induite par MRCK est renforcée par la diminution de la contractilité de l'actomyosine jonctionnelle RhoA-dépendante, via l'action d'aPKC-PAR6. Cela induit la polarisation de déterminants de la bordure en brosse, comme l'ezrine et NHERF-1, dans des cellules MDCK (Zihni et al., 2017). Les mécanismes régulant la distribution de CDC42 au niveau de MRCK ou aPKC-PAR-6 ne sont pas clairs, mais dépendent probablement de la GEF associée à CDC42.

c. Maturation et assemblage des jonctions

1. Axe CDC42-PAK4

La *P21-activated kinase 4* (PAK4, Mbt chez *Drosophila*) est un effecteur de CDC42 nécessaire à la maturation des jonctions, chez *Drosophila* comme chez les vertébrés (Jin et al., 2015; Wallace et al., 2010; Walther et al., 2016). PAK4 fait partie de la famille des PAK de type II, celles-ci sont impliquées dans la régulation de la dynamique du cytosquelette, la localisation et le renouvellement des composants des AJs (Pirraglia et al., 2010; Tay et al., 2010; Walther et al., 2016). CDC42 se lie au domaine Cdc42 and Rac-interactive binding motif (CRIB) de PAK4, ce qui régule sa localisation. La liaison de CDC42 à PAK4 promeut sa localisation au niveau des AJs dans les cellules bronchiques humaines (Wallace et al., 2010), chez le poisson zèbre (Selamat et al., 2015), ainsi que dans les cellules épithéliales de *Drosophila* (Schneeberger et al., 2018). PAK4 peut également réguler la dynamique de l'actine, via l'activation de LIMK et de la cofiline (Nekrasova and Minden, 2012), ce qui pourrait aussi stimuler la maturation jonctionnelle et la morphogénèse membranaire. De plus, PAK4 peut

phosphoryler PAR-6B, ce qui favorise sa liaison avec le mitogen-activated protein kinase organizer 1 (MORG1), et donc facilite le recrutement d'aPKC-PAR-6 par CRB3 (Hayase et al., 2013; Jin et al., 2015). La phosphorylation de PAR-6 par Mbt n'est cependant pas conservée chez *Drosophila* (Walther et al., 2016). PAK4 peut néanmoins phosphoryler Armadillo (homologue de la β -caténine chez *Drosophila*), processus conservé dans les cellules humaines (Menzel et al., 2008; Selamat et al., 2015). Les mécanismes sous-tendant l'action de PAK4 durant la maturation des jonctions sont encore mal compris, cependant des travaux chez *Drosophila* ont fait le lien entre la fonction de Mbt dans la maturation des AJs et la petite GTPase Rap1 et son effecteur Canoe (afadine chez les vertébrés) qui se lie à la F-actine (Walther et al., 2018). La signalisation Rap1-Canoe est également impliquée dans le trafic de l'E-cadhérine dans les cellules MDCK (Hogan et al., 2004).

2. Rôle des GEFs et GAPs

Un des régulateurs majeurs de CDC42 dans les cellules épithéliales est la GAP SH3BP1, qui joue un rôle dans la formation des jonctions dans des cellules Caco-2 et dans des sphéroïdes (Elbediwy et al., 2012). SH3BP1 forme un complexe avec la paracinguline, partenaire de ZO-1, et la protéine échafaudage CD2AP, qui de son côté régule la dynamique de la F-actine (Gauthier et al., 2007; Tang and Briehner, 2013). De plus, SH3BP1 colocalise avec l'occludine et la β -caténine, et est donc présente au niveau des TJs et des AJs. SH3BP1 est nécessaire à la limitation de l'activité de CDC42, ce qui permet la formation de la ceinture d'actine péri-jonctionnelle qui stabilise les AJs et favorise la formation des TJs (Elbediwy et al., 2012). La maturation des jonctions requiert donc la limitation de l'activité de CDC42.

Dans les cellules MDCK, un processus similaire est à l'œuvre. La GAP de CDC42 Rich1 (aussi appelée ARHGAP17), est requise pour la maturation et le maintien des TJs (Wells et al., 2006). Elle est enrichie dans la partie basale des TJs et apicale des AJs. Sa liaison avec AMOT, une protéine présente dans les TJs comme dans les AJs, permettrait de réguler sa localisation (Wells et al., 2006). La fonction de Rich1 dans le maintien de l'intégrité jonctionnelle semble liée au module Rich1-AMOT, qui contrôle le renouvellement des composants des TJs (Wells et al., 2006). De nouveau, il semble nécessaire de réduire l'activité de CDC42 au niveau des contacts cellulaires afin de permettre la maturation des jonctions. De plus, la signalisation RhoA-Rok, qui favorise la formation des AJs, peut être inhibée par CDC42 à travers la phosphorylation de Rok par aPKC chez *Drosophila* (Röper, 2012) ou de ROCK dans les MDCK (Ishiuchi and Takeichi, 2011). La restriction de l'activité de CDC42 au niveau de la jonction naissante semble donc faire partie d'un équilibre entre la signalisation RhoA-ROCK et aPKC-PAR-6-CDC42.

La GEF Tuba localise elle aussi au niveau des jonctions dans des cellules Caco-2. Plus précisément, dans la partie apicale des TJs. Elle est nécessaire à la maturation des AJs et à leur maintien (Otani et al., 2006). Une partie du rôle de CDC42 dans ces processus est imputée à l'effecteur de CDC42 N-WASP, et donc à la régulation de la polymérisation de l'actine. En effet, la perte de N-WASP aboutit à un phénotype similaire à celui obtenu lors de la perte de Tuba (Otani et al., 2006).

Enfin, la GEF FARP2 est également impliquée dans la régulation de CDC42 dans la formation des TJs dans des cellules MDCK (Elbediwy et al., 2012). Des liens entre les différents mécanismes antagonistes régulant l'activité de CDC42 dans la formation et le maintien des jonctions n'ont cependant pas été mis au jour.

d. Luminogénèse

La formation de la lumière (luminogénèse), est cruciale lors de la morphogénèse. De nombreux travaux se sont penchés sur le rôle de CDC42 lors de ce processus. Dans les sphéroïdes de cellules MDCK, il a été proposé que l'annexine 2, une protéine échafaudage, et PTEN, une phosphatase des lipides, soient impliquées dans le recrutement de CDC42 à la membrane apicale. PTEN favoriserait ce recrutement en limitant la présence de PIP3 au niveau de la membrane apicale (Martin-Belmonte et al., 2007). Cependant, la localisation de CDC42 n'est pas limitée à la membrane apicale, et le lieu de son activation n'a pas clairement été identifié (Martin-Belmonte et al., 2007).

L'axe aPKC-PAR-6-CDC42 régule également la luminogénèse via le contrôle de l'orientation du fuseau mitotique (Bryant et al., 2010; Jaffe et al., 2008). Dans les cystes de cellules MDCK, la polarité apico-basale est déjà présente au stade deux cellules, au moment de la division de la cellule mère. Lors de la division cellulaire, le positionnement du sillon de division est lié à celui du fuseau mitotique, dépendant de CDC42 (Jaffe et al., 2008; Mitsushima et al., 2009; Qin et al., 2010; Rodriguez-Fraticelli et al., 2010). Le sillon de division détermine quant à lui la position de formation du midbody durant la cytokinèse, midbody qui lui détermine la formation de la lumière (Schlüter et al., 2009). Durant ce processus, la phosphoglycoprotéine transmembranaire podocalyxine (PCX), localisée sur toute la surface de la cellule mère, est transcytosée vers le site d'initiation de la membrane apicale (AMIS). Ce site se forme au niveau du *midbody* et est caractérisé par la présence de PAR-3 et des composants de l'exocyste, un complexe protéique impliqué dans le trafic vésiculaire (Bryant et al., 2010; Li et al., 2014). La transcytose de PCX apparaît comme cruciale dans la formation de l'axe apico-basal et nécessite la présence de Rab35 (Klinkert et al., 2016; Mrozowska and Fukuda, 2016). En parallèle, la cinguline, une protéine des TJs, est recrutée au niveau de l'AMIS où elle interagit avec FIP5 (aussi appelée Rab11FIP5). Cela favorise l'acheminement des protéines nécessaires à la formation du pôle apical via une voie de trafic dépendante de Rab11a et Rab8a (Bryant et al., 2010; Mangan et al., 2016; Willenborg et al., 2011). De plus, CDC42 permet de positionner le fuseau mitotique perpendiculairement au plan des jonctions durant la division cellulaire (Jaffe et al., 2008). La régulation de ces processus dépend également d'aPKC, et est nécessaire à la formation d'une lumière unique.

Deux GEFs, Tuba et l'intersectine 2 (Itsn2), sont également impliquées dans la luminogénèse (Qin et al., 2010; Rodriguez-Fraticelli et al., 2010). Toutes deux régulent le positionnement du fuseau mitotique durant la division cellulaire. Dans les cellules Caco-2, Itsn2 s'accumule au niveau du centrosome et autour des pôles du fuseau, suggérant qu'elle régule l'activité de CDC42 à leur proximité (Rodriguez-Fraticelli et al., 2010). Aux pôles du fuseau, Itsn2 pourrait favoriser, de façon CDC42-dépendante, l'interaction entre les microtubules astraux et le cortex cellulaire. Tuba, quant à elle, est localisée au niveau des TJs des cellules Caco-2, et à proximité de la membrane apicale dans les sphéroïdes de cellules MDCK (Otani et al., 2006; Qin et al., 2010; Rodriguez-Fraticelli et al., 2010). Il est suggéré qu'elle inhibe l'interaction entre le cortex apical et les pôles du fuseau, contribuant ainsi au bon positionnement du fuseau.

L'activation de CDC42 au pôle apical dépend des voies de trafic apical. En effet, l'activation de CDC42 dans les sphéroïdes de cellules MDCK dépend de l'acheminement Rab11-dépendant d'autres protéines apicales (Bryant et al., 2010). De plus, via des expériences de FRAP, il a été montré que l'activation de CDC42 par Tuba multiplie par trois son temps de résidence à la membrane apicale (Bruurs et al., 2017). Cela pourrait favoriser le regroupement de CDC42 à cet endroit et donc assurer la formation d'un seul pôle apical (Pichaud et al., 2019). En outre, CDC42 a été localisé au niveau des vésicules de trafic dans plusieurs modèles (Bryant et al., 2010; Harris and Tepass, 2010; Willenborg et al., 2011). Il est donc possible de CDC42 soit activé par Tuba à proximité de la membrane apicale. Cela

favoriserait l'accumulation de CDC42-GTP à la membrane apicale, où est l'annexine 2 est présente, ce qui faciliterait son recrutement. Cela coïncide également avec l'acheminement d'autres protéines, dont CRB3 (Bryant et al., 2010; Willenborg et al., 2011). Dans ce modèle, PAR-3, localisé au niveau de l'AMIS, servirait de marqueur pour l'acheminement ciblé des protéines apicales, comme l'E-cadhérine. Il a été montré que PAR-3 peut interagir avec Exo70 (Ahmed and Macara, 2017), un composant de l'exocyste impliqué dans l'attachement des vésicules sécrétoires à la membrane plasmique, ce qui renforce ce modèle (Pichaud et al., 2019).

e. Prolifération

CDC42 est un acteur majeur de la mise en place et du maintien de la polarité dans les cellules épithéliales intestinales. De façon plus étonnante, certaines études ont également montré son implication dans la différenciation et la prolifération intestinale.

Il a d'abord été suggéré que CDC42 serait nécessaire au bon déroulement de la division des ISCs, via le recrutement de Rab8a au midbody durant la cytokinèse (Sakamori et al., 2012). En effet, la délétion de *Cdc42* dans les cellules LGR5+ affecte leur expansion clonale et leur différenciation en cellules de Paneth. Les auteurs proposent un modèle selon lequel CDC42 établirait un complexe composé de CDC42-PAR-3-aPKC et des sous-unités de l'exocyste au niveau du sillon de division. Ce complexe permettrait de recruter des vésicules Rab8a au niveau du *midbody*, transportées par la myosine-Vb (MYO5B). La fusion des vésicules Rab8a attachées à l'exocyste faciliterait la cytokinèse et la mise en place du pôle apical. L'expansion clonale des ISCs CDC42-déficientes serait donc limitée à cause de leur cytokinèse défectueuse, ce qui est cohérent avec l'augmentation de l'apoptose observée (Sakamori et al., 2012). La perte de CDC42 dans tout l'épithélium intestinal, induite à E15.5, induit quant à elle l'apparition d'inclusions microvillositaires (un des marqueurs phénotypiques de la MVID), un phénotype similaire à celui observé dans les souris *Rab8^{-/-}* (Sato et al., 2007). Des défauts au niveau de la membrane basolatérale ont enfin été notés (Sakamori et al., 2012).

Deux études ont quant à elles pointé l'importance de la régulation de l'activité de CDC42 dans les ISCs lors de la régénération ou du vieillissement (Castillo-Azofeifa et al., 2023; Nalapareddy et al., 2021). En effet, l'activité de CDC42 est plus élevée dans les cryptes vieillissantes, et l'augmentation de l'activité de CDC42 (obtenue à l'aide de souris *CDC42GAP^{-/-}*) induit des caractéristiques phénotypiques observées lors du vieillissement, notamment une diminution de la capacité des cryptes à former des organoïdes. Cette capacité peut néanmoins être restaurée par l'inhibition de l'activité de CDC42 par le *Cdc42* activity-specific inhibitor (CASIN). L'utilisation de cet inhibiteur améliore également les capacités régénératrices des cryptes âgées après irradiation (Nalapareddy et al., 2021). De façon similaire, il a été montré récemment que la perte de DLG1 diminue la capacité des ISCs à répondre à une forte stimulation de la signalisation WNT (caractéristique du processus de régénération), et ce via la diminution de l'expression la GAP ARHGAP31, ce qui entraîne une augmentation de l'activité de CDC42. L'apoptose des ISCs est augmentée, et leurs capacités migratoires sont réduites (Castillo-Azofeifa et al., 2023).

Des expériences de délétion de *Cdc42* dans l'intestin murin, que ce soit dans les cellules Olfm4+ (Zhang et al., 2022) ou dans le tissu entier, ont montré l'implication de CDC42 dans la prolifération, la différenciation et la migration intestinale (Melendez, 2013; Zhang et al., 2022). La délétion de CDC42 entraîne une hyperplasie des cryptes et une hyperprolifération (Fig.9). La différenciation des cellules de Paneth est également affectée, des cellules Lysozyme+ étant présentes dans les villosités (Melendez, 2013; Sakamori et al., 2012; Zhang et al., 2022) (Fig.9). Des cellules exprimant des

marqueurs de cellules de Paneth (Lysozyme) et de cellules caliciformes (bleu alcian) sont observées (Melendez, 2013). Les AJs sont légèrement désorganisées, la polarité apico-basale semble affectée (Melendez, 2013; Zhang et al., 2022), et la migration le long de l'axe crypte-villosité est plus rapide dans les souris *Cdc42*^{-/-} (Melendez, 2013). L'hyperprolifération provoquée par la perte de CDC42 serait dépendante d'une voie de signalisation YAP-EREg-mTOR (Zhang et al., 2022). Le nombre de cellules dans la zone de transition augmente tandis que le nombre d'ISCs, ainsi que l'expression de LGR5, Olfm4, Axine 2, diminue (Sakamori et al., 2012; Zhang et al., 2022). Le modèle proposé par Zhang *et al.* est le suivant : les défauts de polarité induits par la perte de CDC42 entraînent une déstabilisation de la liaison de Scribble au complexe MST1/2-LATS1/2-YAP, donc de la phosphorylation de MST1/2, LATS1/2 et YAP ; ceci induit une diminution de la dégradation de YAP et son accumulation nucléaire. YAP entraîne ensuite la transcription d'EREg, ligand de l'EGFR. L'activation de la voie EREG/EGFR active la voie mTOR, ce qui entraîne une hyper-prolifération. La double délétion YAP/TAZ et l'inhibition de la voie EGF par l'afatinib ou celle de mTOR par la rapamycine (Fig.9) restaurent une prolifération contrôlée, la taille des cryptes, le nombre d'ISCs et l'expression de leurs marqueurs, ainsi que le nombre de cellules TA. Les cellules de Paneth ectopiques demeurent néanmoins (Zhang et al., 2022). La délétion de *Scribble* dans l'épithélium intestinal produit un phénotype très similaire à celui obtenu lors de la perte de CDC42 (Zhang et al., 2022).

Enfin, CDC42 serait nécessaire à l'endocytose de l'EGFR stimulé par la liaison d'un ligand, ce qui a pour effet l'activation de la voie des MAPK. La survie des ISCs *ex vivo* est donc compromise lorsque CDC42 est absent. En effet, les organoïdes *Cdc42*^{IKO} entrent massivement en apoptose 72h après que la délétion de *Cdc42* soit induite par ajout de 4-hydroxytamoxifène, et les cryptes *Cdc42*^{ΔIEC} ne forment pas d'organoïdes lorsqu'elles sont mises en culture (Zhang et al., 2020).

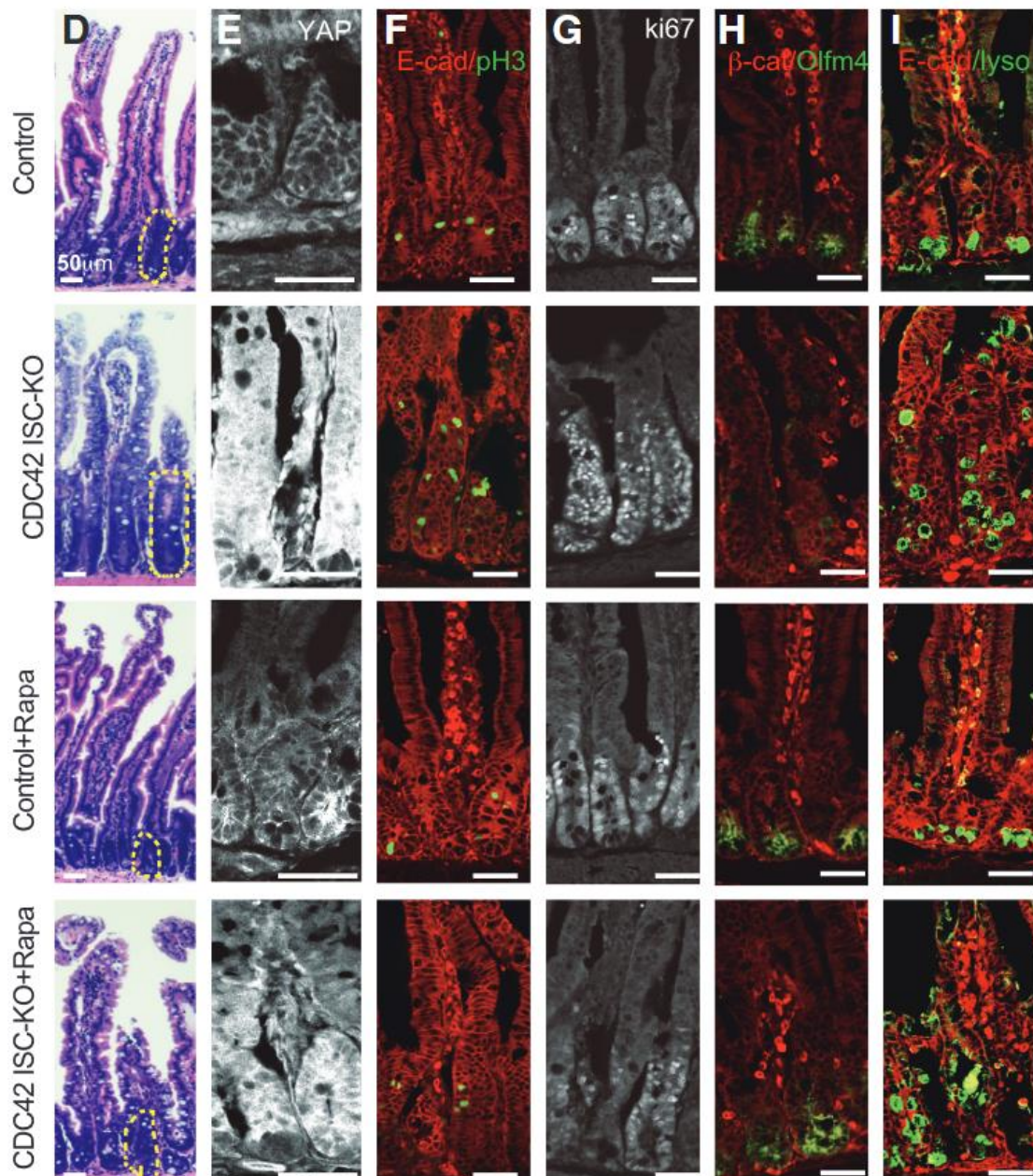


Figure 9 : La perte de CDC42 dans les ISCs entraîne une hyperprolifération dépendante d'une voie YAP-EREG-mTOR. Images tirées de Zhang et al., 2022. **(D)** Sections du duodénum marquées à l'hématoxyline et éosine, une crypte est entourée sur chaque image. **(E-I)** Sections duodénales marquées par immunofluorescence avec ces différents anticorps : anti-YAP, anti-E-cad, anti-pH3, anti-Ki67, anti-β-cat, anti-Olfm4, anti-lysozyme. pH3 et Ki67 : marqueurs de prolifération cellulaire. Olfm4 : marqueur d'ISCs, lysozyme : marqueur de cellules de Paneth. Rapa : rapamycine. Barre d'échelle : 50 μm.

III. Trafic polarisé

Le trafic polarisé est nécessaire à la mise en place et le maintien de la polarité épithéliale. Les lipides, comme les protéines doivent être correctement adressés et transportés à leur destination, afin que le pôle apical et le pôle basolatéral puissent exercer leurs fonctions. Les jonctions cellulaires

formant une barrière de diffusion au sein de la membrane plasmique, le trafic est essentiel à la bonne localisation des protéines polarisées.

1. Différentes routes de trafic

Les protéines nouvellement synthétisées peuvent emprunter différentes routes afin d'atteindre leur destination finale. J'aborderai les trois routes principales empruntées suite à la biosynthèse protéique, ainsi que la voie de recyclage.

a. Route directe

Les protéines nouvellement synthétisées peuvent emprunter une route directe du réseau trans-golgien (TGN) vers la membrane apicale ou basolatérale (Fig.10). Dans ce cas, les protéines sont triées après leur synthèse (Kreitzer et al., 2003; Rindler et al., 1984). Le TGN est considéré comme la principale station de tri de la voie biosynthétique dans les cellules épithéliales, mais le compartiment endosomal y participe également (Ang et al., 2004; Cramm-Behrens et al., 2008; Orzech et al., 2000). En effet, les protéines peuvent passer par les compartiments endosomaux afin d'atteindre leur destination finale (Ang et al., 2004; Gonzalez and Rodriguez-Boulan, 2009; Gravotta et al., 2007; Lakkaraju and Rodriguez-Boulan, 2008; Weisz and Rodriguez-Boulan, 2009). Les protéines apicales peuvent passer par les endosomes de tri ou de recyclage apicaux, et les endosomes de recyclage communs (Fig.10). Les protéines basolatérales peuvent quant à elles passer par les endosomes de tri basolatéraux, ou les endosomes de recyclage communs (Fig.10).

b. Transcytose

Dans le cas de la route indirecte, les protéines sont ciblées vers la membrane plasmique de l'un des deux pôles et sont ensuite retenues de façon sélective ou récupérées et transportées vers le pôle opposé. Ce processus est notamment utilisé pour les protéines apicales des hépatocytes (Bartles et al., 1987; Gissen and Arias, 2015; Müsch, 2014). Dans ces cellules, la majorité des protéines membranaires sont ciblées vers la membrane basolatérale, et les protéines destinées au pôle apical y sont re-dirigées par un mécanisme nommé la transcytose (Fig.10). Ce mécanisme est également impliqué dans l'adressage des protéines glycosylphosphatidylinositol-ancrées (GPI-ancrées) dans les cellules MDCK (Polishchuk et al., 2004).

c. Route aléatoire

Enfin, les protéines nouvellement synthétisées peuvent être adressées au deux pôles puis retenues ou dégradées de façon sélective. De cette façon, le tri polarisé est réalisé au niveau de la membrane plasmique elle-même. Par exemple, les récepteurs alpha2-adrénergiques sont adressés aux deux pôles des cellules MDCK, mais ne sont retenus qu'au niveau du pôle basolatéral (Gut et al., 1998; Wozniak and Limbird, 1996).

Les voies de tri utilisées peuvent être spécifiques au type cellulaire, mais aussi à la protéine triée. Par exemple, le récepteur à la neurotrophine p75 emprunte une route indirecte vers le pôle apical dans les cellules Caco-2 (Monlauzeur et al., 1998), et une route directe dans les cellules MDCK (Yeaman et al., 1997). Dans les cellules Caco-2, la lactase-phlorizin hydrolase emprunte une route directe vers le pôle apical (Jacob et al., 2003), contrairement au récepteur à la neurotrophine p75.

d. Voie de recyclage

Des mécanismes de tri doivent également être mis en place pour adresser les protéines endocytées à la bonne membrane. Le tri au niveau de la voie endocytique est également important pour adresser correctement les protéines transcytosées (Tuma and Hubbard, 2003).

L'étude des itinéraires de trafic de la voie endocytique dans les cellules épithéliales a permis de mettre en lumière différents compartiments endosomaux (Fölsch et al., 2009; Perez Bay et al., 2015; Welling and Weisz, 2010). Les endosomes de tri apicaux (ASE) ou basolatéraux (BSE), constituent une population d'endosomes localisés sous leurs membranes respectives. Les endosomes de recyclage communs (CRE) contiennent quant à eux la petite GTPase Rab8 ; et les endosomes de recyclage apicaux (ARE) sont identifiés par la présence de Rab11. Enfin, les endosomes tardifs (LE) contiennent Rab7.

Tout d'abord, les protéines endocytées peuvent s'accumuler dans les ASEs ou les BSEs (Bomssel et al., 1989). Malgré des marqueurs similaires, comme Rab4 (Sheff et al., 1999) et Rab5 (Bucci et al., 1994), les deux compartiments endosomaux présentent des compositions protéiques différentes (Fialka et al., 1999), différents taux de recyclage (Sheff et al., 1999), ainsi qu'une relation différente à la F-actine (Sheff et al., 2002). Cela suggère que chacun des types d'endosomes précoces est spécialisé pour le recyclage rapide de protéines provenant de la membrane qui lui est rattachée, sans passer par un compartiment intermédiaire (Sheff et al., 1999) (Fig.10). Les CREs sont quant à eux impliqués dans le recyclage de composants de la membrane apicale comme basolatérale (Thompson et al., 2007). Les protéines apicales endocytées peuvent aussi passer les AREs (Leung et al., 2000) (Fig.10).

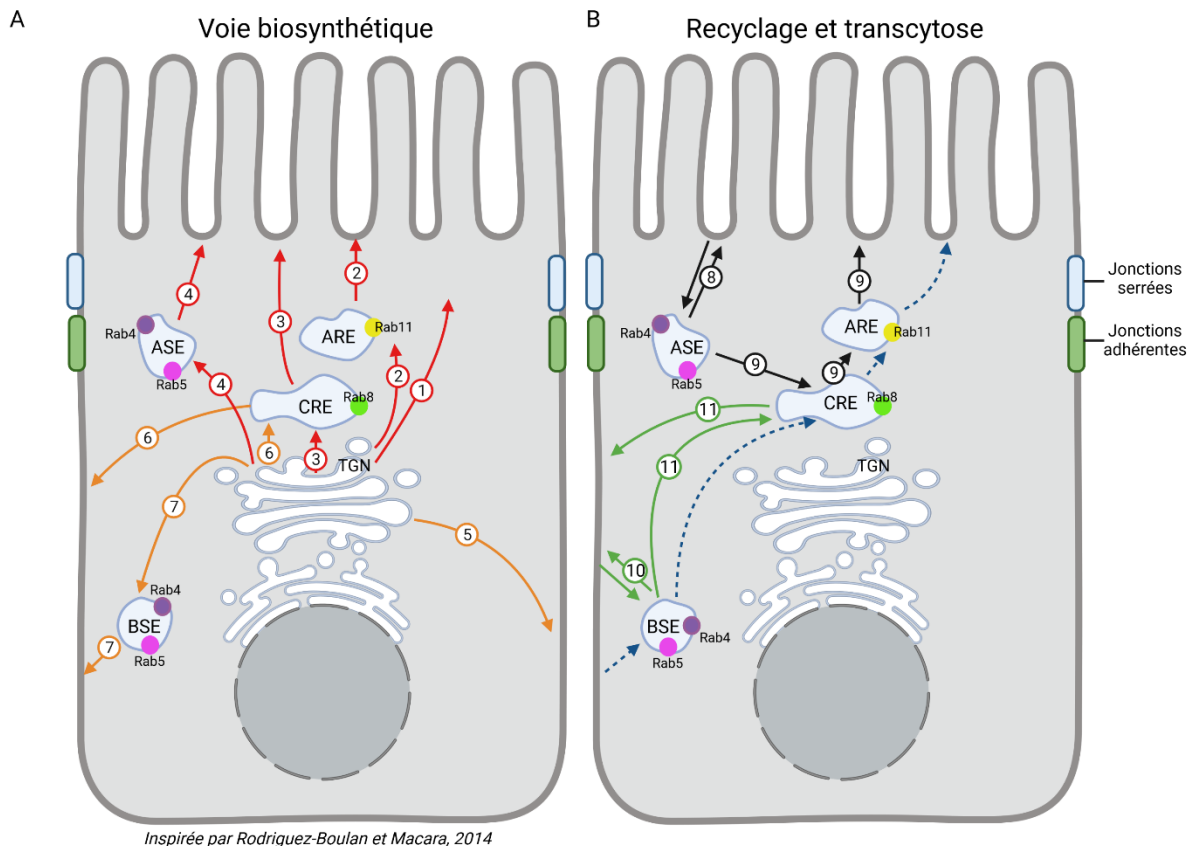


Figure 10 : Différentes routes du trafic polarisé. (A) Les protéines apicales ou basolatérales nouvellement synthétisées peuvent emprunter une route directe vers la membrane (routes 1 et 5), ou bien passer par des compartiments endosomaux, comme le CRE (routes 3 et 6) ou les endosomes de tri, ASE (route 4) et BSE (route 7). Les protéines apicales peuvent également passer par l'ARE avant d'arriver à la membrane apicale (route 2). Les routes rouges sont empruntées par les protéines apicales, les oranges par les basolatérales. (B) Les protéines apicales ou basolatérales internalisées dans les endosomes de tri ASE ou BSE peuvent être recyclées directement à la membrane par des routes de recyclage rapides (routes 8 et 10) ou triées et recyclées par des routes plus lentes (routes 9 et 11). La route de recyclage apical comprend un compartiment endosomal supplémentaire, l'ARE (route 9). Enfin, les protéines transcytosées sont internalisées dans les BSEs, puis passent par le CRE et l'ARE avant d'atteindre la membrane apicale (flèches en pointillés). Les routes noires sont empruntées par les protéines apicales, les vertes par les basolatérales. Le compartiment ARE est caractérisé par la présence de Rab11, le CRE par celle de Rab8, et les endosomes de tri par Rab4 et Rab5.

2. Signaux d'adressage

Le tri vers la membrane apicale ou basolatérale est médié par la présence de signaux d'adressage portés par les composants soumis au tri.

a. Signaux d'adressage apical

Les signaux d'adressage à la membrane apicale incluent des modifications pos-traductionnelles dans l'ectodomaine des protéines, notamment la présence de O-glycannes ou N-glycannes (Scheiffele

et al., 1995; Yeaman et al., 1997). Interférer avec ces modifications, par exemple en enlevant le domaine protéique contenant les acides aminés censés la porter, entraîne des erreurs d'adressage (Yeaman et al., 1997). A titre d'exemple, les mutations perturbant la O-glycosylation de la sucrase-isomaltase (SI) sont considérées comme en partie responsables de l'adressage aberrant de la SI au pôle basolatéral (Keiser et al., 2006). Le signal d'adressage peut également être porté par un domaine transmembranaire spécialisé, comme c'est le cas pour l'haemagglutinine (Scheiffele et al., 1997) ou pour les protéines GPI-ancrées (Lisanti et al., 1989; Powell et al., 1991). Enfin, des motifs spécifiques dans le domaine cytoplasmique peuvent servir de signaux d'adressage, comme c'est le cas pour la mégaline (Takeda et al., 2003) ou la rhodopsine (Tai et al., 1999).

Il a été proposé que la fonction de signaux d'adressage de glycanes soit médiée par leur interaction avec des lectines associées aux radeaux lipidiques apicaux (Simons and Ikonen, 1997), ou avec des lectines spécifiques, notamment les galectines 3,4 et 9 (Mishra et al., 2010; Stechly et al., 2009; Weisz and Rodriguez-Boulan, 2009). Les galectines sont sécrétées au niveau du pôle apical de manière non-conventionnelle, elles sont ensuite endocytées dans des endosomes de recyclage ou de tri, pouvant même atteindre le TGN. Elles exercent leur fonction de tri au niveau de ces plateformes. Les domaines ou ancres transmembranaires seraient impliqués dans le tri au niveau du TGN ou des compartiments endosomiaux via leur affinité pour des domaines lipidiques spécifiques ou des radeaux lipidiques (Puertollano et al., 1999; Simons and Gerl, 2010). Ces radeaux lipidiques, constitués par du cholestérol et des glycosphingolipides, doivent être oligomérisés pour devenir des plateformes de signalisation fonctionnelles (Paladino et al., 2004; Schuck and Simons, 2004). L'interaction avec le cytosquelette pourrait être médiée par des protéines transmembranaires telles que MAL/VIP17 (Cheong et al., 1999; Puertollano et al., 1999).

b. Signaux d'adressage basolatéral

Les signaux d'adressage basolatéral sont des peptides simples situés dans le domaine cytoplasmique d'une protéine. Certains sont similaires à des signaux d'endocytose, comme des motifs tyrosine (YXXΦ/NPXY) ou dileucine (LL/LI) (Bonifacino, 2014; Gonzalez and Rodriguez-Boulan, 2009), ce qui souligne que le tri basolatéral est majoritairement clathrine-dépendant, tout comme l'endocytose dépendante de la clathrine (CME) (Deborde et al., 2008).

L'adaptateur de clathrine AP-1 joue un rôle majeur dans le tri basolatéral. Celui-ci se présente sous deux formes : AP-1A et AP-1B. Ses deux formes diffèrent au niveau de la sous-unité médium: μ 1A ou μ 1B. Les signaux d'adressage aux motifs tyrosine interagissent avec des poches au niveau de la sous-unité μ 1A ou μ 1B (Carvajal-Gonzalez et al., 2012). AP-1A est ubiquitaire, tandis qu'AP-1B est exprimé uniquement dans les cellules épithéliales (Fölsch et al., 2009; Ohno et al., 1999). Les mécanismes exacts impliqués dans la fonction de tri d'AP-1A et AP-1B restent controversés (Bonifacino, 2014; Rodriguez-Boulan et al., 2013). Il est suggéré qu'ils soient localisés au niveau du TGN ou du CRE (Fölsch et al., 2003; Guo et al., 2013). AP-1B serait plutôt impliqué dans le tri des protéines basolatérales lors de la biosynthèse et du recyclage (Cancino et al., 2007; Gan et al., 2002; Gravotta et al., 2007). AP-1A quant à lui, exercerait sa fonction préférentiellement au niveau de la voie biosynthétique (Carvajal-Gonzalez et al., 2012; Gravotta et al., 2012). Certaines cellules épithéliales n'expriment pas AP-1B (comme celles du tubule proximal (Schreiner et al., 2010)), et se reposent donc uniquement sur AP-1A, et probablement d'autres mécanismes encore inconnus, en ce qui concerne le tri basolatéral.

La clathrine est également impliquée dans le tri de protéines ne portant pas de signal canonique d'endocytose, comme la transferrine (Odorizzi and Trowbridge, 1997) ou CD147 (Deora et al., 2004),

avec comme motif GDNS ou une leucine seule, respectivement. D'autres adaptateurs de clathrine qu'AP-1 peuvent être impliqués dans le tri basolatéral, comme AP-4 (Simmen et al., 2002), AP-3 (Nishimura et al., 2002) ou ARH (Kang and Fölsch, 2011). Enfin, des mécanismes indépendants de la clathrine peuvent être impliqués dans le tri basolatéral, comme c'est le cas pour Naked 2, qui se lie à des motifs du domaine cytoplasmique de TGF α (Li et al., 2007). Le trafic de la Na,K-ATPase, un transporteur majeur, vers le pôle basolatéral, est indépendant de la clathrine mais le mécanisme précis demeure inconnu (Deborde et al., 2008).

3. Trafic des vésicules

a. Transport

Le tri des protéines destinées au pôle apical ou basolatéral lors de la voie biosynthétique, transcytotique, ou de recyclage, est coordonné avec la production et la fission des différents types de vésicules de transport post-Golgi. Le détachement des vésicules du compartiment de tri, la fission, est médiée par différentes protéines en fonction la destination finale de la vésicule. La fission des vésicules destinées au pôle apical est médiée par la dynamine 2 (Salvarezza et al., 2009), tandis que la protéine kinase D et les CtBP3/BARS sont impliquées dans la fission des vésicules destinées au pôle basolatéral (Bonazzi et al., 2005; Yeaman et al., 2004). La dynamine 2 est également impliquée dans la fission de vésicules de transport apical au niveau des AREs (Thuenauer et al., 2014).

Le transport des vésicules dans le cytoplasme est facilité par les microtubules et différents moteurs moléculaires (Rodriguez-Boulan et al., 2005). Les microtubules seraient impliqués dans le transport apical comme basolatéral, un traitement au nocodazole (interférant avec le polymérisation des microtubules) inhibant les deux types de transport (Lafont et al., 1994). Cependant, la dynéine et plusieurs kinésines, dont KIFC3 (Noda et al., 2001), KIF1A (Xue et al., 2010), KIF5B (Jaulin et al., 2007) et KIF16B (Perez Bay et al., 2013), ont plutôt été montrées comme impliquées dans le transport apical des vésicules. De façon intéressante, le récepteur à la neurotrophine p75 n'est pas transporté par les mêmes kinésines en fonction du statut de polarité de la cellule. En effet, dans des cellules MDCK non polarisées, son transport dépend de KIF1A ou de KIF1 β (Xue et al., 2010), alors qu'il dépend de KIF5B dans des cellules MDCK polarisées (Jaulin et al., 2007).

La myosine II et la myosine VI sont impliquées dans le transport basolatéral depuis le TGN (Au et al., 2007; Müsch et al., 1997). La myosine VB, effectrice de Rab8a, Rab10 et Rab11a, est quant à elle nécessaire pour le transport apical depuis le compartiment ARE (Roland et al., 2011). Le compartiment ARE, caractérisé par la présence de Rab11a, semble être un compartiment de tri important dans les cellules épithéliales polarisées, comme le TGN ou le CRE. Bien que l'ARE soit considéré comme une potentielle « étape » lors du trafic apical, des protéines également destinées au domaine basolatéral comme l'E-cadhérine ont été localisées dans ce compartiment au cours de leur trafic vers la membrane plasmique (Lock and Stow, 2005). Des mutations au niveau du gène codant pour la myosine VB, impliquée dans le trafic apical depuis ce compartiment, sont responsables de la MVID, caractérisée par une atrophie des microvillosités, une accumulation intracellulaire de marqueurs de bordure en brosse et la présence d'inclusions microvillositaires (Müller et al., 2008). La délétion de *Myo5b* dans des modèles animaux récapitulent d'ailleurs ces défauts de trafic (Cartón-García et al., 2015).

b. Attachement et fusion

L'attachement des vésicules à la membrane, apicale comme basolatérale, dépend des différentes sous-unités de l'exocyste (Grindstaff et al., 1998; Oztan et al., 2007). Sec6, sec8 et exo70 sont localisées au niveau du CRE, de l'ARE et des endosomes de tri dans les cellules MCDK. L'exocyste est nécessaire à la transcytose et le recyclage apical comme basolatéral (Oztan et al., 2007). L'exocyste s'accumule également au niveau des complexes jonctionnels (Grindstaff et al., 1998), qui constituent un site préférentiel de fusion des vésicules basolatérales avec la membrane (Kreitzer et al., 2003).

La fusion des vésicules avec la membrane apicale est médiée par les t-SNAREs syntaxines 1, 2 et 3 (Grindstaff et al., 1998; Sharma et al., 2006) et VAMP7/TI-VAMP (Sato et al., 2011a). Le nombre des acteurs impliqués dans ce processus est cohérent avec la possibilité de plusieurs routes. La fusion avec la membrane basolatérale est quant à elle médiée par la t-SNARE syntaxine 4 (Reales et al., 2011; Sharma et al., 2006) et la v-SNARE cellubrevine/Vamp3 (Fields et al., 2007). Perturber la fonction de ces différentes SNAREs entraîne une dépolarisation des protéines membranaires, elles jouent donc un rôle majeur dans la machinerie complexe responsable de la mise en place et du maintien de la polarité. De façon intéressante, des mutations au niveau de *STX3*, qui code pour la syntaxine 3, sont associées à la MVID (Wiegerinck et al., 2014).

c. Rab GTPases

Les Rab GTPases font partie de la famille des petites Ras-like GTPases et sont localisées dans le cytoplasme ou au niveau d'une membrane cellulaire, et ce de façon cyclique. Leur liaison au GTP ou GDP influence leur localisation et leur activité (Hutagalung and Novick, 2011). Un nombre important de Rab GTPases est impliqué dans le trafic polarisé, et ce à plusieurs niveaux, de la formation au transport des vésicules, ainsi que dans leur fusion. Je donnerai ici quelques exemples, mais je ne détaillerai pas précisément le rôle de chaque Rab GTPase. Rab11, par exemple, participe au recyclage de la membrane apicale à travers son interaction avec la myosine VB via Rab11-FIP2 (Hales et al., 2002). D'autres Rabs sont également impliqués dans ce processus, comme Rab17 et Rab 25. Rab11, Rab17 et Rab25 sont aussi impliqués dans la transcytose (Casanova et al., 1999; Hunziker and Peters, 1998). Rab27, Rab11 et Rab8 jouent un rôle dans la formation de la lumière apicale (Bryant et al., 2010; Gálvez-Santisteban et al., 2012; Mangan et al., 2016). Rab8 possède également un rôle dans le transport vers la membrane basolatérale (Huber et al., 1993), comme Rab10 (Chen et al., 2006; Schuck et al., 2007). Enfin, Rab5 régule la biogénèse des endosomes *in vivo*. La perte de Rab5 entraîne en effet la diminution du nombre d'endosomes précoces, tardifs et de lysosomes. L'endocytose du LDL et la transcytose de protéines apicales sont aussi réduites (Zeigerer et al., 2012). Les endosomes de recyclage Rab11+ ne semblent cependant pas perturbés, tout comme le transport apical par route directe.

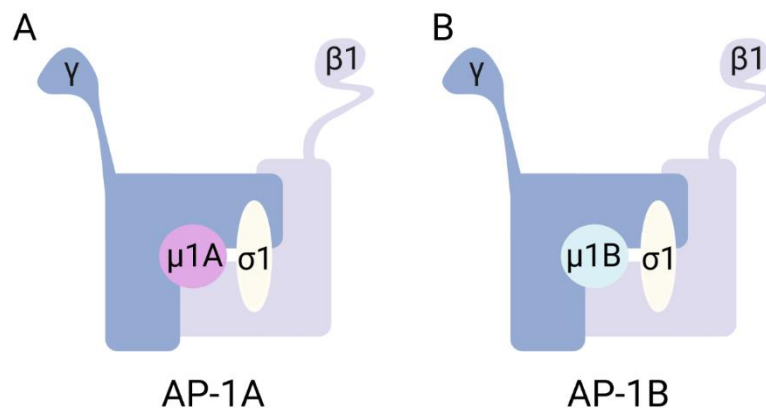
IV. L'adaptateur de clathrine AP-1B

1. Description

a. Complexe AP

Les complexes AP sont des adaptateurs de clathrine. Ce sont des hétérotétramères, constitués de deux grandes sous-unités (α , β , γ , δ , ϵ or ζ), d'une sous-unité médium ($\mu 1$ - $\mu 5$) et d'une petite sous-unité ($\sigma 1$ - $\sigma 5$). Sept types de complexes différents ont été découverts, deux d'entre eux sont tissu-spécifiques (Hirst et al., 2013; Nakatsu and Ohno, 2003). Bien que leurs fonctions se recoupent partiellement, ils ne sont impliqués dans les mêmes processus : le trafic du TGN vers les endosomes est régulé par AP-1 et AP-4, l'endocytose par AP-2, et le trafic des endosomes vers les lysosomes par AP-3 et AP-5 (Hirst et al., 2013; Nakatsu and Ohno, 2003; Robinson, 2004; Robinson and Bonifacino, 2001).

Les complexes AP agissent au niveau du site de production des vésicules, lorsque les protéines à transporter sont incorporées dans les vésicules en bourgeonnement (Robinson, 1997). Lorsque le complexe AP est recruté, la sous-unité μ ou le dimère α - σ reconnaît le signal d'adressage porté par la protéine transportée, et s'y lie (Bonifacino and Dell'Angelica, 1999; Bonifacino and Traub, 2003). Cela permet de sélectionner les protéines incorporées dans les vésicules naissantes. Le complexe AP recrute simultanément la clathrine, ce qui favorise la formation des vésicules par auto-assemblage. Le tri des protéines transportées ainsi que la formation des vésicules sont donc deux fonctions majeures des complexes AP (Nakatsu et al., 2014).



Inspirée par Nakatsu et al., 2014

Figure 11 : Structure du complexe AP-1. Le complexe AP-1 est constitué de quatre sous-unités. Celles-ci comprennent : deux grandes sous-unités, $\beta 1$ et γ , une petite sous-unité $\sigma 1$ et une sous-unité $\mu 1$. Cette dernière est différente en fonction du type de complexe AP-1 : $\mu 1A$ pour AP-1A (A), exprimé de manière ubiquitaire, et $\mu 1B$ pour AP-1B (B), exprimé uniquement dans les épithélia.

b. AP-1B

En 1999, Ohno *et al.* ont identifié une sous-unité μ encore inconnue à l'aide d'analyses bio-informatiques. Cette sous-unité a été nommée $\mu 1B$ à cause de sa grande similarité avec la sous-unité

μ 1 déjà identifiée, renommée μ 1A. Contrairement à μ 1A, qui est exprimée de façon ubiquitaire, μ 1B est exprimée de façon spécifique dans les cellules épithéliales de différents tissus, incluant le rein, l'intestin, les glandes salivaires ou encore les poumons (Ohno et al., 1999). Certaines cellules épithéliales n'expriment cependant pas μ 1B, comme les cellules rénales du tubule proximal (Schreiner et al., 2010), les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (Diaz et al., 2009) ou encore les hépatocytes murins et humains (Ohno et al., 1999). Tout comme les sous-unités μ des autres complexes AP, μ 1B est capable de reconnaître et de se lier à un sous-ensemble de motifs tyrosine correspondant à des signaux d'adressage (Ohno et al., 1999). Il a donc été suggéré que la sous-unité μ 1B puisse avoir une fonction de tri dans le trafic polarisé des cellules épithéliales, ce qui a été confirmé par des études ultérieures.

En effet, la sous-unité μ 1B est incorporée dans un complexe présentant les sous-unités γ , β 1 et σ 1, formant donc un autre complexe AP-1 dans les cellules épithéliales (Fig.11). L'expression exogène de μ 1B dans des cellules LLC-PK1 déficientes en μ 1B restaure la localisation basolatérale de certaines protéines membranaires, notamment le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR) et le récepteur de la transferrine (TfR) (Fölsch et al., 1999), suggérant fortement un rôle du complexe AP-1B dans la régulation du tri basolatéral dans les cellules en culture. Ces résultats sont confirmés par des expériences de perte de fonction de μ 1B par *siRNA* dans des cellules MDCK, dans lesquelles des protéines endogènes ou exogènes basolatérales sont délocalisées en partie au niveau du pôle apical lorsque μ 1B est absente (Gravotta et al., 2007). De nombreuses études ont également permis de montrer que le tri basolatéral opéré par AP-1 s'effectue au niveau de la voie biosynthétique ainsi qu'au niveau de la voie de recyclage (Cancino et al., 2007; Gan et al., 2002; Gravotta et al., 2007).

c. AP-1A dans les cellules épithéliales

AP-1A étant exprimé de façon ubiquitaire, il est présent dans les cellules épithéliales, qui expriment déjà AP-1B. La question de la fonction d'AP-1A dans les cellules épithéliales s'est alors posée. Les études menées sur les cellules LLC-PK1 (déficientes pour μ 1B) ont montré que μ 1A ne compense pas l'absence de μ 1B au niveau du tri basolatéral (Fölsch et al., 2001). Cependant, il a été montré depuis que la perte concomitante d'AP-1A et AP-1B aggrave les défauts de tri basolatéral dans des cellules MDCK, ce qui suggère un rôle d'AP-1A dans le tri basolatéral (Gravotta et al., 2012). Ces résultats ont été confirmés par des expériences similaires, toujours dans les cellules MDCK (Carvajal-Gonzalez et al., 2012). La localisation d'AP-1A et d'AP-1B a été observée à l'aide de l'expression transitoire de μ 1A-HA et μ 1B-HA : AP-1A est localisé de façon prédominante au niveau du TGN, et AP-1B au niveau des endosomes de recyclage (Fölsch et al., 2003; Gravotta et al., 2012). Les auteurs ont donc suggéré qu'AP-1A et AP-1B régulaient le tri basolatéral dans des compartiments différents : AP-1B contrôle le trafic basolatéral au niveau du TGN et des endosomes de recyclage dans les voies biosynthétique et de recyclage, tandis qu'AP-1A opère au niveau d'une voie biosynthétique alternative, du TGN vers la membrane (Gravotta et al., 2012; Rodriguez-Boulan et al., 2013).

Un autre modèle a également été proposé. Guo *et al.*, en utilisant un connecteur flexible entre la sous-unité μ marquée et le marqueur (HA ou fluorescent) ont observé une colocalisation d'AP-1A et AP-1B au niveau du TGN et des endosomes de recyclage, aucun des deux complexes ne semblant être localisé dans un des deux compartiments de façon prédominante. De plus, certaines protéines basolatérales interagissent préférentiellement avec μ 1B, d'autres avec μ 1A. Les auteurs ont émis l'hypothèse d'une adaptation évolutive des cellules épithéliales, à travers l'expression de μ 1B, afin d'augmenter le nombre de protéines basolatérales pouvant être triées (Guo et al., 2013).

Depuis, il a été montré que la localisation polarisée de certaines protéines dans les cellules MDCK est dépendante uniquement d'AP-1A, et celles d'autres protéines uniquement d'AP-1B. Les deux complexes ont donc des fonctions en partie indépendantes, bien que celles-ci puissent se compenser. La localisation de protéines basolatérales est fortement perturbée par la perte d'AP-1B, quand la perte AP-1A affecte la localisation de protéines basolatérales comme apicales (Caceres et al., 2019), ce qui suggère un rôle d'AP-1 dans le trafic apical.

En effet, d'autres études récentes ont montré l'implication d'AP-1 dans le trafic apical, notamment dans les cellules MDCK, avec une localisation basolatérale partielle des protéines apicales, comme la mégaline ou syntaxine 3, lorsqu'AP-1 est absent (Castillon et al., 2018; Gravotta et al., 2019). Dans des cystes de cellules souches embryonnaires humaines, AP-1 est nécessaire à la localisation apicale de la podocalyxin (Wang et al., 2021), le rôle de ce complexe n'est donc pas circonscrit au trafic basolatéral dans les cellules mammifères.

2. Fonctions d'AP-1 dans différents organismes et tissus

a. *Caenorhabditis elegans*, tri basolatéral et apical

Le complexe AP-1 présente également quatre sous-unités, encodés par cinq gènes : $\beta/apb-1$, $\gamma/apg-1$, $\sigma/aps-1$ et la sous-unité μ encodée par deux gènes, *unc-101* ou *apm-1*. Un knock-down d'*apb-1*, d'*apg-1*, d'*aps-1*, ou de *unc-101* et *apm-1* simultanément, entraîne un arrêt du développement à un stade embryonnaire ou larvaire (Shafaq-Zadah et al., 2012; Shim et al., 2000; Zhang et al., 2012).

La perte de fonction d'AP-1 dans l'intestin de *C. elegans* entraîne des défauts de localisation de protéines basolatérales, mais également apicales. En effet, SLCF-1, un transporteur de monocarboxylate, localisé au niveau de la membrane basolatérale, est également localisé au niveau de la membrane apicale dans le cas d'un ARN interférence (RNAi) contre *aps-1* ou *apm-1* (Shafaq-Zadah et al., 2012). De nombreuses protéines apicales, comme PAR-6, CDC42, PEPT-1 (transporteur d'oligopeptides), AQP-4 (une aquaporine), ERM-1 (famille ezrin-radixine-moesine) sont désormais localisées aussi au niveau du pôle basolatéral suite à une perte de fonction d'AP-1 (Fig.12). Des lumières ectopiques sont également observées le long de la membrane latérale (Shafaq-Zadah et al., 2012; Zhang et al., 2012). AP-1 joue donc à priori un rôle dans le tri polarisé de façon globale, basolatéral comme apical.

De plus, la perte d'AP-1 conduit à la disparition de l'enrichissement subapical en endosomes Rab11+, les AREs (Zhang et al., 2012). Les défauts de localisation des protéines apicales observés suite à la perte d'AP-1 pourrait donc être dus à des perturbations du tri apical au niveau des AREs, au cours de la voie biosynthétique ou de recyclage. La localisation de CDC42 par exemple, dépend des endosomes Rab11+ (Bryant et al., 2010; Shafaq-Zadah et al., 2012) (Fig.12), il est donc cohérent que celui-ci soit mal localisé lorsqu'AP-1 est absent.

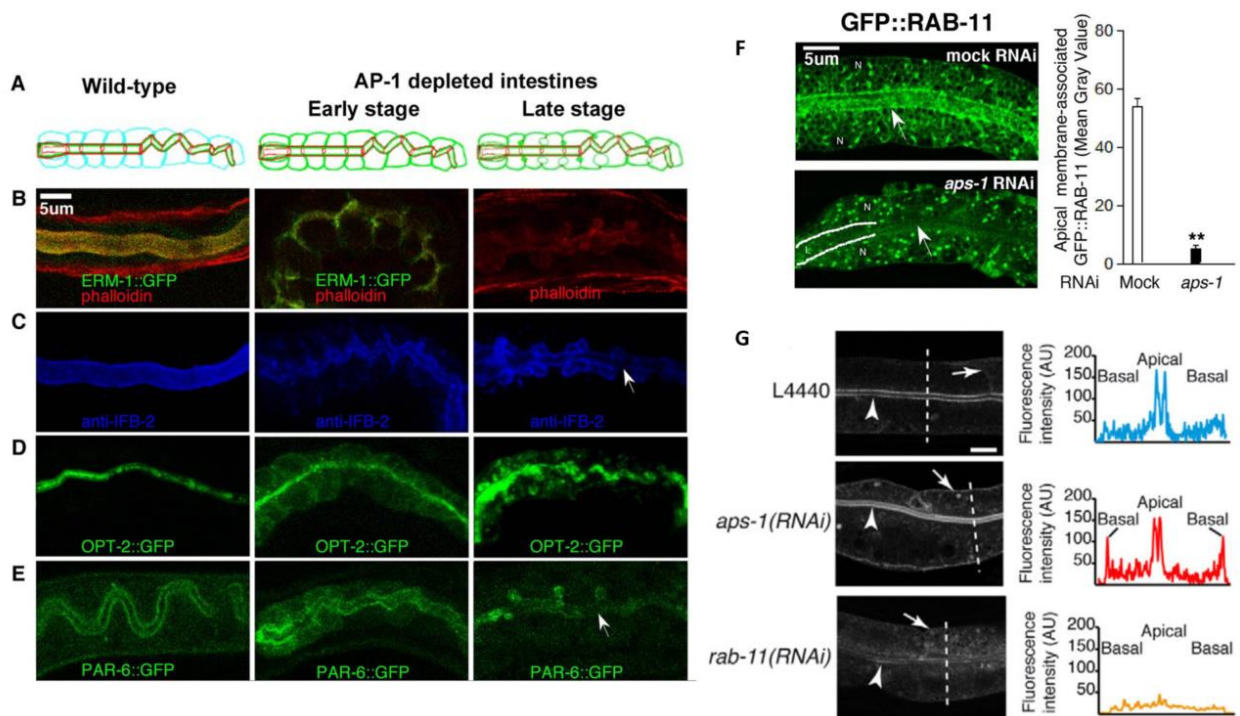


Figure 12 : AP-1 régule la polarité apico-basale dans l'intestin chez *C. elegans*. Images tirées de Zhang et al., 2012 (A-F) et de Shafaq-Zadah et al., 2012 (G). (A) Schémas représentant les intestins des individus sauvages ou déplétés en AP-1, avec les membranes apicales en vert, les jonctions apicales en rouge et les membranes basolatérales en bleu. (B-E) Localisation de protéines polarisées dans des intestins sauvages de larves L1 (droite) ou déplétées en *aps-1* ou *apb-1*. Tous les marqueurs apicaux sont délocalisés vers la membrane latérale avant d'être incorporés dans des lumières ectopiques. (B) actine, ERM-1 (famille ezrine-radixine-moesine), (C) IFB2 (filaments intermédiaires), (D) OPT-2 (transporteur d'oligopeptides), (E) PAR-6. (F) Diminution des vésicules GFP::RAB-11 au niveau de la membrane apicale dans l'intestin de larves L1 *aps-1* RNAi. (G) Localisation de GFP::CDC-42 48h après un traitement RNAi contre *aps-1* ou *rab-11* dans les larves L1. La membrane apicale est indiquée par une pointe de flèche, et la membrane basale par une flèche. CDC-42 s'accumule au niveau de la membrane basale après le RNAi contre *aps-1*, et est presque absent après le RNAi contre *rab-11*.

b. *Drosophila melanogaster*, régulation de la signalisation Notch

L'organe sensoriel externe de *Drosophila* est constitué de quatre types cellulaires. Ces quatre types cellulaires dérivent d'une même cellule souche, appelée *sensory organ precursor* (SOP) (Bellaïche and Schweisguth, 2001). Cette cellule se divise de manière asymétrique pour donner deux cellules filles : pIIb (antérieure) et pIIa (postérieure). Au cours de cette division, de nombreux déterminants du destin cellulaire sont ségrégués de façon asymétrique dans les cellules filles, ce qui résulte en l'acquisition de destins cellulaires différents. La signalisation Notch, très importante dans l'acquisition du destin cellulaire, n'est activée que dans la cellule pIIa (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Gönczy, 2008).

AP-1 a été identifié comme un régulateur négatif de la signalisation Notch chez *Drosophila*. En effet, la perte de fonction d'AP-1 entraîne l'activation de la signalisation Notch dans la cellule pIIb (Benhra et al., 2011). La polarité ou la ségrégation asymétrique des déterminants du destin cellulaire Numb et Neuralized ne sont cependant pas affectées. Par contre, Sanpodo, un activateur de Notch

(O'Connor-Giles and Skeath, 2003), s'accumule au niveau apical. Il est également stabilisé, avec Notch, à la jonction apicale des deux cellules-filles, au niveau des jonctions adhérentes (Benhra et al., 2011). AP-1 agirait au niveau des endosomes de recyclage, et empêcherait le recyclage de Sanpodo vers les jonctions adhérentes, et de cette façon, participerait à la régulation de la signalisation Nocth (Benhra et al., 2011).

De plus, Numb, un inhibiteur de Notch (Spana and Doe, 1996), interagit physiquement et génétiquement avec AP-1 (Cotton et al., 2013b). Numb est hérité par la cellule pIIb (Cayouette and Raff, 2002), où la signalisation Notch est inhibée, AP-1 pourrait donc être régulé par Numb dans la cellule pIIb. De façon intéressante, Sanpodo est recyclé vers la membrane uniquement dans les cellules pIIa, qui n'ont pas hérité de Numb, ce qui suggère que Numb empêche le recyclage de Sanpodo vers la membrane (Cotton et al., 2013b). La perte de Numb conduit au recyclage de Sanpodo à la membrane dans les cellules pIIa comme dans les cellules pIIb. La fonction d'AP-1 sur le recyclage de Sanpodo, à savoir empêcher son recyclage vers la membrane, serait donc régulée par Numb.

c. Poisson-zèbre

Trois sous-unités $\mu 1$ sont présentes chez le poisson-zèbre : $\mu 1A$, $\mu 1B$ et $\mu 1C$ (Gariano et al., 2014). L'analyse de l'expression de $\mu 1B$ par RT-PCR révèle l'expression de cette sous-unité dans des tissus épithéliaux polarisés, tels que le système digestif, les testicules, le pancréas et les reins. Cette distribution est cohérente avec celle observée pour la sous-unité $\mu 1B$ mammifère. Cette expression tissu-spécifique et plus prégnante lors du développement. De façon intéressante, $\mu 1B$ est exprimée dans le foie du poisson-zèbre, alors qu'elle est absente des cellules hépatiques mammifères, suggérant une autre fonction d'AP-1B dans les cellules hépatiques du poisson-zèbre (Zizioli et al., 2010). $\mu 1A$ n'est pas exprimée de façon ubiquitaire, mais dans des tissus où $\mu 1B$ est absente, comme le cœur, les yeux, le cerveau et les muscles squelettiques. Cependant, elle est aussi exprimée dans le système digestif ou les testicules (Zizioli et al., 2010). La distribution de l'expression de $\mu 1C$ est similaire à celle de $\mu 1A$ (Gariano et al., 2014).

La perte de fonction d'AP-1B, induite par l'injection de *morpholino*, induit un retard de développement et des malformations caudales. Des défauts sont également observés au niveau du système digestif, des reins, du pancréas et du foie (Zizioli et al., 2010). La perte de fonction concomitante d'AP-1B et d'AP-1A aggrave les défauts observés au niveau des reins, induisant une perte de fonction rénale se traduisant par un œdème cardiaque (Gariano et al., 2014). Des défauts sont également observés au niveau du système nerveux central. L'expression de $\mu 1C$ ne permet à priori pas de compenser la perte de deux autres sous-unités (Gariano et al., 2014). De façon intéressante, les souris *Ap1m2^{-/-}* (*Ap1m2* code pour $\mu 1B$) ne semblent pas présenter de défauts rénaux (Hase et al., 2013), suggérant des fonctions différentielles d'AP-1B dans certains tissus épithéliaux en fonction des espèces.

d. Souris

1. Développement

Les souris n'exprimant pas la sous-unité μ 1B se développent normalement jusqu'à l'âge de deux semaines (Hase et al., 2013). AP-1B ne semble donc pas nécessaire lors du développement embryonnaire, contrairement à AP-1A. En effet, les souris déficientes pour μ 1A ne survivent pas après le jour embryonnaire 13.5 (E13.5) (Meyer et al., 2000). De façon intéressante, la perte concomitante de μ 1A et μ 1B conduit à un phénotype létal embryonnaire à E3.5, moment où les protéines et ARNm maternels commencent à disparaître (Zizioli et al., 1999). AP-1B peut donc remplacer AP-1A lors du développement embryonnaire jusqu'à E13.5.

2. Polarité des cellules intestinales

Comme précisé plus haut, la perte de μ 1B n'est pas létale au stade embryonnaire. Cependant, deux semaines après la naissance, les souris présentent un retard de développement et la moitié des individus meurent avant d'atteindre l'âge de huit semaines (Hase et al., 2013). Des défauts sont observés au niveau de l'intestin, mais les autres tissus épithéliaux analysés ne semblent pas en présenter (glandes salivaires, rein, poumon, pancréas et estomac). Les souris présentent enfin des symptômes de malnutrition, se traduisant par une baisse des niveaux de glucose et d'albumine dans le sérum (Hase et al., 2013).

La localisation de plusieurs protéines polarisées est perturbée dans l'épithélium intestinal. Les protéines basolatérales Ephrin B2 et LDLR sont localisées au niveau du pôle apical en plus de leur localisation basolatérale. La villine et la sucrase-isomaltase, deux protéines de la bordure en brosse apicale, sont observées au niveau de la membrane latérale et apicale (Hase et al., 2013). AP-1B joue donc probablement un rôle dans le tri apical en plus de ses fonctions dans le tri basolatéral. Les jonctions serrées ne sont pas impactées par l'absence de μ 1B, contrairement aux jonctions adhérentes. En effet, l'E-cadhérine s'accumule dans le cytoplasme. La morphologie des microvillosités est également impactée par l'absence d'AP-1. Celles-ci semblent éparpillées et désorganisées (Hase et al., 2013). De plus, des structures similaires aux microvillosités sont observées au niveau de la membrane latérale par microscopie électronique à transmission (MET) (Hase et al., 2013) (Fig. 13). Le tri polarisé dépendant d'AP-1B est donc nécessaire à la mise en place de la polarité épithéliale dans l'épithélium intestinal, et celui-ci englobe des protéines basolatérales comme apicales, comme chez *C. elegans*.

De façon intéressante, une hyperplasie des cryptes et une hyper-prolifération sont également observées, je m'attarderai sur ces phénotypes dans une prochaine partie.

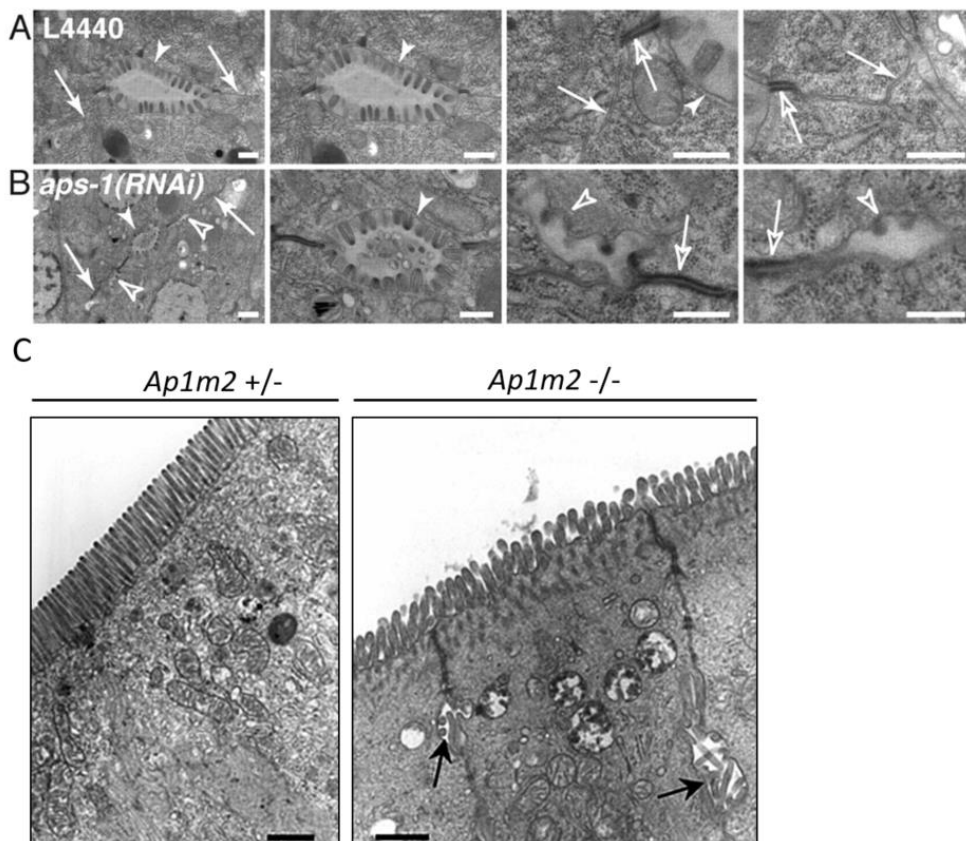


Figure 13 : L'absence d'AP-1 entraîne la formation de lumières ectopiques. Images tirées de Hase et al., 2013 et de Shafaq-Zadah et al., 2012. **(A,B)** Ultrastructure de l'intestin d'embryons de *C. elegans* L4440 **(A)** ou *aps-1(RNAi)* **(B)**. La lumière centrale (tête de flèche pleine) est entourée des membranes latérales (flèches pleines). Des lumières ectopiques (têtes de flèches vides) sont visibles de chaque côté de la lumière centrale dans les embryons *aps-1(RNAi)*. Des jonctions (flèches vides) sont présentes au niveau des lumières ectopiques. Barre d'échelle : 500 nm. **(C)** Ultrastructure des cellules épithéliales intestinales murines *Ap1m2 +/-* ou *Ap1m2 -/-*. Les flèches indiquent les lumières ectopiques. Barre d'échelle : 1 μ m.

e. Pathologies humaines

A ce jour, aucune pathologie n'est attribuée à des mutations touchant la sous-unité μ 1B, seule spécifique d'AP-1B. Cependant, plusieurs pathologies sont reliées à des mutations des différents gènes codant pour la sous-unité σ , présente dans le complexe AP-1A comme AP-1B. Des mutations du gène *AP1S1*, codant pour la sous-unité σ 1A, causent un trouble multi-systémique. Celui touche la peau, le système nerveux et l'intestin, et provoque une diarrhée congénitale chronique, une hyperkératose congénitale, une ichtyose, des déficiences intellectuelles et une perte d'audition (Klee et al., 2020; Montpetit et al., 2008). Les mutations d'*AP1S2*, codant pour σ 1B, entraînent quant à elles des déficiences intellectuelles liées au chromosome X, sans atteintes au niveau de l'intestin ou la peau (Tarpey et al., 2006). Enfin, les mutations d'*AP1S3*, codant pour σ 1C, sont responsables d'un désordre cutané auto-inflammatoire, le psoriasis pustuleux. Celui-ci pourrait être associé à des défauts de trafic du *Toll-like receptor 3* (Setta-Kaffetzi et al., 2014).

Des mutations du gène *AP1B1*, seul gène codant pour la sous-unité β 1, sont également responsables d'un trouble multi-systémique semblable à celui provoqué par les mutations *AP1S1*

(Alsaif et al., 2019; Boyden et al., 2019). De façon surprenante, la sous-unité $\beta 1$ semble totalement absente chez certains patients. Or, les complexes AP-1 pour lesquels cette sous-unité est absente sont à priori non fonctionnels, ce qui rend la survie de ces patients étonnante. Les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ sont très similaires, la sous-unité $\beta 2$ pourrait peut-être être incorporée au complexe AP-1 chez ces patients, comme la sous-unité $\beta 1$ est incorporée dans le complexe AP-2 chez des souris déficientes en $\beta 2$, restaurant ainsi en partie la fonctionnalité du complexe (Li et al., 2010).

3. Fonctions d'AP-1 dans la migration et la prolifération chez les mammifères

a. Migration

Une étude récente sur des cellules LLC-PK1 (naturellement déficientes en AP-1B) exprimant de façon stable AP-1B-YFP a permis de montrer qu'AP-1B pouvait être localisé au niveau des protrusions cellulaires et jouer un rôle dans la migration (Kell et al., 2020). Tout d'abord, les auteurs ont montré que la localisation de la $\beta 1$ -intégrine, un des composants des adhésions focales, était dépendante d'AP-1B et de son co-adaptateur *autosomal recessive hypercholesterolemia protein* (ARH). En comparant la migration de cellules LLC-PK1:: $\mu 1B$ avec celle de cellules LCC-PK1, les auteurs ont ensuite démontré que l'absence d'AP-1B accélérât la migration cellulaire. Ces résultats ont été reproduits des cellules MDCK dans lesquelles l'expression de $\mu 1B$ a été déplétée par *shRNA*. Les auteurs ont également montré qu'AP-1B colocalisait avec la $\beta 1$ -intégrine au niveau des protrusions cellulaires durant des événements de migration collective. AP-1B est localisé très proche de la membrane plasmique, et ne colocalise pas avec AP-2, connu pour son rôle dans l'endocytose des intégrines. Enfin, $\mu 1B$ n'est pas exprimée dans des lignées cellulaires cancéreuses métastatiques, notamment la lignée HeLa et une lignée de cancer du sein triple négatif MDA-MB-231 (Kell et al., 2020). AP-1B pourrait donc jouer un rôle lors de la migration cellulaire.

b. Prolifération

Comme évoqué plus haut, les souris *Ap1m2^{-/-}* présentent une hyperplasie des cryptes (Hase et al., 2013)(Fig. 14). Cette hyperplasie est due à une hyper-prolifération des cellules intestinales, identifiée à l'aide du marqueur de prolifération Ki67 (Fig. 14). Cependant, il n'y a pas de différences d'expression de marqueurs d'ISCs (LGR5, Axin2, Bmi1) entre les souris *Ap1m2^{-/-}* et les souris contrôle. Les voies de signalisation BMP et TGF- β ne semblent pas impliquées dans cette hyper-prolifération, la phosphorylation des facteurs de transcription Smad1/5/8 et Smad3, impliqués dans la transduction de ces deux voies, n'étant pas modifiée. Le voie de signalisation Notch ne semble pas non plus impliquée, son inhibition à l'aide d'un inhibiteur de γ -sécrétase n'ayant pas d'effet notable sur l'hyper-prolifération.

La perte d'AP-1B entraîne l'accumulation cytoplasmique de l'E-cadhérine (Fig. 14), sans augmentation du niveau d'expression total. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que cette mauvaise localisation de l'E-cadhérine déstabiliserait l'intégrité du complexe E-cadhérine- β -caténine, entraînant la translocation de la β -caténine. En effet, la quantité de β -caténine liée à l'E-cadhérine diminue de 38% dans les souris *Ap1m2^{-/-}* et la quantité de β -caténine nucléaire est plus importante (Fig. 14). De plus, l'expression CD44 et c-Myc, deux cibles de la voie β -caténine/Tcf4, est augmentée dans les souris *Ap1m2^{-/-}*. Enfin, l'utilisation d'un inhibiteur de la β -caténine, IWR-1, permet de diminuer le nombre de

cellules Ki67+ par crypte dans des souris *Ap1m2^{-/-}*. Les auteurs proposent donc que l'hyperprolifération induite par la perte d'AP-1 est provoquée par l'accumulation cytoplasmique de l'E-cadhérine, qui entraîne la translocation nucléaire de la β -caténine et l'activation de cette voie (Nakatsu et al., 2014).

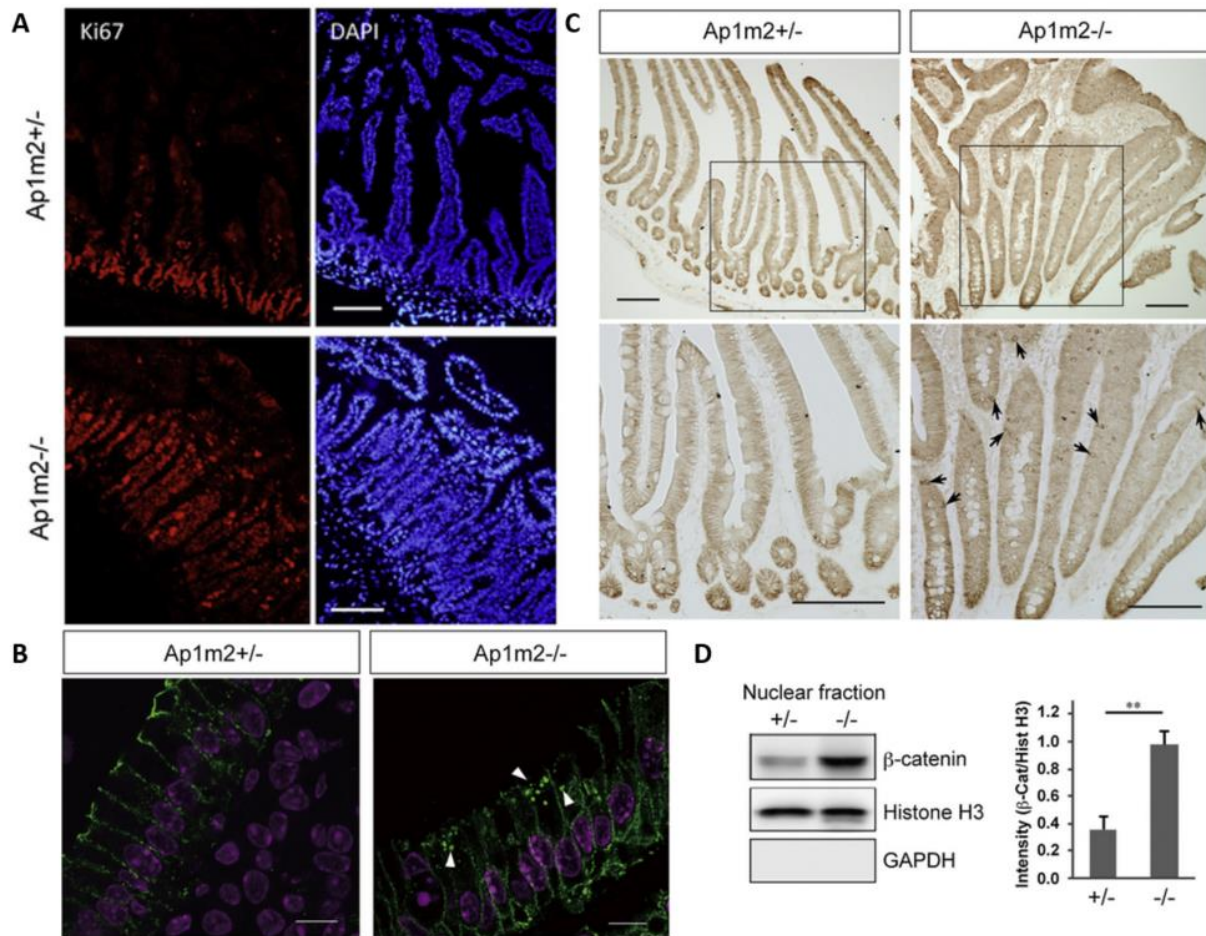


Figure 14 : AP-1B régule la prolifération cellulaire intestinale. Images tirées de Hase et al., 2013. **(A)** Marquage par immunofluorescence de Ki67 et du DAPI dans des intestins de souris *AP1m2^{+/-}* ou *Ap1m2^{-/-}*. La délétion d'*Ap1m2* induit une hyperplasie des cryptes et une hyperprolifération. Barre d'échelle : 100 μ m. **(B)** Marquage par immunofluorescence de l'E-cadhérine (vert) dans des intestins de souris *AP1m2^{+/-}* ou *Ap1m2^{-/-}*. Les noyaux sont marqués avec du 4,6-diamidino2-phenylindole. L'E-cadhérine s'accumule dans le cytoplasme des cellules *Ap1m2^{-/-}* (flèches). Barre d'échelle : 10 μ m. **(C)** Marquage par immunohistochimie de la β -caténine. Les panneaux du bas sont des agrandissements des zones encadrées dans les panneaux du haut. Les flèches montrent les cellules présentant une accumulation nucléaire de la β -caténine. Barre d'échelle : 200 μ m. **(D)** Analyse par Western Blot des protéines nucléaires d'épithélium duodénal de souris *Ap1m2^{+/-}* ou *Ap1m2^{-/-}*. L'histone H3 est utilisée comme contrôle interne. L'intensité des bandes est mesurée par densitométrie. ** $p < 0,01$.

V. Objectifs de la thèse

AP-1B est un acteur du trafic polarisé apical et basolatéral dans les cellules épithéliales, sa perte d'expression ou de fonction entraîne donc des défauts de polarité épithéliale. De façon

surprenante, sa perte d'expression entraîne également une hyper-prolifération dans l'épithélium intestinal murin.

L'objectif de ma thèse était d'étudier les mécanismes par lesquels AP-1B joue un rôle dans la régulation de la prolifération intestinale, et si CDC42 était impliqué dans ceux-ci. En effet, sa localisation est affectée par la perte d'AP-1 chez *C. elegans* (Shafaq-Zadah et al., 2012) et son absence dans l'intestin murin entraîne une hyper-prolifération (Melendez, 2013; Zhang et al., 2022). Pour cela, j'ai utilisé comme modèle des organoïdes intestinaux murins portant des mutations inducibles de *Ap1m2*, médiées par CRISPR-CAS9. Le gène *Ap1m2* code pour la sous-unité μ 1B du complexe AP-1B. Afin de caractériser les mécanismes sous-tendant l'hyper-prolifération induite par la mutation d'*Ap1m2*, j'ai réalisé des observations de protéines marquées par immunofluorescence ou immunohistochimie, ainsi que des expériences de biologie moléculaire avec l'aide d'Anne Bourdais (AI CNRS dans l'équipe). Des analyses en MET ont également été conduites par Ophélie Nicolle (IE UR dans l'équipe). Cela m'a permis de caractériser les différents phénotypes induits par la mutation d'*Ap1m2*, et de mettre en évidence une partie d'une des voies impliquées dans l'hyper-prolifération *Ap1m2*-dépendante.

Matériel et méthodes

Je ne vais pas détailler ici le matériel et méthodes des différentes expériences, car celui-ci est présent dans l'article qui suit. Je vais cependant exposer succinctement la procédure utilisée pour cultiver les organoïdes et la temporalité des différents traitements, et détailler le matériel et méthodes utilisés dans les résultats complémentaires lorsque celui-ci n'est pas mentionné dans l'article.

I. Traitements lors de la culture cellulaire

Les cryptes obtenues après cassage mécanique des organoïdes lors du passage sont mises en culture dans des gouttes de BME2 avec du milieu EGF/Noggin/R-Spondin1 (ENR) (Duclos et al., 2023) à J0. Les mutations d'*Ap1m2* sont induites par l'ajout de doxycycline (Dox) à 400 ng/mL de J4 à J10. Lors des expériences d'inhibition de la signalisation EGFR ou mTOR, de l'afatinib (Afa) à 200 nM ou de la rapamycine (Rapa) à 1 μ M, respectivement, sont ajoutées dans le milieu de J7 à J10 (Fig.15A).

Afin d'obtenir des organoïdes exempts de cryptes et totalement différenciés, et ainsi de pouvoir étudier plus facilement la polarité des entérocytes, de l'acide valproïque à 1mM est ajouté dans le milieu de J4 à J10, et de l'IWP-2 (un inhibiteur de la signalisation WNT) à 2,5 mg/mL est ajouté de J7 à J10 (Fig.15B).

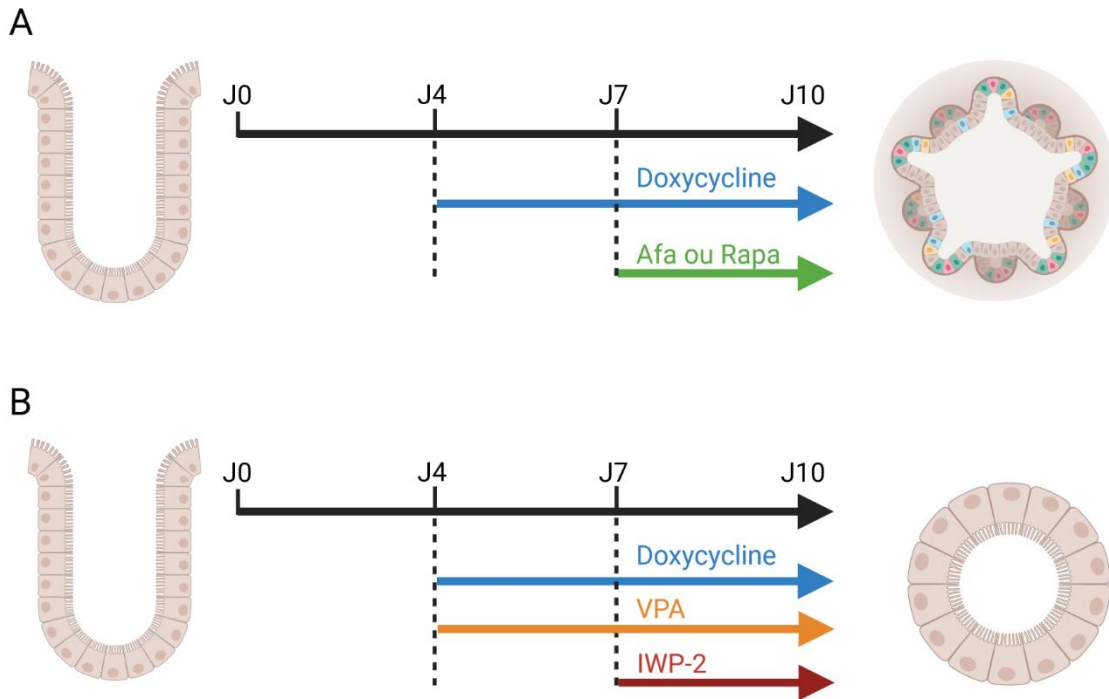


Figure 15 : Temporalité des différents traitements lors de la culture des organoïdes. Les cryptes obtenues après passage des organoïdes sont mise en culture à J0. Les mutations d'Ap1m2 sont induites par l'ajout de la Dox de J4 à J10. **(A)** Afin d'inhiber les signalisations EGFR ou mTOR, de l'Afa ou de la Rapa sont ajoutées dans le milieu de J7 à J10. **(B)** Afin d'obtenir des organoïdes contenant majoritairement des entérocytes, de l'acide valproïque est ajouté de J4 à J10, et de l'IWP-2 de J7 à J10.

II. Matériel et méthodes des résultats complémentaires

1. Culture

Pour les expériences d'inhibition de la GSK3 β , les organoïdes ont été cultivés comme décrit dans Duclos *et al.*, 2023 et du CHIR 99021 (STE04-0004, Ozyme) à 20 μ M a été ajouté de J4 à J10, soit pendant 6 jours.

2. Immunofluorescence

Le protocole général utilisé est le même que celui décrit dans l'article. Cependant certains anticorps n'ont été utilisés que pour les résultats complémentaires, les voici : anti-c-Myc (1 :200, 5605, Cell Signaling), anti-E-cadhérine (1 :100, AF748-SP, Biotechne) ou (1 :200, 3195, Cell Signaling), anti- β -caténine (1 :300, 610154, BD Biosciences).

3. Tissus de souris

Les blocs de paraffine contenant l'intestin grêle de souris *Ap1m2^{ff}* ou *VillinCreERT2 Ap1m2^{ff}* ont été obtenus auprès de l'équipe d'Hiroshi Ohno (Laboratory for Intestinal Ecosystem, RCAI, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences (IMS-RCAI), Yokohama, Kanagawa, Japan).

4. Immunohistochimie

Ces étapes ont été réalisées par la plateforme H2P2 (Biosit, Rennes). Brièvement, les tissus ont été fixés dans du formaldéhyde 4% puis inclus dans de la paraffine. Les blocs de paraffine ont été coupés en coupes de 4 µm. Comme pour les marquages par immunofluorescence, le protocole général d'immunohistochimie utilisé est le même que celui décrit dans l'article. Les références des anticorps primaires sont également les mêmes que celles citées dans celui-ci (exceptée celle de l'anti-CDC42), cependant les concentrations diffèrent : anti-*phospho*-ezrine (1 :2000), anti-YAP (1 :100), anti-Rab11A (1 :20), anti-CDC42 (1 :20, PA1-092, Invitrogen).

Résultats

I. Article

Dans l'article suivant, nous avons notamment montré que les mutations d'*Ap1m2* dans les organoïdes murins induisent des défauts de polarité apico-basale, ainsi qu'une hyper-prolifération, ce qui est cohérent avec la littérature existante (Hase et al., 2013). En effet, dans les organoïdes *Ap1m2*, la *phospho*-ezrine, protéine de la bordure en brosse, est localisée au niveau du domaine apical et basolatéral, et l'Ephrin B2, protéine basolatérale, est également localisée au niveau apical. De plus, des lumières ectopiques, ainsi que la présence d'une bordure en brosse basale sur certaines cellules, ont été observées par MET. La localisation du déterminant de polarité CDC42 est aussi affectée, ce qui se traduit par une diminution de son ratio apico-cytoplasmique. La localisation apicale de l'aPKC (un autre membre du module de polarité apical), qui est sous le contrôle de Cdc42 (Nunes de Almeida et al., 2019), semble également affectée dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*. La localisation des endosomes de recyclage Rab11+, qui semblent nécessaires à la localisation apicale de CDC42 (Shafaq-Zadah et al., 2012), est perturbée de manière similaire à celle de CDC42. Ces résultats mettent donc en valeur de forts défauts de polarité et de trafic dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*. Ces défauts sont semblables à ceux déjà décrits chez la souris, ou chez *C. elegans* (Hase et al., 2013; Shafaq-Zadah et al., 2012).

L'hyper-prolifération a été identifiée à l'aide d'un marquage Ki67, marqueur de prolifération, en immunofluorescence. Cette hyper-prolifération s'accompagne d'une réduction de la largeur des cellules et d'une augmentation de leur longueur. La couche épithéliale est également désorganisée, ce qui se caractérise par un mauvais alignement des noyaux, ainsi que par l'apparition, de façon ponctuelle, de deux couches de cellules. Cette hyper-prolifération semble, au moins en partie, indépendante de la présence de ligands WNT. En effet, des cellules Ki67+ sont observées même quand

les organoïdes sont cultivés avec un inhibiteur de la production de ligands WNT. Les auteurs de l'étude sur la souris *Ap1m2*^{-/-} avaient mis en évidence une accumulation cytoplasmique de la E-cadhérine, ce qui entraînait une accumulation cytoplasmique de la β -caténine, suivie de sa translocation nucléaire (Hase et al., 2013). Nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence une telle accumulation cytoplasmique de l'E-cadhérine, malgré la présence de défauts d'organisation des jonctions cellulaires, suggérant l'implication d'autres mécanismes sous-tendant l'hyper-prolifération. Etant donné que la perte de *Cdc42* entraîne une hyperplasie intestinale chez la souris (Melendez, 2013; Zhang et al., 2022) à travers l'activation d'une voie de signalisation YAP-EGFR-mTOR (Zhang et al., 2022), nous avons décidé de tester l'implication de cette voie dans l'hyper-prolifération observée dans notre modèle.

Nous avons observé que l'expression nucléaire de YAP, caractérisée par immunofluorescence, est augmentée dans les cryptes des organoïdes mutés pour *Ap1m2*, ce qui est cohérent avec l'activation d'une voie de signalisation YAP-EGFR-mTOR. De plus, l'inhibition de la signalisation EGFR ou mTOR, par l'Afatinib ou la Rapamycine, respectivement, diminue fortement la prolifération des organoïdes mutés pour *Ap1m2*. Ces résultats montrent donc que l'hyper-prolifération induite par les mutations d'*Ap1m2* est dépendante des signalisations EGFR et mTOR. Cependant, l'inhibition de ces voies induit également une diminution de l'expression nucléaire de YAP, suggérant que cette accumulation se trouve en aval, plutôt qu'en amont, des signalisations EGFR et mTOR. L'hyper-prolifération provoquée par les mutations d'*Ap1m2* semble donc résulter de l'activation des voies EGFR-mTOR et YAP, activation qui serait induite par les défauts de localisation de CDC42.

Enfin, les mutations d'*Ap1m2* conduisent à des défauts importants de différenciation, notamment une expansion de la zone souche/progénitrice et une perturbation de la différenciation du lignage sécrétoire. En effet, des cellules Olfm4+, un marqueur de cellules souches et progénitrices (Liu and Rodgers, 2022), et des cellules Lysozyme+, un marqueur de cellules Paneth, sont observées en dehors des zones de cryptes dans une majorité des organoïdes mutés pour *Ap1m2*. L'inhibition des voies EGFR ou mTOR n'a pas d'effet sur la présence de cellules Lysozyme+ ectopiques, ce phénotype est donc indépendant de l'hyper-prolifération. Enfin, bien que le nombre total de cellules de Paneth et de cellules caliciformes ne semble pas être affecté, des cellules sécrétoires présentant un phénotype mixte ou intermédiaire sont observées en grand nombre. L'ensemble de ces résultats souligne le rôle important joué par AP-1B dans l'homéostasie intestinale, notamment dans la prolifération et la différenciation, à travers la régulation du trafic polarisé.

1 **The clathrin adaptor AP-1B independently controls proliferation and differentiation in**
2 **the mammalian intestine.**

3
4 Maela Duclos¹, Anne Bourdais^{1,*}, Ophélie Nicolle^{1,*}, Grégoire Michaux¹ and Aurélien
5 Bidaud-Meynard¹

6 ¹Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes) - UMR
7 6290, F-35000 Rennes, France

8 *Equal contribution

9 correspondence: gmichaux@univ-rennes1.fr or pbidaud@univ-rennes1.fr

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19 **Short title:** AP-1B plays multiple roles in small intestinal homeostasis.

20 **Keywords:** polarised sorting, AP-1B, intestine, proliferation, differentiation.

21 **Abbreviations:** AP-1B, Adaptor protein-subunit $\mu 2/\mu 1B$; EGF, Epidermal Growth Factor;
22 ISC, intestinal stem cells; mTOR, mechanistic target of rapamycin; YAP, yes-associated
23 protein 1.

24 **Abstract**

25 Maintenance of the polarity of the epithelial cells facing the lumen of the small
26 intestine is crucial to ensure the vectorial absorption of nutrients as well as the integrity of the
27 apical brush border and the intestinal barrier. Polarized vesicular trafficking plays a key role
28 in this process, and defective transport due to mutations in apical trafficking-related genes has
29 been shown to affect nutrient absorption. Interestingly, it has been demonstrated that
30 downregulation of the polarized sorting clathrin adaptor AP-1B led to both epithelial polarity
31 and proliferation defects in the mouse intestine. This enlightened a new function of polarized
32 trafficking in the gut epithelium and a novel link between trafficking, polarity, and
33 proliferation. Here, using CRISPR-Cas9-mediated mutation of the AP-1B coding gene *Ap1m2*
34 in mouse intestinal organoids, we uncovered a novel proliferation pathway controlled by AP-
35 1B. We showed that the polarity defects induced by *Ap1m2* mutations led to a defective apical
36 targeting of both Rab11⁺ apical recycling endosomes and of the polarity determinant Cdc42.
37 Moreover, we showed that these polarity defects were accompanied by an induction of YAP
38 and EGFR/mTOR-dependent proliferation pathways. Finally, we showed that AP-1B
39 additionally controlled a proliferation-independent differentiation pathway towards the
40 secretory lineage. Overall, our results highlighted the pleiotropic roles played by AP-1B in the
41 homeostasis of the gut epithelium.

42 **Introduction**

43 Intestinal cells lining the gut lumen are constantly renewed by the treadmilling
44 process of new cells arising from the proliferation of Lgr5⁺ intestinal stem cells (aka crypt-
45 based columnar cells) and death of terminally differentiated cells at the top of the villus
46 (Gehart and Clevers, 2019). The proliferation of intestinal stem cells (ISC) is controlled by
47 niche factors emanating from both the neighbouring Paneth cells and mesenchymal cells
48 secreting proliferative factors such as Wnt and the Wnt pathway agonist R-Spondin, as well as
49 Epidermal Growth Factor (EGF) (Crosnier et al., 2006). Notably, varying exposure of cells in
50 the transit-amplifying zone migrating towards the villus to niche gradients (e.g. Wnt, Notch)
51 allows their differentiation into the different types of absorptive and secretory lineages of the
52 small intestine (Beumer and Clevers, 2021). Among these cells, the major type is the
53 enterocytes that bear a so-called brush border made of an array of microvilli increasing the
54 membrane surface for nutrient absorption (Delacour et al., 2016).

55 The maintenance of the strong polarity of enterocytes is essential to ensure the
56 vectorial transport of nutrients from the lumen to the blood vessels located in the underlying
57 connective tissue. Polarized trafficking plays a major role in this maintenance and disturb
58 trafficking to the apical membrane has been linked to major absorption defects, such as
59 Microvillus inclusion disease (Schneeberger et al., 2018). Besides direct brush border defects,
60 missense mutations in the gene coding a subunit of the AP-1 complex has been linked to an
61 enteropathy through intestinal barrier defects (Klee et al., 2020). AP-1 is a clathrin adaptor
62 tetrameric complex made of four subunits (two large subunits (β , γ), one medium subunit (μ 1)
63 and one small subunit (σ 1)) (Nakatsu et al., 2014). Among them, the function of the epithelia-
64 specific μ 1B/ μ 2 subunit has been extensively studied in the basolateral targeting of membrane
65 proteins (Fölsch et al., 2001; Gan et al., 2002; Gravotta et al., 2007). Furthermore, we and the
66 group of Verena Gobel showed that AP-1 also mediates the sorting of apical cargoes in *C.*

67 *C. elegans* intestinal cells (Shafaq-Zadah et al., 2012; Zhang et al., 2012), a function that has
68 been confirmed in both cell culture and mouse models (Caceres et al., 2019; Hase et al.,
69 2013). Notably, the polarized sorting defects induced by AP-1 subunits silencing resulted in
70 the contralateral mislocalization of both transmembrane proteins and apical polarity
71 determinants (e.g. Cdc42, PAR-6, PAR-3, aPKC) as well as in the apicalization of the
72 enterocyte lateral membrane (i.e. ectopic lumen) (Hase et al., 2013; Shafaq-Zadah et al.,
73 2012). Interestingly, it has been shown that *Ap1m2* knockout in mouse also induced a crypt
74 hyperplasia, which enlightened a putative crosstalk between apical trafficking, cell polarity
75 and proliferation in the gut. Here, we used CRISPR-Cas9-mediated mutation of *Ap1m2* in
76 mouse intestinal organoids to study the relationship between cell polarity, proliferation, and
77 differentiation in the mammalian intestine.

78 **Results and discussion**

79 ***Ap1m2* mutations induce strong polarity defects in mouse intestinal organoids.**

80 In order to assess the role of AP-1B in intestinal cells integrity, *Ap1m2* gene, encoding
81 the μ 1B/ μ 2 subunit, was knocked down by conditional CRISPR-Cas9-mediated mutation in
82 organoids (Bidaud-Meynard et al., 2022; Jad et al., 2022). Sanger sequencing of the genomic
83 DNA of CRISPR-edited organoids using Inference CRISPR Edits software (Conant et al.,
84 2022) showed that ~82% of *Ap1m2* organoids were mutated, with half of the mutations
85 inducing a single deletion of a guanosine located 5' of the PAM site (Fig. 1A and
86 Supplementary Fig. 1A). AP-1B is a renown sorting factor for basolateral proteins bearing di-
87 leucin or tyrosine-based signals (Fölsch et al., 1999) and has recently been involved in apical
88 targeting (Caceres et al., 2019; Hase et al., 2013; Shafaq-Zadah et al., 2012; Zhang et al.,
89 2012), making it a major player of apicobasal polarity in epithelia. To verify this in fully
90 polarized enterocytes, the organoids culture medium was supplemented with valproic acid and
91 inhibitor of Wnt protein 2 (IWP2), as described before (Bidaud-Meynard et al., 2022; Mosa et
92 al., 2018). As expected, *Ap1m2* mutations induced a mispolarization of the brush border
93 component phospho-ezrin, which accumulated at both apical and lateral membranes (Fig. 1B-
94 C). This partial polarity inversion was also obvious by analysing the organoids by
95 transmission electron microscopy (TEM), which revealed lateral ectopic lumen as well as
96 regions of the enterocyte monolayer with a brush border located both at the apical and basal
97 poles (Fig. 1D-F). In *C. elegans*, we found that these polarity defects are the consequence of
98 the cytoplasmic dispersion of Rab11⁺ endosomes and a mistargeting of the polarity
99 determinant Cdc42, that has been shown to be targeted to the plasma membrane through
100 apical trafficking (Osmani et al., 2010). Mislocalised Cdc42 consequently recruited the other
101 members of the Cdc42/PAR apical polarity module (PAR-3, PAR-6 and PKC-3) at the lateral
102 membrane to convert it into an apical pole (Shafaq-Zadah et al., 2012). As ectopic lumens

103 were observed upon *Ap1m2* mutation in organoids (Fig. 1E), we then assessed whether the
104 same apical trafficking pathway is disrupted in organoids. Rab11 and Cdc42 immunostaining
105 as well as PKC ζ Immunohistochemistry (IHC) labelling showed a decreased apical
106 confinement of all these factors and Rab11 endosomes were often detected at the lateral
107 membrane (Fig. 1H-L). This suggested that the mechanisms by which AP-1B controls the
108 apical polarity of intestinal cells are conserved in mammals. Moreover, TEM also revealed
109 dilated Trans Golgi Network and abundant associated vesicles, multivesicular bodies and
110 lysosomes (Supplementary Fig. 1B and Supplementary Table 1). Hence, these results
111 confirmed the strong trafficking and polarity defects in *Ap1m2* CRISPR-edited organoids.

112 ***Ap1m2* mutations induce an hyperproliferation in mouse intestinal organoids.**

113 In addition to apicobasal polarity, *Ap1m2* knockout in mouse additionally induced a
114 crypt hyperplasia (Hase et al., 2013). To confirm this in our model, the proliferation of
115 intestinal cells was measured using Ki67 staining in organoids cultured in normal
116 EGF/Noggin/R-spondin1 (ENR) medium (i.e., presenting both crypt and villus-like regions)
117 (Sato et al., 2011). *Ap1m2* mutations induced a 2-fold over-proliferation of intestinal cells
118 compared to control organoids (Fig. 2A-B). This hyperplasia was correlated with a stacking of
119 the cells which became thinner and longer (Figs 1G and 2C). The enterocyte monolayer was
120 also dramatically disturbed, with a misalignment of nuclei and intertwined cells (Figs 1F and
121 2C). Furthermore, we observed intercellular junctions defects with many holes between cells
122 (Figs 1G and 2C) as well as disturb adherens and tight junctions organization (Fig. 2D), as
123 already reported upon AP-1 complex subunits downregulation (Hase et al., 2013; Klee et al.,
124 2020). However, while cell-cell junctions were clearly affected, we were unable to observe
125 the dotted cytoplasmic accumulation of E-Cadherin (Hase et al., 2013). This data favoured a
126 pathway in which E-Cadherin intracellular displacement freed β -catenin that accumulated
127 intracellularly and activated downstream proliferation targets (Hase et al., 2013).

128 Furthermore, while Wnt pathway inhibition with IWP-2 completely effaced the crypts to only
129 leave differentiated enterocytes and goblet cells in control organoids, crypt-like structures and
130 Ki67⁺ proliferating cells persisted in *Ap1m2*-mutated organoids (Fig. 2F-H and
131 Supplementary Fig. 1C-D). This suggests that the activation of the β -catenin pathway
132 described earlier might still rely on mesenchymal Wnt signals, which are very important for
133 small intestine proliferation and homeostasis in the context of the organ (Valenta et al., 2016),
134 and that additional intestine-autonomous proliferation pathway(s) may be induced upon
135 *Ap1m2* mutations. Moreover, we observed that the polarity defects induced by *Ap1m2*
136 mutations, such as the formation of ectopic lateral lumen and the contralateral mislocalization
137 of the apical and basolateral proteins P-ezrin and EphrinB2, respectively, were also observed
138 in proliferating organoids (Fig. 2I-K). Considering that both *Cdc42* and *Rab11* knockout also
139 induced an intestinal cells hyperplasia in mice (D'Agostino et al., 2019; Melendez et al.,
140 2013; Zhang et al., 2022), these results raised the possibility that *Ap1m2* mutations induced an
141 additional, mesenchyme-independent, proliferative pathway that could be linked to Cdc42
142 polarity defects.

143 ***Ap1m2* mutations-induced hyperproliferation involves YAP and EGFR/mTOR.**

144 To test this hypothesis, we stained Cdc42 in organoids edited with two different
145 sgRNAs targeting *Ap1m2*. We found that Cdc42 apical localization also decreased in
146 normally cultured, proliferating organoids (Fig. 3A). It has recently been shown that Rab11 is
147 involved in the targeting of the Hippo signalling factor Yes-associated protein (YAP), and
148 that *Cdc42* silencing in mouse intestine induced an hyperplasia through YAP-EGF-mTOR
149 signalling (Goswami et al., 2021; Zhang et al., 2022). Notably, this pathway led to an initial
150 increase of nuclear YAP expression by inhibiting its ubiquitin-dependent proteolysis (Zhang
151 et al., 2022). Interestingly, YAP nuclear expression in crypts increased by 1.5-fold upon
152 *Ap1m2* mutations, which indicated that the YAP-EGFR-mTOR pathway could be enhanced

153 (Fig. 3B-C). To verify this, the proliferation of intestinal cells was measured upon treatment
154 of the organoids with the EGFR and mTOR signalling inhibitors Afatinib and Rapamycin,
155 respectively. Remarkably, both treatments rescued the proliferation of *Ap1m2*-mutated
156 organoids to control levels (Fig. 3D-E) which confirmed that AP-1B also controls intestinal
157 cells proliferation through YAP, EGFR and mTOR. Surprisingly, while *Cdc42* knockout has
158 been proposed to induce EGFR and mTOR proliferative pathways as a consequence of an
159 increased expression of YAP (Zhang et al., 2022), the accumulation of YAP was also
160 cancelled by Afatinib and Rapamycin treatment (Fig. 3F-G). This suggests either the
161 existence of positive feedback loops, or that YAP acts downstream of the mTOR pathway, as
162 proposed before (Liang et al., 2014) or, finally, that YAP and EGFR pathways are induced in
163 parallel. Indeed, in addition to YAP, Rab11 has been shown to mediate the membrane
164 localization of Merlin, a YAP and cortical actin regulator that has also been involved in the
165 control of EGFR signalling (Curto et al., 2007; Goswami et al., 2021). Furthermore, while
166 Afatinib but not Rapamycin also slightly decreased the proliferation of control organoids by
167 1,5-fold, it dramatically inhibited *Ap1m2*-mediated overproliferation (~8.3 fold)
168 (Supplementary Fig. 1E-F). Hence, these results suggest that *Ap1m2* mutations lead to an
169 hyperproliferation of intestinal cells by displacing *Cdc42* from the apical membrane and
170 activating YAP and EGF-mTOR-dependent proliferation pathway(s).

171 ***Ap1m2* mutations induced major and proliferation-independent differentiation defects.**

172 Besides the defects observed in the arrangement of cells within the monolayer and in
173 the enterocytes' polarity, we observed that *Ap1m2* mutations induced severe differentiation
174 defects. Indeed, *Olfm4*⁺ ISCs and *Lysozyme*⁺ Paneth cells, which are normally confined in the
175 crypt, invaded the villus region of *Ap1m2*-mutated organoids (Fig. 4A-D). Furthermore, TEM
176 analysis of the secretory cells revealed the presence of cells with a mixed zymogen/mucigen
177 content - while the number of normal goblet and Paneth cells remained unchanged - upon

178 *Ap1m2* gene editing (Fig. 4E-K and Supplementary Table 1), thus demonstrating a strong
179 defect in secretory lineage differentiation. Interestingly, this rare phenotype, together with the
180 invasion of the villus by Paneth cells, were also observed upon *Cdc42* knockout in mouse
181 (Melendez et al., 2013). Of note, the invasion of the villus by Paneth and ISCs was not
182 affected by Rapamycin nor Afatinib treatment, which indicated that these differentiation
183 defects are independent of the YAP/EGF/mTOR proliferation pathways induced by *Ap1m2*-
184 mutations (Fig. 4L-M). These results corroborate previous data showing that inhibition of
185 EGFR signalling affected the proliferation but not the differentiation into goblet and Paneth
186 cells (Basak et al., 2017). Further studies would be required to understand how AP-1B
187 controls the differentiation of the secretory lineage in the intestine. This might rely on an
188 imbalance of Wnt and Notch signals, which are crucial in determining the fate of secretory
189 cells (Beumer and Clevers, 2021), and whose receptors' membrane targeting is controlled by
190 the AP-1 complex (Benhra et al., 2011; Wieffer et al., 2013). Overall, our results highlight the
191 major roles played by AP-1B in the homeostasis of the small intestine cells, by regulating
192 polarized trafficking, proliferation as well as differentiation (Fig. 4N) and confirm that AP-1B
193 is essential for apical trafficking.

194 **Material and Methods**

195 **Materials**

196 Afatinib and Rapamycin were purchased from Chemietek (CT-BW2992) and APExBIO
197 (A8167), respectively.

198 **Organoid culture**

199 Intestinal crypts were cultured in drops of Cultrex Reduced Growth Factor Basement
200 Membrane Extract type 2 (BME2, 3533-010-02, Bio-technie) seeded on 12-well Greiner Cell
201 STAR multiwell low retention plates with ENR medium (Advanced DMEM/F12 (Gibco), 10
202 mM Hepes (15630056), 5 ml Glutamax (35050-038), 5 ml Penicillin/Streptomycin, 1X B27
203 supplement (17504-044) (all from Life technologies), 1.25 mM N-acetylcysteine (A9165,
204 Sigma-Aldrich), 50 ng/mL hEGF (AF-100-15, Peprotech), 5% R-Spondin1 and 10% Noggin
205 conditioned media (produced as described (Sato et al., 2011)). Medium was changed every 2-
206 3 days and organoids were passaged by mechanical disruption every 7 days. Gene mutation
207 was induced 4 days after organoid passage during 6 days with 400 ng/ml doxycycline (D9891,
208 Sigma-Aldrich). When indicated, full differentiation of the organoids was achieved by a
209 concomitant treatment for 6 days with 1 mM valproic acid (P4543, Sigma-Aldrich), with the
210 addition of 2.5 mg/mL inhibitor of WNT production-2 (IWP-2, I0536, Sigma-Aldrich) for the
211 last 3 days, as described (Mosa et al., 2018). Absence of mycoplasma was checked regularly.

212 **Conditional gene knock out by CRISPR-Cas9**

213 Organoids were transduced in a two-step manner with Edit-R lentiviral inducible Cas9
214 nuclease and pre-designed sgRNAs lentiviral particles (Horizon discovery, Cambridge, UK)
215 as described earlier (Jad et al., 2022). The target sequences of the sgRNAs targeting *Ap1m2*
216 were: 5'ACACGATGACGAAGTTGTCC3' for sgRNA1 and
217 5'CTGATTAGCCGAAACTACAA3' for the sgRNA2. Non-targeting sgRNA#1
218 (VSGC10215) was used to generate control organoids. Transduced organoids were selected

219 with 5 μ g/ml Blasticidin (CAS9) or 3 μ g/ml Puromycin (sgRNAs). The % of indels was
220 calculated using the ICE software (Conant et al., 2022) after Sanger sequencing of the
221 organoids' genomic DNA.

222 **Transmission Electron Microscopy**

223 Organoids were collected from BME2 and fixed in Trump's fixative at 4°C. Enhanced
224 chemical fixation was performed in 4% paraformaldehyde/2.5% glutaraldehyde in cacodylate
225 buffer (0.1 M, pH 7.4) overnight at 4°C. Then, organoids were incubated successively in 1%
226 OsO₄ for 1.5h and 2% uranyl acetate for 1.5h, at RT. Organoids were then dehydrated
227 through graded ethanol solutions, cleared in acetone, and flat-embedded in Epon-Araldite mix
228 (EMS hard formula) using adhesive frames (11560294 GENE-FRAME 65 μ L, Thermo Fisher
229 Scientific). Ultrathin 70 nm sections were cut on an ultramicrotome (UC7; Leica
230 Microsystems) and collected on formvar-coated slot grids (FCF2010-CU, EMS). TEM grids
231 were observed using a JEM-1400 TEM (JEOL) operated at 120 kV, equipped with a Gatan
232 Orius SC1000 camera piloted by the Digital Micrograph 3.5 program (Gatan).

233 **Immunohistochemistry**

234 Organoids were collected from BME2, fixed in 2% paraformaldehyde overnight at 4°C and
235 washed in PBS 1X. Then, pelleted organoids were resuspended in 2 drops of Shandon
236 Cytoblock Cell Block reagent (ThermoScientific) and embedded in paraffin wax with
237 Excelsior ES50 during 3h. Paraffin-embedded organoid blocks were cut at 4 μ m thickness,
238 mounted on positively charged glass slides and dried at 58°C for 60 min. The slides were then
239 deparaffinized with xylene (3x10 min) and successive 100%-75%-50% ethanol baths (5 min
240 each) before rehydration in water for 5 min. Immunohistochemical staining was performed on
241 a Discovery Automated IHC Stainer. First, antigen retrieval was performed using Tris-based
242 buffer solution CC1 at 95–100°C for 48 min. Then, endogen peroxidase was blocked with
243 Inhibitor-D/3% H₂O₂ for 8 min at 37°C. After rinsing, slides were incubated at 37°C for 60

244 min with anti-Cdc42 (1:50, ab64533, Abcam) and anti-phospho-ezrin (1:2000, ab47293,
245 Abcam) primary antibodies. After rinsing, signal enhancement was performed using the
246 Ventana DABMap (for horse anti-rabbit HRP) or OMNIMap (for goat anti-mouse/rabbit HRP
247 or donkey anti-Goat HRP) detection kits (Ventana Medical Systems). Slides were then
248 counterstained with haematoxylin (16 min) and bluing reagent (4 min) and rinsed before
249 being manually dehydrated and coverslipped. Imaging was performed using an Hamatsu
250 scanner (Nanozoomer 2.0RS/ C10730-12) and the images were analysed with NDP viewer.

251 **Immunostaining**

252 For immunostaining on whole organoids, they were collected from BME2 and fixed in 2%
253 PFA/PBS overnight at 4°C. For immunostaining on organoid slices, 4 µm paraffin bloc
254 sections were mounted on slides before deparaffination in Xylene (3x10 min) and successive
255 100%-75%-50% Ethanol baths (5 min each). After rehydration in water for 5 min, antigen
256 retrieval was performed with Tris-EDTA, pH8 (98°C, 40 min). Then, both organoids 4 µm
257 slices and whole organoids in microtubes were permeabilized in PBS1X, 0,1% Tween20,
258 0,2% Triton (20 min at room temperature under rotation) and incubated overnight at 4°C in
259 blocking solution (PBS1X, 0.1% tween 20, 2% FBS) with primary antibodies. Whole
260 organoids were incubated with anti-Ki67 (1:100, 14-5698-82, Invitrogen), anti-EphB2 (1:100,
261 AF467-SP, Biotechne), anti-YAP (1:100, 14074, Cell signalling), anti-Olfm4 (1:400, 39141,
262 Cell signalling), anti-lysozyme (1:100, A0099, Agilent). Organoid slices were incubated with
263 anti-phospho-ezrin (1:200, ab47293, Abcam), anti-Rab11A (1:100, 71-5300, Invitrogen), anti-
264 Cdc42 (1:50, ab64533, Abcam), and anti-E-cadherin (1:200, 24E10, Cell signalling). Then,
265 organoids were incubated with adequate fluorescent secondary antibodies (Jackson
266 ImmunoResearch) during 1h at room temperature before mounting in ProLong Gold Antifade
267 reagent (P36941, Life Technologies). F-Actin was stained using Actistain (1:150,
268 Cytoskeleton) for 1h at room temperature. Imaging was performed on a Zeiss LSM880-

269 Airyscan (Oberkochen, Germany) equipped with a 63X, 1.4 NA objective (Zen Black
270 software) and images were analysed using Fiji.

271 **Quantification and statistical analysis**

272 The nuclear accumulation of Ki67 and YAP was quantified by measuring the signal on a
273 nuclear overlay obtained after nuclear segmentation using the DAPI channel in Fiji and was
274 divided by the signal of the same overlay in the Dapi channel to correct for signal differences
275 due to the varying distance between the cells and the objective. The apical/cytoplasmic ratio
276 of markers was calculated by measuring the signal intensity of a line covering the apical
277 membrane and measuring the signal intensity of an identical ROI in the underlying cytoplasm.
278 Gaussian distribution and homoscedasticity of data were verified by the Shapiro-Wik test and
279 the F-test, respectively. Mann-Whitney non-parametric test was performed using GraphPad
280 software.

281 **Funding**

282 This work was supported by La Ligue contre le cancer Grand Ouest (35/85) to GM and ABM
283 and La Ligue contre le cancer Grand Ouest (29/35/85) to GM. GM laboratory also received
284 institutional funding from CNRS and Université de Rennes.

285 **Disclosures**

286 The authors disclose no conflicts of interest.

287 **Acknowledgments**

288 We thank Hans Clevers for the Noggin and R-Spondin1 expressing cells and Justine Viet for
289 her help with CRISPR-Cas9-mediated mutations analysis. IHC and imaging were performed
290 at the Histo Pathology High Precision (H2P2) and the Microscopy Rennes Imaging Centre
291 (MRiC) facilities of the UMS Biosit, member of the national infrastructure France-
292 BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04).

293 References

- 294 **Basak, O., Beumer, J., Wiebrands, K., Seno, H., van Oudenaarden, A. and Clevers, H.**
295 (2017). Induced Quiescence of Lgr5+ Stem Cells in Intestinal Organoids Enables
296 Differentiation of Hormone-Producing Enteroendocrine Cells. *Cell Stem Cell* **20**, 177-
297 190.e4.
- 298 **Benhra, N., Lallet, S., Cotton, M., Le Bras, S., Dussert, A. and Le Borgne, R.** (2011). AP-
299 1 controls the trafficking of Notch and Sanpodo toward E-cadherin junctions in
300 sensory organ precursors. *Curr. Biol. CB* **21**, 87–95.
- 301 **Beumer, J. and Clevers, H.** (2021). Cell fate specification and differentiation in the adult
302 mammalian intestine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **22**, 39–53.
- 303 **Bidaud-Meynard, A., Nicolle, O., Bourdais, A., Duclos, M., Saleh, J., Ruemmele, F.,
304 Farin, H. F., Delacour, D., Moshous, D. and Michaux, G.** (2022). V0-ATPase
305 downregulation induces MVID-like brush border defects independently of apical
306 trafficking in the mammalian intestine. 2022.11.04.515188.
- 307 **Caceres, P. S., Gravotta, D., Zager, P. J., Dephoure, N. and Rodriguez-Boulan, E.**
308 (2019). Quantitative proteomics of MDCK cells identify unrecognized roles of clathrin
309 adaptor AP-1 in polarized distribution of surface proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*
310 *A.* **116**, 11796–11805.
- 311 **Conant, D., Hsiau, T., Rossi, N., Oki, J., Maures, T., Waite, K., Yang, J., Joshi, S., Kelso,
312 R., Holden, K., et al.** (2022). Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data.
313 *CRISPR J.* **5**, 123–130.
- 314 **Crosnier, C., Stamatakis, D. and Lewis, J.** (2006). Organizing cell renewal in the intestine:
315 stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 349–359.
- 316 **Curto, M., Cole, B. K., Lallemand, D., Liu, C.-H. and McClatchey, A. I.** (2007). Contact-
317 dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J. Cell Biol.* **177**, 893–903.
- 318 **D’Agostino, L., Nie, Y., Goswami, S., Tong, K., Yu, S., Bandyopadhyay, S., Flores, J.,
319 Zhang, X., Balasubramanian, I., Joseph, I., et al.** (2019). Recycling Endosomes in
320 Mature Epithelia Restrain Tumorigenic Signaling. *Cancer Res.* **79**, 4099–4112.
- 321 **Delacour, D., Salomon, J., Robine, S. and Louvard, D.** (2016). Plasticity of the brush
322 border - the yin and yang of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*
323 **13**, 161–174.
- 324 **Fölsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J. S. and Mellman, I.** (1999). A Novel Clathrin Adaptor
325 Complex Mediates Basolateral Targeting in Polarized Epithelial Cells. *Cell* **99**, 189–
326 198.
- 327 **Fölsch, H., Pypaert, M., Schu, P. and Mellman, I.** (2001). Distribution and function of AP-
328 1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **152**, 595–606.

- 329 **Gan, Y., McGraw, T. E. and Rodriguez-Boulan, E.** (2002). The epithelial-specific adaptor
330 AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane. *Nat. Cell Biol.*
331 **4**, 605–609.
- 332 **Gehart, H. and Clevers, H.** (2019). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem
333 cells. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 19–34.
- 334 **Goswami, S., Balasubramanian, I., D’Agostino, L., Bandyopadhyay, S., Patel, R.,**
335 **Avasthi, S., Yu, S., Goldenring, J. R., Bonder, E. M. and Gao, N.** (2021).
336 RAB11A-mediated YAP localization to adherens and tight junctions is essential for
337 colonic epithelial integrity. *J. Biol. Chem.* **297**, 100848.
- 338 **Gravotta, D., Deora, A., Perret, E., Oyanadel, C., Soza, A., Schreiner, R., Gonzalez, A.**
339 **and Rodriguez-Boulan, E.** (2007). AP1B sorts basolateral proteins in recycling and
340 biosynthetic routes of MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 1564–1569.
- 341 **Hase, K., Nakatsu, F., Ohmae, M., Sugihara, K., Shioda, N., Takahashi, D., Obata, Y.,**
342 **Furusawa, Y., Fujimura, Y., Yamashita, T., et al.** (2013). AP-1B-mediated protein
343 sorting regulates polarity and proliferation of intestinal epithelial cells in mice.
344 *Gastroenterology* **145**, 625–635.
- 345 **Jad, S., Marc-Antoine, F., Olivia, F., Matis, S., Cécile, G., Hongyue, C., Tien, D.,**
346 **Gaudin, N., Audrey, V., Nicolas, M., et al.** (2022). Length-limitation of astral
347 microtubules orients cell divisions in intestinal crypts. 2022.09.02.506333.
- 348 **Klee, K. M. C., Janecke, A. R., Civan, H. A., Rosipal, Š., Heinz-Erian, P., Huber, L. A.,**
349 **Müller, T. and Vogel, G. F.** (2020). AP1S1 missense mutations cause a congenital
350 enteropathy via an epithelial barrier defect. *Hum. Genet.* **139**, 1247–1259.
- 351 **Liang, N., Zhang, C., Dill, P., Panasyuk, G., Pion, D., Koka, V., Gallazzini, M., Olson, E.**
352 **N., Lam, H., Henske, E. P., et al.** (2014). Regulation of YAP by mTOR and
353 autophagy reveals a therapeutic target of tuberous sclerosis complex. *J. Exp. Med.*
354 **211**, 2249–2263.
- 355 **Melendez, J., Liu, M., Sampson, L., Akunuru, S., Han, X., Vallance, J., Witte, D.,**
356 **Shroyer, N. and Zheng, Y.** (2013). Cdc42 coordinates proliferation, polarity,
357 migration, and differentiation of small intestinal epithelial cells in mice.
358 *Gastroenterology* **145**, 808–819.
- 359 **Mosa, M. H., Nicolle, O., Maschalidi, S., Sepulveda, F. E., Bidaud-Meynard, A., Menche,**
360 **C., Michels, B. E., Michaux, G., de Saint Basile, G. and Farin, H. F.** (2018).
361 Dynamic Formation of Microvillus Inclusions During Enterocyte Differentiation in
362 Munc18-2-Deficient Intestinal Organoids. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **6**, 477-
363 493.e1.
- 364 **Nakatsu, F., Hase, K. and Ohno, H.** (2014). The Role of the Clathrin Adaptor AP-1:
365 Polarized Sorting and Beyond. *Membranes* **4**, 747–763.
- 366 **Osmani, N., Peglion, F., Chavrier, P. and Etienne-Manneville, S.** (2010). Cdc42
367 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *J. Cell Biol.* **191**, 1261–
368 1269.

- 369 **Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G. J., Es, J. H. van, Brink, S. van den,**
370 **Houdt, W. J. van, Pronk, A., Gorp, J. van, Siersema, P. D., et al.** (2011). Long-
371 term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma,
372 Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium. *Gastroenterology* **141**, 1762–1772.
- 373 **Schneeberger, K., Roth, S., Nieuwenhuis, E. E. S. and Middendorp, S.** (2018). Intestinal
374 epithelial cell polarity defects in disease: lessons from microvillus inclusion disease.
375 *Dis. Model. Mech.* **11**, dmm031088.
- 376 **Shafaq-Zadah, M., Brocard, L., Solari, F. and Michaux, G.** (2012). AP-1 is required for
377 the maintenance of apico-basal polarity in the *C. elegans* intestine. *Dev. Camb. Engl.*
378 **139**, 2061–2070.
- 379 **Valenta, T., Degirmenci, B., Moor, A. E., Herr, P., Zimmerli, D., Moor, M. B.,**
380 **Hausmann, G., Cantù, C., Aguet, M. and Basler, K.** (2016). Wnt Ligands Secreted
381 by Subepithelial Mesenchymal Cells Are Essential for the Survival of Intestinal Stem
382 Cells and Gut Homeostasis. *Cell Rep.* **15**, 911–918.
- 383 **Wieffer, M., Cibrián Uhalte, E., Posor, Y., Otten, C., Branz, K., Schütz, I., Mössinger, J.,**
384 **Schu, P., Abdelilah-Seyfried, S., Krauß, M., et al.** (2013). PI4K2 β /AP-1-Based
385 TGN-Endosomal Sorting Regulates Wnt Signaling. *Curr. Biol.* **23**, 2185–2190.
- 386 **Zhang, H., Kim, A., Abraham, N., Khan, L. A., Hall, D. H., Fleming, J. T. and Gobel, V.**
387 (2012). Clathrin and AP-1 regulate apical polarity and lumen formation during *C.*
388 *elegans* tubulogenesis. *Dev. Camb. Engl.* **139**, 2071–2083.
- 389 **Zhang, Z., Zhang, F., Davis, A. K., Xin, M., Walz, G., Tian, W. and Zheng, Y.** (2022).
390 CDC42 controlled apical-basal polarity regulates intestinal stem cell to transit
391 amplifying cell fate transition via YAP-EGF-mTOR signaling. *Cell Rep.* **38**, 110009.
- 392

393 **Figure legends**

394 **Figure 1: *Ap1m2* mutations induced polarity defects in fully differentiated organoids.**

395 (A) Analysis by Sanger sequencing of the genomic DNA of *Ap1m2* CRISPR-edited organoids
396 (sg1 sgRNA). The histogram shows the mean \pm SD of the repartition of indels found in the
397 organoid population (N=2 independent experiments). (B-C) Phospho-Ezrin (p-Ezrin) staining
398 in control or *Ap1m2* organoids. (B) shows representative images and (C) the quantification of
399 the lateral p-Ezrin grey intensity, expressed in fold change (N=4 independent experiments).
400 (D-G) Control and *Ap1m2* organoids were analysed by TEM. The arrow and the arrowhead
401 show brush borders at the basal and lateral membranes, respectively. Lateral membranes in
402 (E) are highlighted in blue. (H-K) Immunofluorescence staining of Rab11 endosomes (H) and
403 Cdc42 (I) in Control (CTL) and *Ap1m2* organoids. Inserts in (H, I) represent fire-LUT
404 coloured magnified images of the indicated apical ROIs (arrows). The arrowhead in (H)
405 shows the lateral localization of Rab11. Panels (J-K) show the quantification of Rab11 and
406 Cdc42 apical/cytoplasmic ratio in fold change (from 3 and 4 independent experiments,
407 respectively). (L) IHC analysis of PKC ζ in Control and *Ap1m2* organoids. The total number
408 of organoids analysed is indicated in brackets, ****p<0.0001, Mann-Whitney test. Scale bars,
409 10 μ m (B, H-I, L) and 5 μ m (D-G).

410 **Figure 2: *Ap1m2* mutations induced an hyperproliferation in mouse SI organoids.**

411 (A-B) Immunofluorescence staining of Ki67 in Control (CTL) and *Ap1m2* organoids. (A)
412 shows representative z-projections and (B) the quantification of Ki67/DAPI mean grey
413 intensity ratio, expressed in fold change (N = 11 independent experiments). (C-D) TEM
414 images of normally grown proliferative Control and *Ap1m2* organoids. Arrowheads highlight
415 the holes between cells. (D) shows a focus on cell-cell junctions. D, desmosome; AJ,
416 adherence junctions; TJ, tight junctions. (E) Immunofluorescence staining of E-Cadherin
417 (magenta), F-actin (yellow) and Dapi in Control and *Ap1m2* organoids. Arrows indicate cell-
418 cell junctions. (F) Haematoxylin-Eosin-Saffron (HES) staining of control and *Ap1m2*
419 organoids cultured in normal ENR or full-differentiation (ENR+VPA+IWP-2) mediums.
420 Arrowheads show intestinal crypts. (G-H) Immunofluorescence staining of Ki67 in fully
421 differentiated Control (CTL) and *Ap1m2* organoids. (H) shows the quantification of Ki67⁺
422 cells/organoid. (I) *Ap1m2* organoids cultured in normal ENR also present ectopic lateral
423 lumen (arrow), analysed by TEM. Lateral membranes are highlighted in blue. (J)
424 Immunofluorescence staining of Ephrin B2 in control and *Ap1m2* organoids. Arrows and the
425 arrowhead indicate the basolateral and the apical membranes, respectively. (K) IHC staining
426 of p-Ezrin in control and *Ap1m2* organoids. Arrows show the apical membrane and
427 arrowheads show the basolateral accumulation of P-ezrin. Inserts highlight the crypt and
428 villus regions indicated by dashed lines. The total number of organoids examined is indicated
429 in brackets, ****p<0.0001, Mann-Whitney test. Scale bar, 50µm (F, G, K) or 10µm (E, J).

430 **Figure 3. *Ap1m2* mutations induced a Cdc42, YAP and EGFR/mTOR-dependent**
431 **hyperproliferation.**

432 (A) IHC staining of Cdc42 in control and *Ap1m2*-mutated organoids. sg1 and sg2 indicate
433 organoids where *Ap1m2* has been edited with two different sgRNAs. The arrowheads show
434 the apical membrane in the inserts, that are magnified images of the indicated ROIs. (B-C)
435 Immunofluorescence staining of YAP in control (CTL) and *Ap1m2* organoids. (B) is a
436 representative z-projection and (C) is the quantification of the nuclear YAP/DAPI mean grey
437 intensity ratio expressed in fold change (N=7 independent experiments). (D-G) Quantification
438 of Ki67/DAPI (D-E) and YAP/DAPI (F-G) ratios in control (CTL) and *Ap1m2* organoids
439 treated with 200nM Afatinib (afa) (N=6 independent experiments) or 1 μ M Rapamycin (rapa)
440 for 3 days (N=7 independent experiments). The total number of organoids analysed is
441 indicated in brackets, *p<0,05, **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001, unpaired Mann-
442 Whitney test. Scale bar, 50 μ m.

443 **Figure 4: *Ap1m2* mutations affect progenitors' distribution and secretory lineage**
444 **differentiation.**

445 (A) Immunofluorescence staining of *Olfm4* in Control (CTL) and *Ap1m2* organoids. (A)
446 shows representative images and (B) the quantification of the % of organoids displaying
447 *Olfm4*⁺ cells outside the crypts (N = 4 independent experiments). (C-D) Immunofluorescence
448 staining of Lysozyme in control (CTL) and *Ap1m2* organoids. (C) shows representative
449 images and (D) the quantification of the % of organoids displaying Lysozyme⁺ cells (N = 9
450 independent experiments). In (A, C) crypts and villus-like regions are delineated in white and
451 magenta, respectively. (E-H) Secretory cells were observed by TEM, showing Paneth (E,
452 arrow), Goblet (E, arrows) as well as intermediate mixed cells (G, H). Arrowheads show the
453 mixed zymogen/mucigen content of intermediate cells. (I-K) Quantification of the number of
454 Goblet (I), Paneth (J) et intermediate mixed cells (K) per organoid from 3 control (CTL) and 4
455 *Ap1m2* organoids, from TEM images. (L-M) Quantification of organoids displaying ectopic
456 Paneth cells in control (CTL) or *Ap1m2* organoids treated with 200nM Afatinib (afa) (N=3
457 independent experiments) or 1 μ M Rapamycin (rapa) for 3 days (N=3 independent
458 experiments). The total number of organoids analysed is indicated in brackets, *p<0,05,
459 **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001, unpaired Mann-Whitney test. (N) Model. We propose
460 that AP-1 controls the apical organisation of Rab11 endosomes that allow the apical targeting
461 of Cdc42, as well as inhibits the YAP and EGFR/mTOR proliferation pathways.
462 Independently, AP-1 positively regulates the differentiation of intestinal cells towards the
463 secretory lineage. Scale bar, 50 μ m.

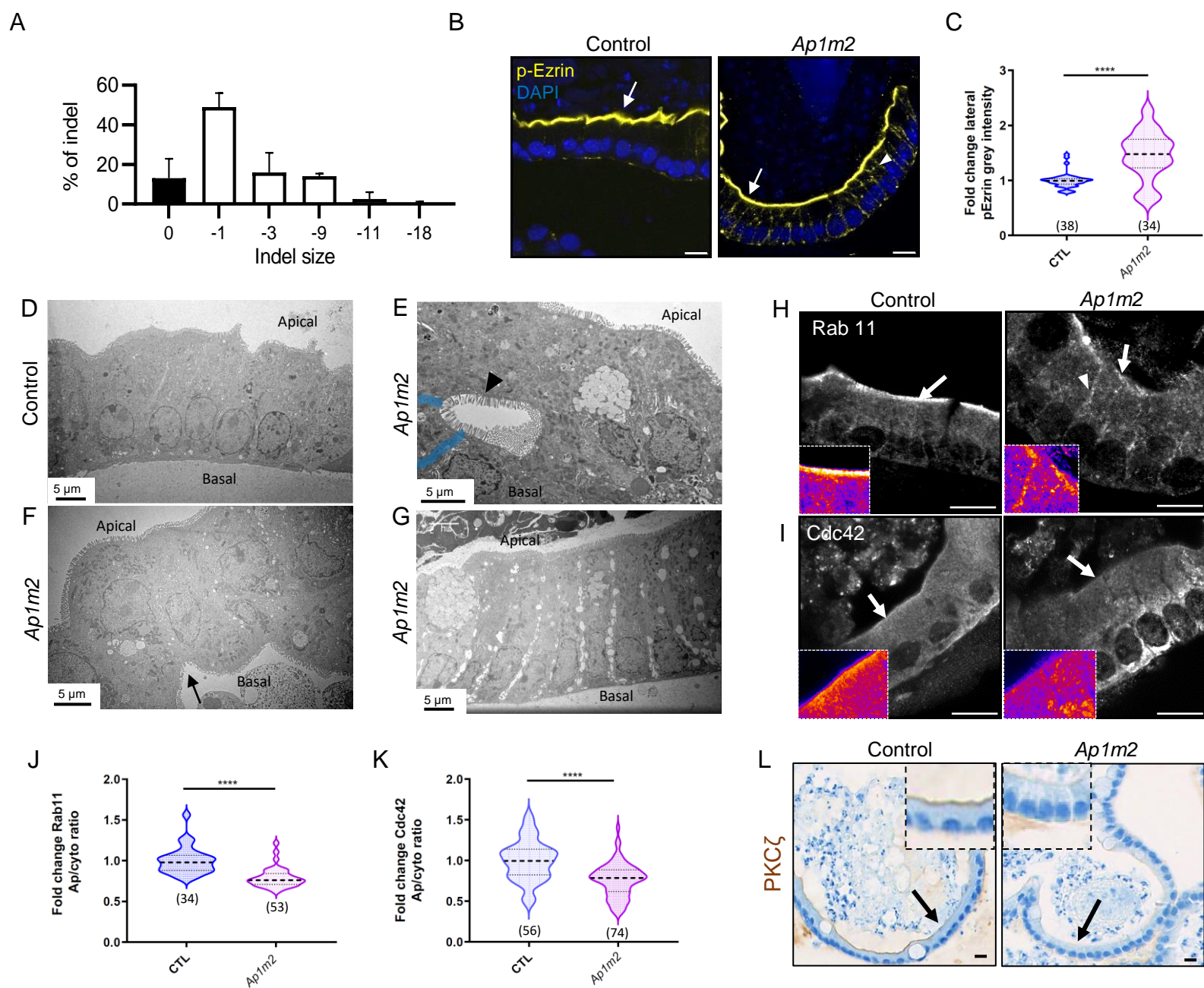


Figure 1

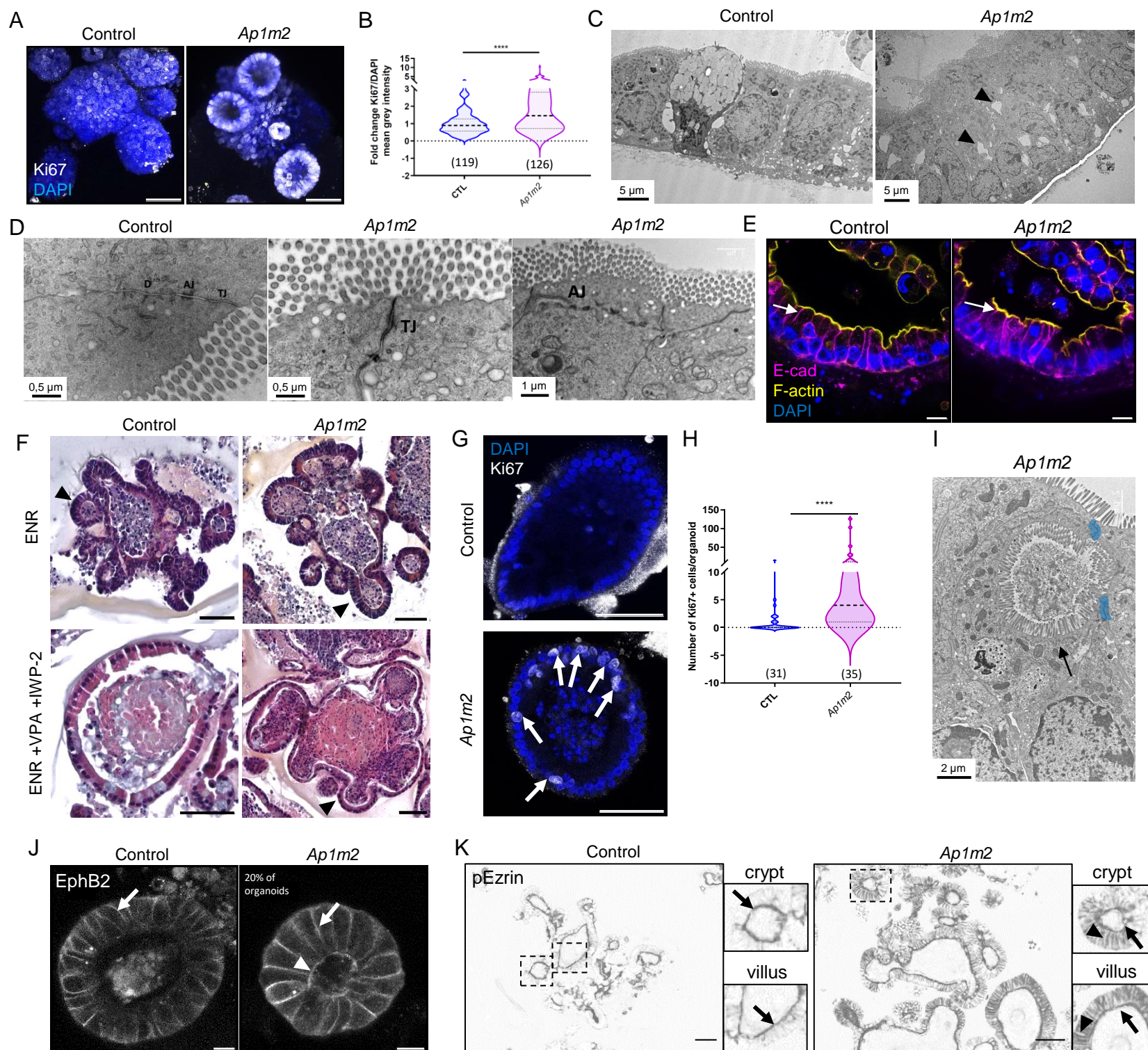


Figure 2

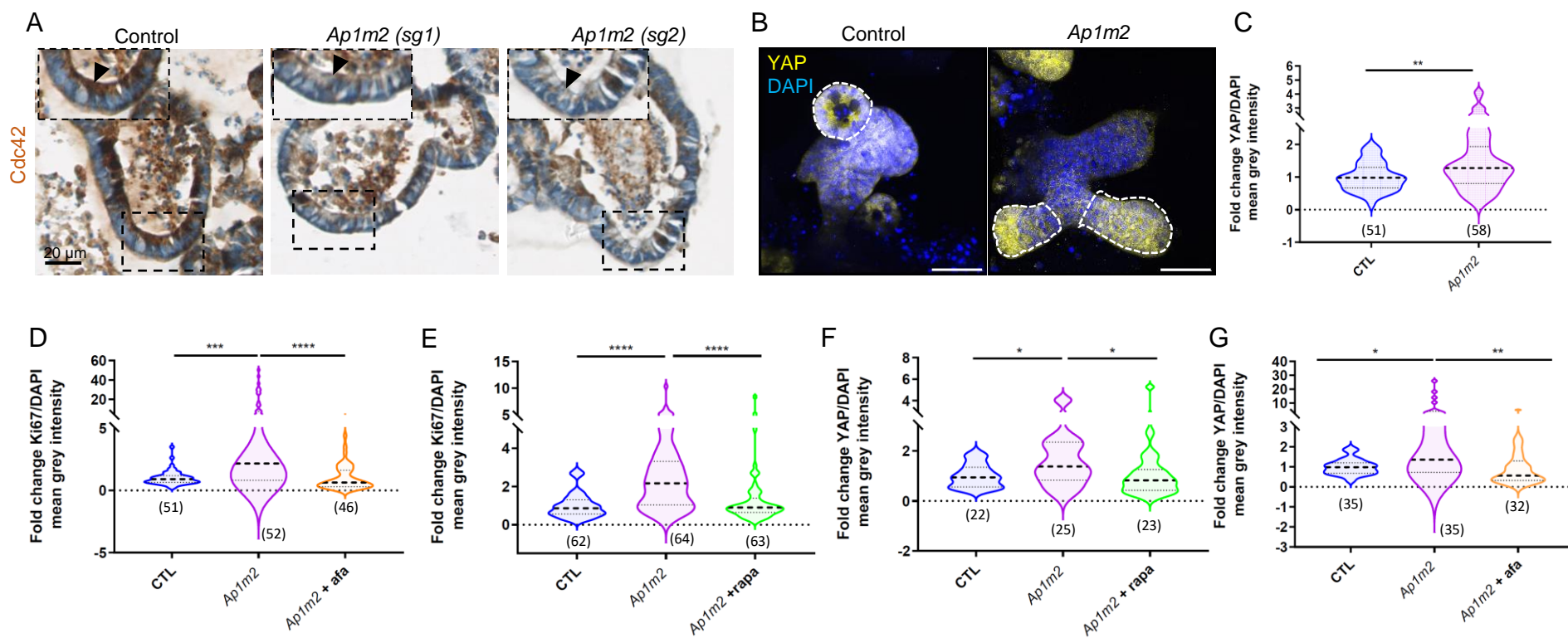


Figure 3

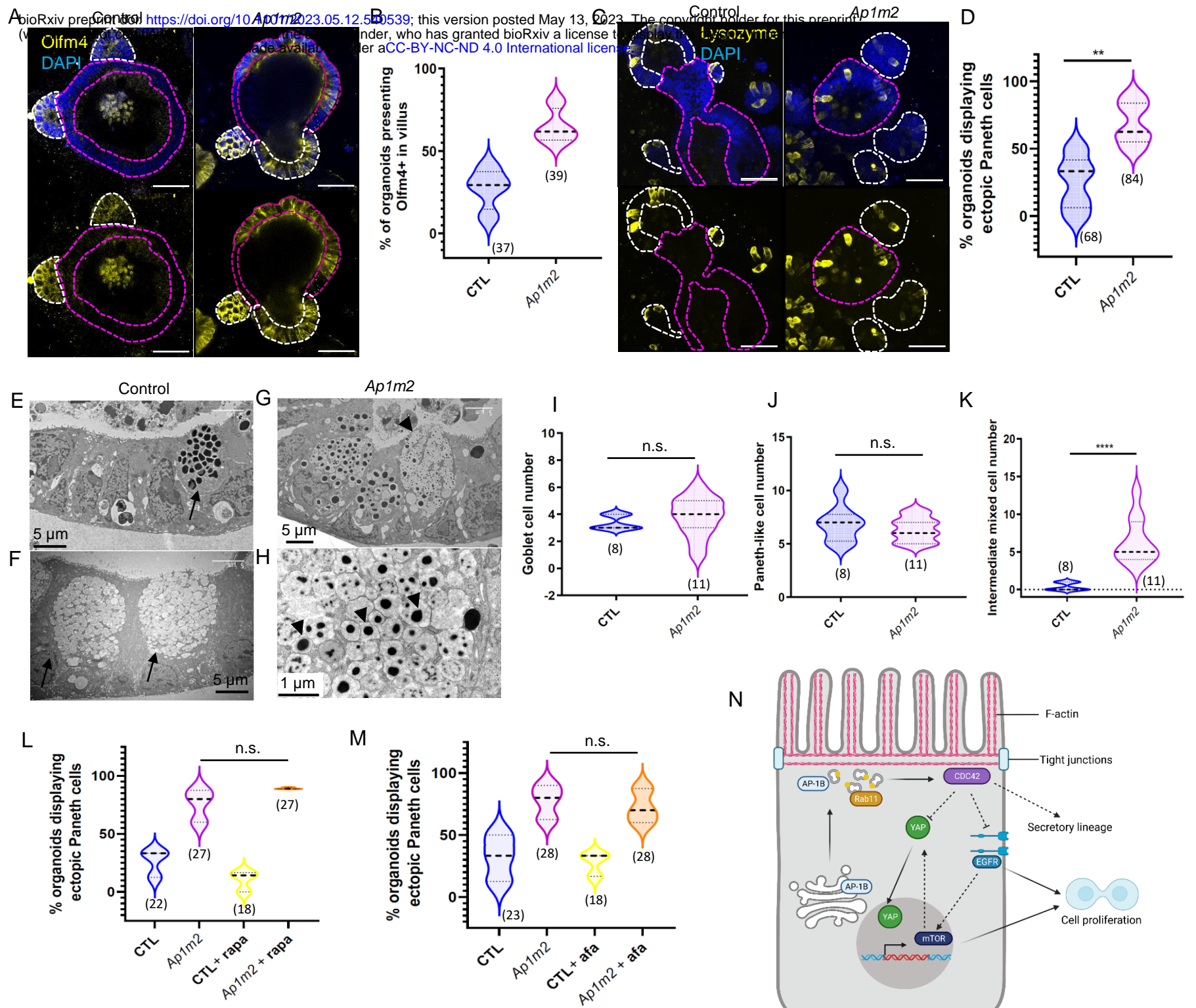
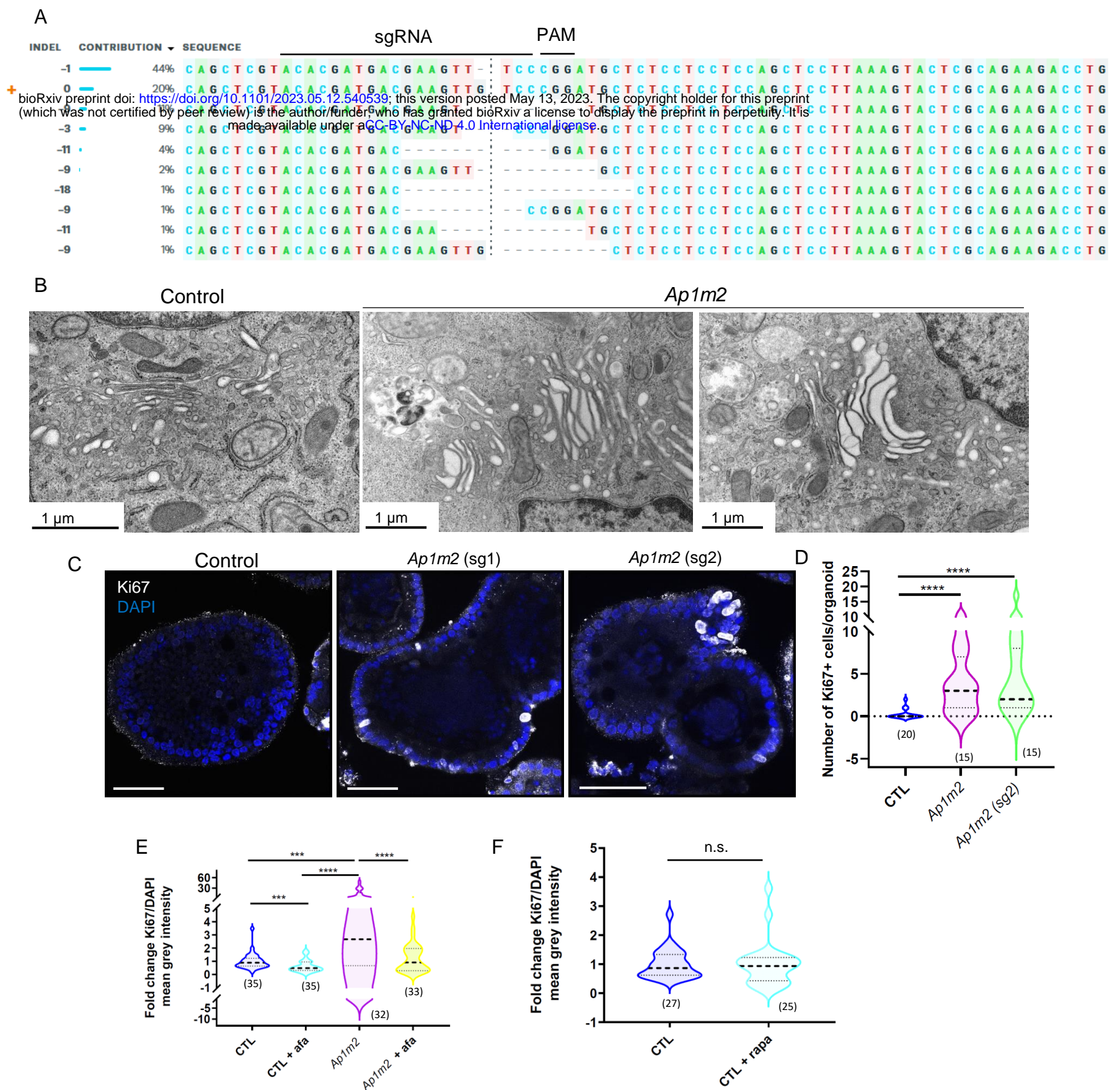


Figure 4



Supplementary Figure 1. (A) ICE analysis of a genomic DNA sequencing of CRISPR-edited organoids. The sgRNA sequence (sg1) targeting *Ap1m2* gene and the PAM site are indicated. (B) TEM analysis of the Golgi apparatus in control and *Ap1m2* organoids. (C-D) Immunofluorescence staining of Ki67 in fully-differentiated control (CTL), *Ap1m2* (sg1) and *Ap1m2* (sg2) organoids. Scale bars, 50 μm. (D) shows the quantification of Ki67+ cells/organoid. (E-F) Quantification of Ki67/DAPI ratio in organoids treated with 200 nM Afatinib (afa) during (N=3 independent experiments) or 1μM Rapamycin (rapa) during (N=3 independent experiments). The total number of organoids analysed is indicated in brackets. *p<0,05, **p<0,01 ; ***p<0,001; ****p<0,0001, unpaired Mann-Whitney test.

Sample	Control	<i>Ap1m2</i>
Number of samples	5	6
Ultrastructural variability	+	++
Brush border	Normal	Normal
Subapical vesicular structures	No	No
Enlarged vacuolar structures/Mixed organelles	No	Enlarged degradative vacuoles (100%) Various size, shape and electron density
Lysosomes	Small and normal (50%)	Increased number of lysosomes and presence of giant lysosomes (100%) Heterogeneous in size and content
Ectopic lumen	No	Lateral lumen with microvilli-like structures, separated by ectopic junctions (100%)
Intercellular spaces	No	Loose connection between enterocytes (100%)
Apical junctions	Normal	Affected
Intermediate mixed cells	No	Presence of intermediate cells (100%)
Polarity	Normal	Inverted polarity (50%)

Supplementary Table 1. Phenotypic analysis of Control and *Ap1m2* fully-differentiated organoids by TEM. The percentages correspond to the percentage of organoids displaying the indicated phenotype.

II. Résultats complémentaires

1. Analyse de la localisation de l'E-cadhérine et de l'activation de la voie de signalisation de la β -caténine

Chez la souris *Ap1m2*^{-/-}, les auteurs ont mis en évidence une accumulation cytoplasmique, sous forme de *puncta*, de l'E-cadhérine. Cette accumulation serait en aval de la translocation nucléaire de la β -caténine, également observée. Plusieurs cibles de la voie de signalisation WNT/ β -caténine, comme c-Myc ou CD44, sont ensuite activées, ce qui est caractérisé par une augmentation de leur expression (Hase et al., 2013). Pour confirmer cela dans les organoïdes, nous avons réalisé des marquages de l'E-cadhérine par immunofluorescence afin d'étudier sa localisation dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*. De façon surprenante, nous n'avons pas pu détecter d'augmentation de l'expression cytoplasmique de l'E-cadhérine (Fig. 16A). Ces résultats sont confirmés par un marquage réalisé avec un anticorps anti-E-cadhérine différent (Fig. 16B). Nous n'avons pas non plus observé d'augmentation de la localisation cytoplasmique ou nucléaire de la β -caténine (Fig. 16 C-E). Des expériences préliminaires de culture d'organoïdes contrôles en présence de CHIR99021, un inhibiteur de la GSK3 β , ont cependant montré qu'il était possible de détecter une augmentation de l'expression nucléaire de la β -caténine en utilisant notre protocole de marquage et d'imagerie (Fig. 16 F-H). Enfin, l'expression d'une des cibles de la voie de signalisation WNT/ β -caténine, c-Myc, ne semble pas augmentée dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2* (Fig. 16 I-J). Il apparaît donc que la voie WNT/ β -caténine, induite par l'accumulation de la β -caténine cytoplasmique, n'est pas activée de façon importante par les mutations *Ap1m2* dans les organoïdes. Certains de ces résultats restent néanmoins au stade préliminaire et demandent à être confirmés.

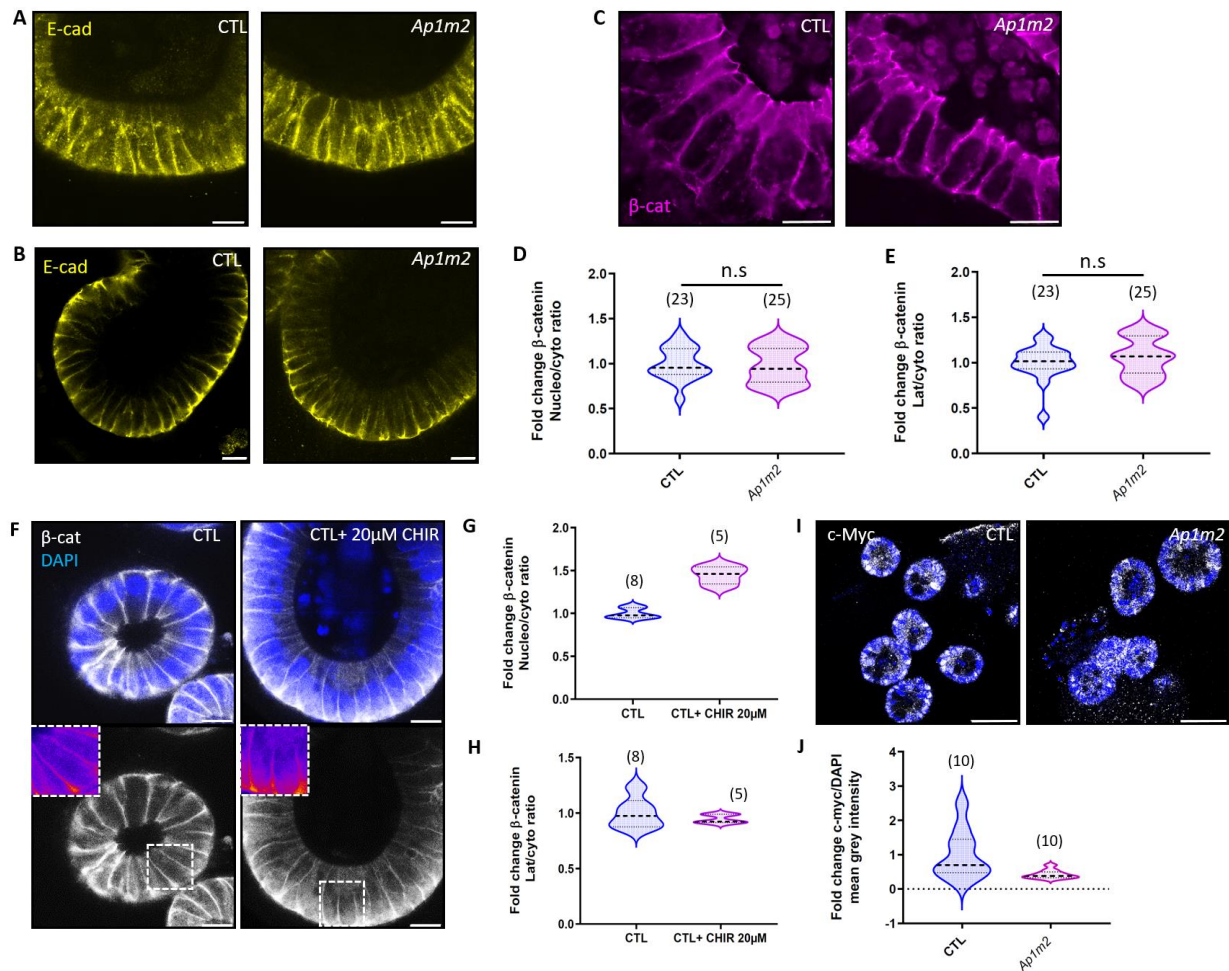


Figure 16 : La voie E-cadhérine- β -caténine ne semble pas être activée de façon importante dans les organoïdes mutés pour Ap1m2. (A) Marquage par immunofluorescence de l'E-cadhérine (1 :200, 3195, Cell signaling) (N=3 expériences indépendantes). Barre d'échelle : 10 μ m. (B) Marquage par immunofluorescence de l'E-cadhérine (1 :100, AF748-SP, Biotechne) (N=1 expérience indépendante). Barre d'échelle : 10 μ m. (C-E) Marquage par immunofluorescence de la β -caténine sur coupe de 4 μ m, avec la quantification des ratios nucléo/cytoplasmique et latéro/cytoplasmique (N=3 expériences indépendantes). Barre d'échelle : 10 μ m. (F-H) Marquage par immunofluorescence de la β -caténine et du DAPI, avec la quantification des ratios nucléo/cytoplasmique et latéro/cytoplasmique (N=1 expérience indépendante). Barre d'échelle : 50 μ m. (I-J) Marquage par immunofluorescence de c-myc, avec la quantification de l'intensité nucléaire (N=1 expérience indépendante). Barre d'échelle : 50 μ m. Statistiques (D-E) : test de Mann-Whitney non apparairé.

2. Analyse des phénotypes d'extrusion ou de délamination cellulaire

De façon ponctuelle, des cellules semblant en pleine extrusion ou délamination cellulaire ont pu être observées dans les organoïdes mutés pour Ap1m2. Ces cellules sont relativement rares et présentent des caractéristiques phénotypiques diverses, il est donc difficile d'établir des quantifications. De plus, en l'absence d'imagerie en temps réel, déterminer avec précision le destin de ces cellules est hasardeux. Certaines caractéristiques notables sont néanmoins identifiables. La plupart de ces cellules semblent présenter des défauts de polarité, avec une perte d'expression de la F-actine apicale (Fig. 17A et 17C), un léger décalage de la position du noyau (Fig. 17A et 17C), voire l'apparition

d'une morphologie circulaire non polarisée (Fig. 17B). Certaines semblent positionnées au-dessus des autres cellules de la couche épithéliale, ce qui correspondrait plutôt à un scénario d'extrusion ou de délamination apicale (Fig. 17B). D'autres, au contraire, sont en partie en dehors de la couche épithéliale, mais au niveau du pôle basal (Fig. 17D), ce qui s'apparente donc à une délamination basale. Dans la majorité des cas, il est cependant difficile d'établir si ces cellules vont véritablement quitter la couche épithéliale, et si oui par quel pôle (Fig. 17A et 17C). De façon surprenante, certaines d'entre elles se distinguent de leurs voisines par une forte intensité du signal de la E-cadhérine (Fig. 17A et 17D). Les mutations d'*Ap1m2* semblent donc induire l'apparition de phénotypes s'apparentant à de l'extrusion ou de la délamination cellulaire, et des expériences complémentaires, notamment d'imagerie en temps réel, seront nécessaires à la caractérisation complète de ces phénotypes et des mécanismes impliqués. On peut noter qu'il a récemment été montré qu'AP-1B joue un rôle dans la migration d'autres types cellulaires, les cellules LLC-PK1 et MDCK, à travers le contrôle de la localisation de la β 1-intégrine (Kell et al., 2020). Cependant, ces expériences ont été réalisées sur des cultures cellulaires en monocouche, dont l'environnement et l'organisation spatiale diffèrent de ceux des cellules épithéliales intestinales cultivées sous forme d'organoïdes.

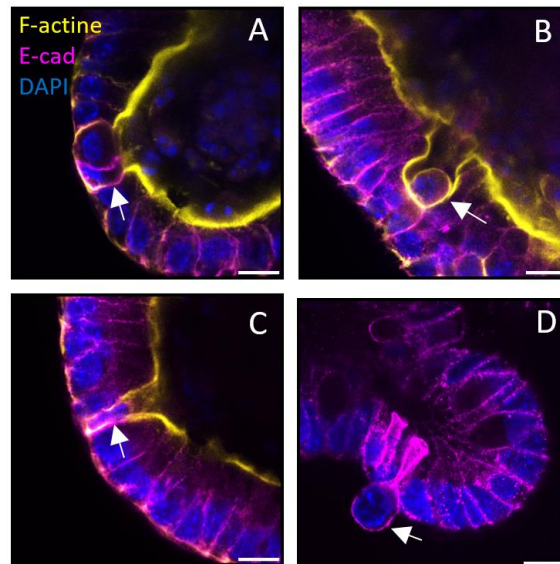


Figure 17 : Illustration des phénotypes d'extrusion ou de délamination cellulaire dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*. (A-C) Marquage par immunofluorescence de la F-actine, l'E-cadhérine et le DAPI (N=2 expériences indépendantes). (D) Marquage par immunofluorescence de l'E-cadhérine et du DAPI (N=1 expérience indépendante). Barre d'échelle : 10 μ m.

3. Analyse phénotypique des souris *VillinCreERT2 Ap1m2^{fl/fl}*

Afin de pouvoir confirmer nos résultats dans un modèle animal, nous nous sommes procuré des blocs de paraffine contenant l'intestin grêle de souris *Ap1m2^{fl/fl}* ou *VillinCreERT2 Ap1m2^{fl/fl}* (délétion intestin-spécifique du gène *Ap1m2*) auprès de l'équipe d'Hiroshi Ohno (RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama, Japon). Plusieurs marquages en immunohistochimie ont été réalisés. Tout d'abord, nous avons confirmé que les souris *VillinCreERT2 Ap1m2^{fl/fl}* présentent une hyperplasie des cryptes, qui sont plus longues que dans les souris contrôles (Fig. 18E). D'autre part, nous observons également une désorganisation de la couche épithéliale au niveau des villosités, caractérisée notamment par un mauvais alignement des noyaux, et l'apparition de façon ponctuelle de deux

couches de cellules (Fig. 18A, 18 C-E). Au niveau des villosités, la largeur des cellules est réduite, et leur longueur augmentée (Fig. 18A, 18 C-E). Ces phénotypes sont semblables à ceux observés dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*.

La *phospho*-ezrine, protéine de la bordure en brosse, est localisée également au niveau de la membrane latérale dans les villosités (Fig. 18A) et dans les cryptes (Fig. 18B) des souris *VillinCreERT2 Ap1m2^{ff}*, ce qui confirme les résultats obtenus dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*.

La localisation et l'expression de CDC42 et des endosomes Rab11+ ne semble cependant pas affectée de manière importante dans les souris *VillinCreERT2 Ap1m2^{ff}*, à part une apparente légère baisse de l'expression totale (Fig. 18 C-D). Néanmoins, les marquages sont hétérogènes, aussi bien au sein du tissu intestinal d'une même souris, qu'entre les souris du même groupe, il est donc difficile de tirer des conclusions définitives. De plus, le marquage CDC42 semble assez peu spécifique. Enfin, la baisse du ratio apico/cytoplasmique de CDC42 et des endosomes Rab11+ observée dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2* est significative, mais relativement modérée, il est donc possible qu'elle soit difficile à détecter par immunohistochimie sur les tissus de souris. Pour les deux marquages, il est difficile d'observer un nombre suffisant de cryptes présentant un signal polarisé. J'ai donc préféré ne pas tirer de conclusions sur l'expression et la localisation de CDC42 et des endosomes Rab11+ dans les cryptes des souris *VillinCreERT2 Ap1m2^{ff}*. Les défauts de localisation apicale de CDC42 et des endosomes Rab11+ détectés dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2* ne semblent pas être retrouvés dans les cellules *VillinCreERT2 Ap1m2^{ff}*, mais des expériences supplémentaires, notamment de marquages par immunofluorescence, permettraient de réaliser des quantifications qui confirmeraient ou non ces résultats.

Enfin, le nombre de cellules présentant une expression cytoplasmique de YAP est nettement augmenté dans les souris *VillinCreERT2 Ap1m2^{ff}* (Fig. 18E). En effet, YAP est exprimé dans les cryptes des souris *Ap1m2^{ff}* et dans celles des souris *VillinCreERT2 Ap1m2^{ff}*, mais, les cryptes des souris *VillinCreERT2 Ap1m2^{ff}* sont plus longues et contiennent un nombre bien plus important de cellules, donc le nombre de cellules exprimant YAP au niveau cytoplasmique est naturellement augmenté dans ces souris. Il semble néanmoins que le niveau d'expression cytoplasmique et apicale de YAP soit légèrement augmenté dans les cellules des villosités des souris *VillinCreERT2 Ap1m2^{ff}* (Fig. 18E). Afin de consolider ces résultats, il serait nécessaire de réaliser des marquages par immunofluorescence, pour pouvoir quantifier l'intensité de l'expression de YAP dans le cytoplasme et le noyau des cellules.

Une partie des observations réalisées dans les organoïdes *Ap1m2* est confirmée dans les souris *VillinCreERT2 Ap1m2^{ff}*, mais certains résultats ne sont pas totalement reproduits, ce qui mérite une investigation plus poussée afin de pouvoir tirer des conclusions définitives. Les défauts de localisation de protéines polarisées (ici *phospho*-ezrine), l'hyperplasie des cryptes et la désorganisation de la couche épithéliale sont reproduits. Cependant, les perturbations de la localisation apicale de CDC42 et des endosomes Rab11+ ne semblent pas présentes, même si, au vu de la qualité des marquages, des confirmations par d'autres techniques sont nécessaires. Enfin, il n'a pas été possible de confirmer l'augmentation de l'expression nucléaire de YAP, bien qu'un nombre plus important de cellules expriment ce marqueur dans les souris *VillinCreERT2 Ap1m2^{ff}*. La réalisation de marquages par immunofluorescence, suivi des quantifications de l'intensité d'expression, permettra de valider ou non les résultats obtenus dans les organoïdes.

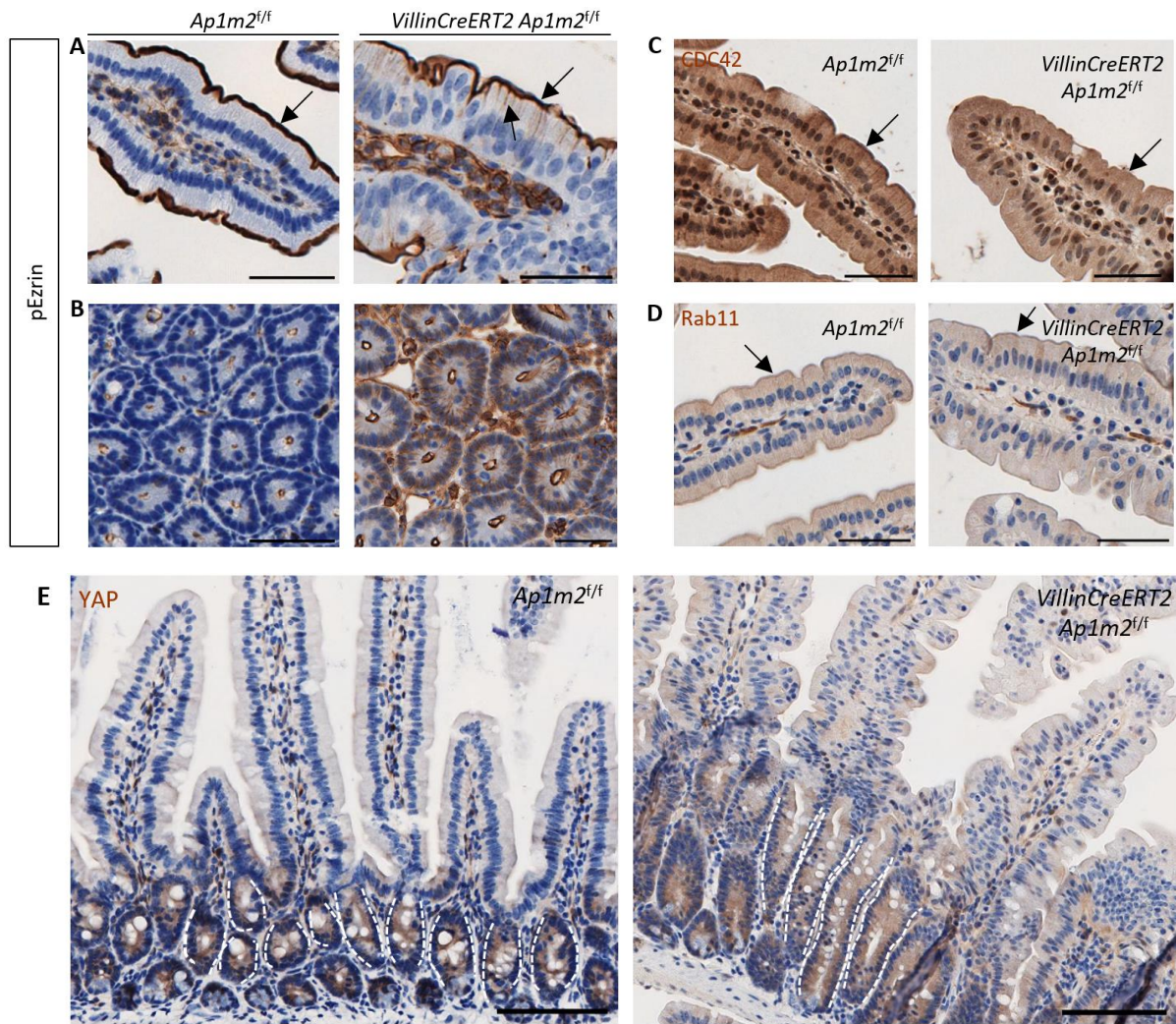


Figure 18 : Les défauts de polarité, l'hyperplasie des cryptes et la désorganisation de la couche épithéliale sont retrouvées dans les souris VillinCreERT2 Ap1m2^{f/f}, contrairement aux défauts de localisation de CDC42 ou des endosomes Rab11+. Les tissus de souris ont été marqués par immunohistochimie avec des anticorps dirigés contre la phospho-ezrine (A-B), CDC42 (C), Rab11 (D) ou YAP (E). (A-D) Barre d'échelle : 50 μm. (E) Barre d'échelle : 100 μm. Les lignes pointillées encadrent les cryptes.

III. Contribution à d'autres travaux

1. V₀-ATPase downregulation induces MVID-like brush border defects independently of apical trafficking in the mammalian intestine (Bidaud-Meynard et al., 2022)

Au cours de ma thèse, j'ai contribué à une étude menée par mon co-encadrant de thèse, Aurélien Bidaud-Meynard, portant sur le rôle de la V₀-ATPase dans les organoïdes intestinaux murins. Chez *C. elegans*, notre équipe a identifié la V₀-ATPase, sous-unité de la V-ATPase, comme nécessaire au trafic apical et à la polarité intestinale. En effet, sa déplétion entraîne l'apparition d'un phénotype type MVID chez *C. elegans* (Bidaud-Meynard et al., 2019). La MVID est une pathologie génétique entraînant une diarrhée sévère chronique, et est caractérisée par une forte atrophie microvillositaire, ainsi que par la présence d'inclusions microvillositaires (MVI). Elle est provoquée par les mutations de *MYO5B*, *STX3*, *MUNC18.2* ou *UNC45A*, qui altèrent la polarité apico-basale à travers des perturbations du trafic apical (Li et al., 2022; Mosa et al., 2018; Müller et al., 2008; Wiegerinck et al., 2014). Dans les organoïdes intestinaux murins, les mutations de sous-unités du complexe de la V₀-ATPase entraîne une atrophie microvillositaire sévère, ainsi que l'apparition d'inclusions microvillositaires, comme chez *C. elegans*. De plus, chez les patients portant une mutation de *TCIRG1*, codant pour la sous-unité $\alpha 3$ du complexe V₀-ATPase, des défauts de polarité sont observés, renforçant l'hypothèse d'une conservation de la fonction de la V₀-ATPase. Cependant, certaines des caractéristiques phénotypiques de la MVID, comme l'accumulation de vésicules au niveau subapical, ou les défauts de localisation des endosomes Rab11+, ne sont pas retrouvées. Enfin, la localisation de la V₀-ATPase est altérée dans les tissus des patients souffrant de MVID. L'ensemble de ces résultats suggère que la V₀-ATPase joue un rôle conservé dans le maintien de la polarité et de la bordure en brosse des entérocytes et permet de mieux comprendre certains phénotypes cellulaires de la MVID, qui pourraient être indépendants du trafic apical mais dépendants de la localisation correcte du complexe.

Ma contribution à ce travail a consisté à développer la technique d'immunofluorescence sur coupes d'organoïdes dans le laboratoire et à réaliser des expériences pilotes, notamment des tests de concentration d'anticorps. J'ai également réalisé une quantification des MVIs dans des organoïdes mutés pour *Myo5b* ou *Atp6v0d1* (sous-unité de la V₀-ATPase) afin de confirmer le phénotype MVID.

V₀-ATPase downregulation induces MVID-like brush border defects independently of apical trafficking in the mammalian intestine

Short title: V₀-ATPase downregulation induces MVID-like defects

List of Authors:

Aurélien Bidaud-Meynard^{1,*}, Ophélie Nicolle¹, Anne Bourdais^{1,#}, Maela Duclos^{1,#}, Jad Saleh², Frank Rueemle^{3,4}, Henner F Farin^{5,6,7,8}, Delphine Delacour², Despina Moshous^{3,4} and Grégoire Michaux^{1,*}

¹Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes) - UMR 6290, F-35000 Rennes, France

²Cell Adhesion and Mechanics, Institut Jacques Monod, CNRS UMR7592, Paris Diderot University, Paris, France

³Hôpital Necker Enfants Malades, APHP, Université Paris Cité, Paris, France

⁴INSERM, UMR1163, Imagine Institute, Paris, France

⁵German Cancer Consortium (DKTK), Heidelberg, Germany.

⁶Georg-Speyer-Haus, Institute for Tumor Biology and Experimental Therapy, Frankfurt am Main, Germany

⁷German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany.

⁸Frankfurt Cancer Institute, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany.

#equal contribution

*corresponding authors

Grant support: This work was supported by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement 844070 to ABM, Defis scientifiques de l'Université Rennes 1 (17CQ436-S0) to ABM and GM. GM laboratory also received institutional funding from CNRS and Université de Rennes.

**Correspondance:* A.B-M. pbidaud@univ-rennes1.fr or G.M. gmichaux@univ-rennes1.fr

Disclosures: The authors disclose no conflicts of interest.

Abbreviations: MVID, microvillus inclusion disease; MVI, microvillus inclusion

Summary

Intestinal microvillus atrophy is a major cause of enteropathies such as idiopathic or congenital diarrhea that are often associated with severe morbidity. It can be caused by genetic disorders, inflammatory diseases, toxins or pathogens. In particular, Microvillus inclusion disease (MVID) is characterized by a chronic intractable diarrhea and a severe microvillus atrophy. It is triggered by mutations in *MYO5B*, *STX3*, *MUNC18.2* or *UNC45A* which alter epithelial polarity by affecting apical trafficking in intestinal epithelial cells. Furthermore, we recently established that the depletion of the V_0 sector of the V-ATPase complex induces an MVID-like phenotype in *C. elegans*. In this study we investigated the function of the V_0 -ATPase complex in mouse intestinal organoids. We found that its depletion also triggers a very severe microvillus atrophy in this model. Furthermore, we established that the polarity of intestinal cells is affected in a patient carrying mutations in *TCIRG1* which encodes a V_0 -ATPase subunit. However, V_0 -ATPase depletion does not recapitulate other MVID-specific phenotypes such as subapical vesicle accumulation and Rab11+ endosomes mislocalization. Finally, we found that the apical localization of the V_0 -ATPase is disrupted in MVID patients. Altogether these results suggest a role for the V_0 -ATPase in microvillus atrophy which might be independent from apical trafficking.

Microvillus inclusion disease (MVID, OMIM 251850) is a rare genetic orphan condition associated with a chronic intractable diarrhea and nutrient absorption defects that compromise the survival of new-born¹. Mutations found in *MYO5B*, *STX3*, *STXBP2/MUNC18.2* or *UNC45A* in MVID patients^{1,2} highlighted the role of apical trafficking of transporters and ion channels³ in the absorptive function. It also suggested that apical trafficking is involved in the maintenance of the enterocyte brush border (BB), whose atrophy is a typical phenotype of MVID.

We recently demonstrated that knockdown of subunits of the V₀ sector of the V-ATPase complex (aka V₀-ATPase) induces an MVID-like phenotype in *C. elegans*⁴. Here, to study the function of V-ATPase in mammals, we depleted V₀ (*Atp6v0d1*, *Atp6v0c*) and V₁ (*Atp6v1e2*) subunits by inducible CRISPR-CAS9 knockout (KO) in mouse intestinal organoids⁵, and analyzed the resulting phenotypes that we compared to that of *Myo5b* depletion, a *bona fide* MVID model⁶.

Atp6v0d1 but not *Atp6v1e2* KO induced a very severe BB atrophy with smaller, sparse, and slightly wider microvilli as observed by transmission electron microscopy (TEM), similarly to *Myo5b* KO (Figures 1A-B and Supplementary Figure 1A-C). F-Actin staining also revealed the accumulation of cytoplasmic actin⁺ foci in both *Myo5b* and *Atp6v0d1* KO organoids, reminiscent of microvillus inclusions (MVIs)⁷, a typical phenotype of MVID¹ (Figure 1C). Super-resolution and TEM imaging indeed revealed the presence of MVIs lined with microvilli in *Myo5b*, *Atp6v0d1* as well as in *Atp6v0c* KO organoids (Figure 1D and Supplementary Figure 1D-E). Ultrastructural analysis showed that both *Atp6v0d1* and *Myo5b* KO induced other MVID phenotypes, such as the accumulation of large vacuoles with heterogeneous content (“mixed-organelles”) and the formation of ectopic lumen between lateral membranes, indicating epithelial polarity defects (Figure 1E and Supplementary Figure 1F-G). Other MVID features such as defective lysosomes and digitations at the basolateral membrane were also observed

upon depletion of *Atp6v1e2*, which only inhibits the acidification but not the trafficking function of the V-ATPase^{4, 8}. These findings indicate that some MVID hallmarks could be linked to a general defect in organelle pH or autophagy, as suggested before¹ (Supplementary Figure 1A,H and Supplementary Table1).

MYO5B, *STX3*, *STXBP2/MUNC18.2* and *UNC45A* encode factors implicated in the recycling of apical proteins through Rab11⁺ endosomes^{1, 3}. Consistently, as observed by TEM and Periodic acid Schiff (PAS) staining, *Myo5b* KO organoids displayed a subapical accumulation of tubulo-vesicular compartments, and of the apical transmembrane proteins CD10 and DPPIV, or the trafficking factors Rab11 and STX3 (Figure 2A-C and Supplementary Figure 2A-F). Surprisingly, while V₀-ATPase controls the same recycling step in *C. elegans*⁴, V₀-ATPase KO in organoids was not associated with defective apical trafficking, suggesting that its function on apical membrane homeostasis differs from *bona fide* MVID factors (Figure 2A-C and Supplementary Figure 2A-F).

To confirm these results in humans, we analyzed small intestine resections from a patient suffering from osteopetrosis, a rare disease caused by mutations in the V₀-ATPase $\alpha 3$ subunit-coding gene *TCIRG1*⁹ (Supplementary Figure 3A). IHC against the BB marker phospho-ezrin revealed its basolateral mislocalization in this *TCIRG1* patient compared to control (Figure 2D and Supplementary Figure 3B) similarly to its fate in MVID patients mutated for *MYO5B*¹⁰ and confirming the polarity defects observed in organoids (Figure 1E, Supplementary Figure 3C-D). However, this BB defect was not associated with a subapical accumulation of PAS nor apical transporters, unlike in a *MYO5B* patient, confirming our observations in organoids (Figure 2E and Supplementary Figure 3E-F). Thus, our data demonstrate that disruption of V₀-ATPase function induces an atypical MVID phenotype where a microvillus atrophy is uncoupled from apical trafficking defects. Like many patients with infantile osteopetrosis, this *TCIRG1* patient presented failure to thrive and an important feeding

disorder requiring enteral nutrition through a gastrostomy for many years. However, there was no obvious intestinal absorption defect, indicating that a microvillus atrophy may not be sufficient to provoke nutrient absorption defects and suggesting that MVID symptoms are likely the consequence of both a BB atrophy and a failure in apical protein targeting.

Finally, to test the putative link between V_0 -ATPase and MVID, we studied the mutual requirement between *Myo5b* and *Atp6v0d1* for their apical localization. *Myo5b*, which localized at the cell cortex in control samples, partly accumulated in the cytoplasm but remained apically localized upon *TCIRG1* mutations (Figure 2F). Contrarily, *Atp6v0d1* apical localization was dramatically affected in two MVID patients carrying *MYO5B* mutations (Figure 2G-H), suggesting that the microvillus atrophy associated with MVID could be due to the loss of the V_0 -ATPase. We therefore propose that MVID might be induced by the combination of two independent processes: microvillus atrophy and apical transport defects.

References

1. Schneeberger K, Roth S, Nieuwenhuis EES, et al. Intestinal epithelial cell polarity defects in disease: lessons from microvillus inclusion disease. *Dis Model Mech* 2018;11.
2. Duclaux-Loras R, Lebreton C, Berthelet J, et al. UNC45A deficiency causes microvillus inclusion disease-like phenotype by impairing myosin VB-dependent apical trafficking. *J Clin Invest* 2022;132.
3. Vogel GF, Janecke AR, Krainer IM, et al. Abnormal Rab11-Rab8-vesicles cluster in enterocytes of patients with microvillus inclusion disease. *Traffic* 2017;18:453-464.
4. Bidaud-Meynard A, Nicolle O, Heck M, et al. A V_0 -ATPase-dependent apical trafficking pathway maintains the polarity of the intestinal absorptive membrane. *Development* 2019;146.
5. Saleh J, Fardin M-A, Frenoy O, et al. Length-limitation of astral microtubules orients cell divisions in intestinal crypts. *bioRxiv* 2022; <https://doi.org/10.1101/2022.09.02.506333>.
6. Ruemmele FM, Muller T, Schiefermeier N, et al. Loss-of-function of *MYO5B* is the main cause of microvillus inclusion disease: 15 novel mutations and a CaCo-2 RNAi cell model. *Hum Mutat* 2010;31:544-51.
7. Mosa MH, Nicolle O, Maschalidi S, et al. Dynamic Formation of Microvillus Inclusions During Enterocyte Differentiation in *Munc18-2*-Deficient Intestinal Organoids. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2018;6:477-493 e1.

8. Maxson ME, Grinstein S. The vacuolar-type H(+)-ATPase at a glance - more than a proton pump. *J Cell Sci* 2014;127:4987-93.
9. Frattini A, Orchard PJ, Sobacchi C, et al. Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat Genet* 2000;25:343-6.
10. Michaux G, Massey-Harroche D, Nicolle O, et al. The localisation of the apical Par/Cdc42 polarity module is specifically affected in microvillus inclusion disease. *Biol Cell* 2016;108:19-28.

Acknowledgments

We thank Hans Clevers for the Noggin and R-Spondin1 expressing cells, Caroline Poix for preliminary imaging, Guillaume Halet for his help with organoid culture set up and members of the Michaux lab for discussions. IHC and imaging were performed at the Histo pathology High precision (H2P2) and the Microscopy Rennes Imaging Center (MRic Photonics and TEM) facilities of the UMS Biosit, member of the national infrastructure France-BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04).

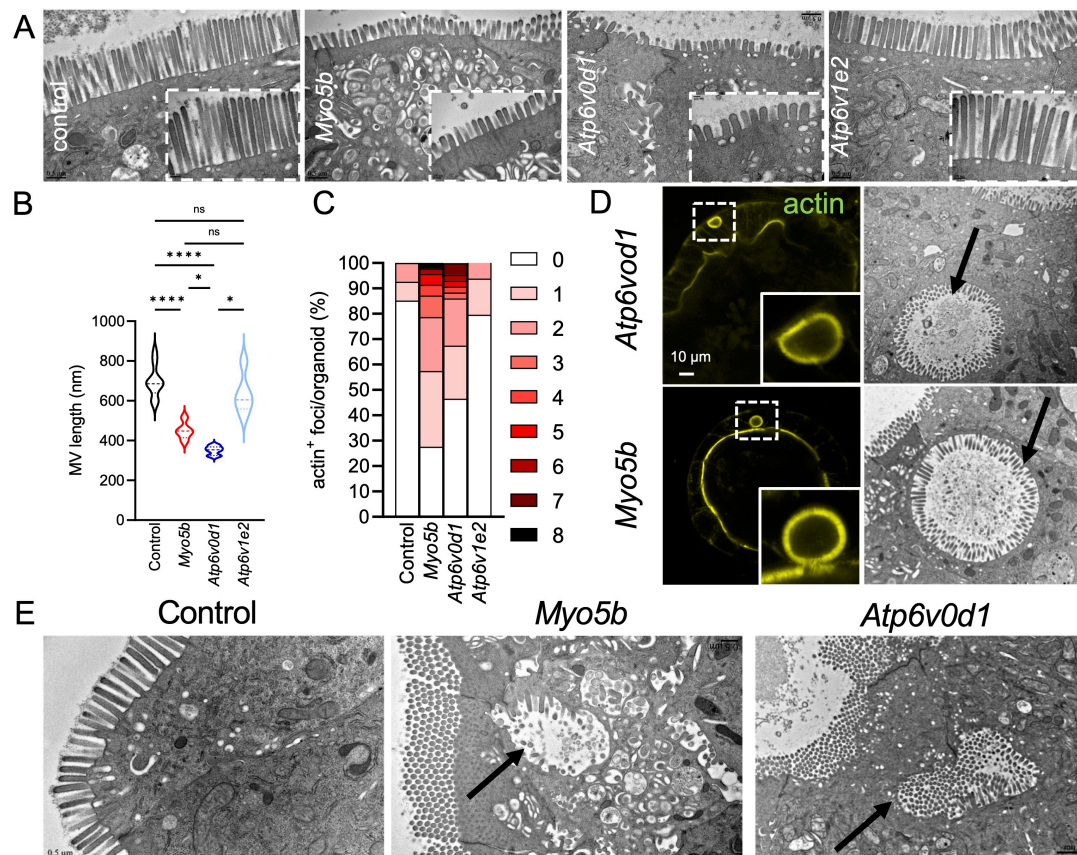


Figure 1. V_0 -ATPase KO recapitulates the MVID-related structural defects.

Control organoids and organoids KO for *Myo5b* or the V-ATPase subunits *Atp6v0d1* and *Atp6v1e2* were analyzed by TEM (A-B, D-E) or super-resolution microscopy of F-actin staining (C-D). (B) Quantification of the microvilli (MV) length in the indicated genotypes. Data are mean MV length/organoid (N=50 MV/organoid, 5-10 organoids). n.s. non-significant, *p<0.05, ****p<0.0001. (C) Quantification of the number of F-actin⁺ rounded foci on the full volume of an organoid, N= 27-49 organoids per condition from 3 independent experiments. (D-E) *Atp6v0d1* KO and *Myo5b* KO induce MVIs (D) visualized by F-actin staining (left) and TEM (right, arrows), as well as ectopic lumen (E, arrows). Inserts in A) and D) are magnified images showing the brush border and MVIs, respectively.

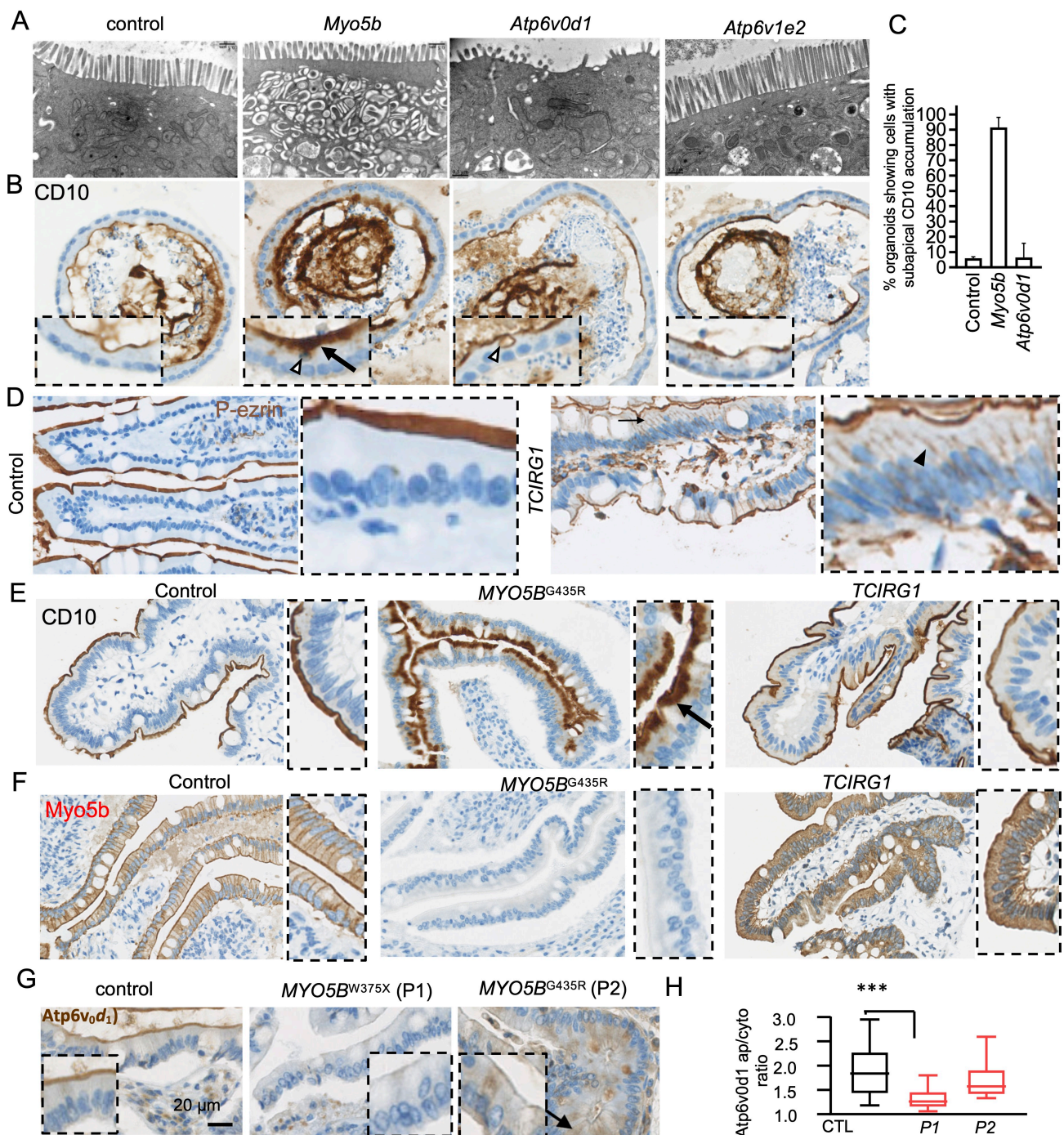
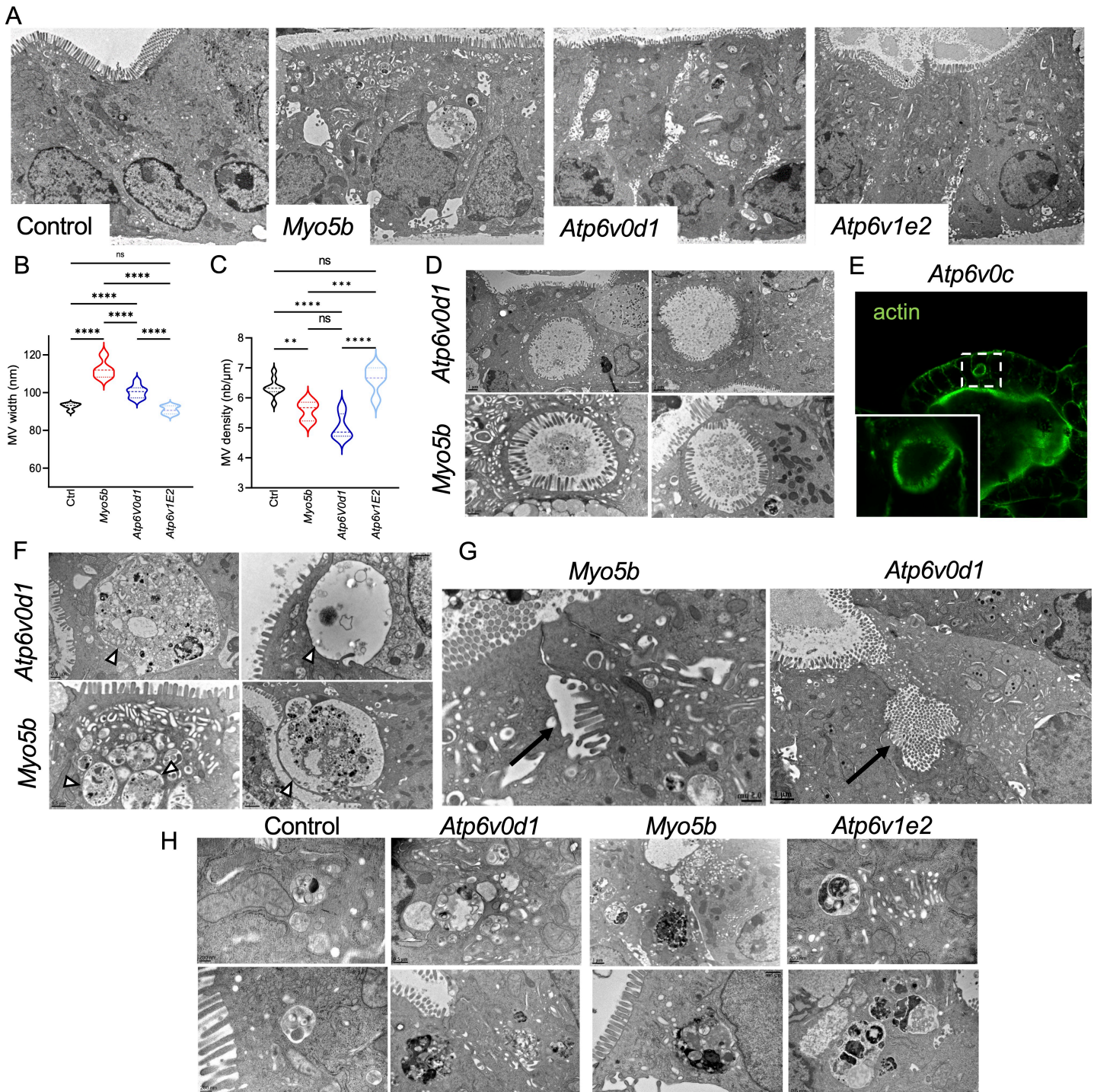


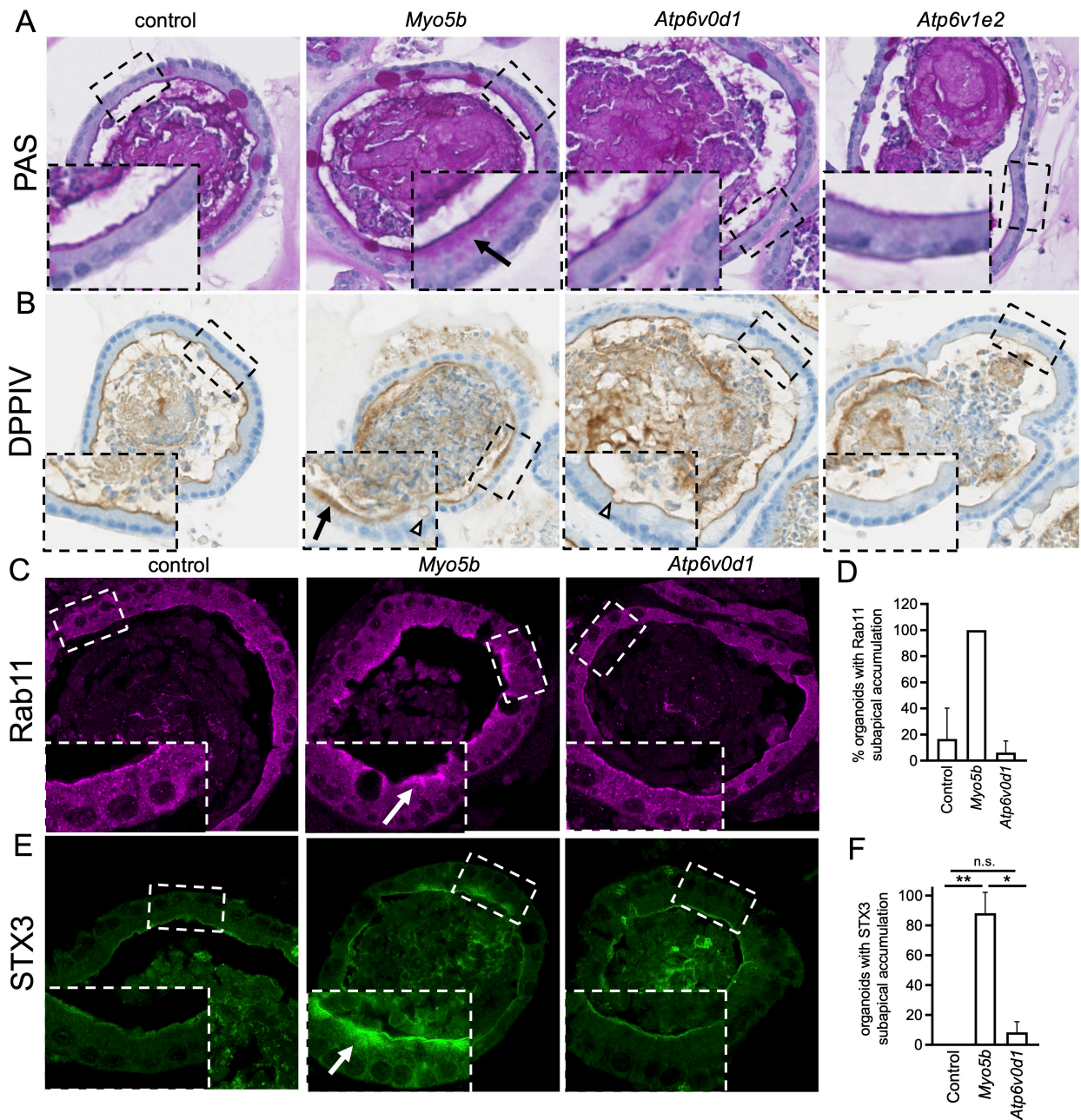
Figure 2. Comparison of Myo5b and V₀-ATPase function on brush border, polarity and trafficking. (A) TEM analysis of the subapical cytoplasmic content in the indicated organoids. (B-G) IHC staining of phospho-ezrin (P-ezrin) (D), CD10 (B-C, E), Myo5b (F) and Atp6v0d1 (G) in mouse intestinal organoids (B) or human duodenum samples (D-G). (C) Quantification of the number of organoids displaying a subapical accumulation of CD10 (N=33-49 organoids from 2 independent experiments). (H) Quantification of Atp6v0d1 apical/cytoplasmic ratio (N=10 villi). Inserts are magnified images. Arrows, open and closed arrowheads indicate the subapical accumulation of markers, MVIs, and the basolateral appearance of markers, respectively. ***p<0.001, unpaired student t-test.



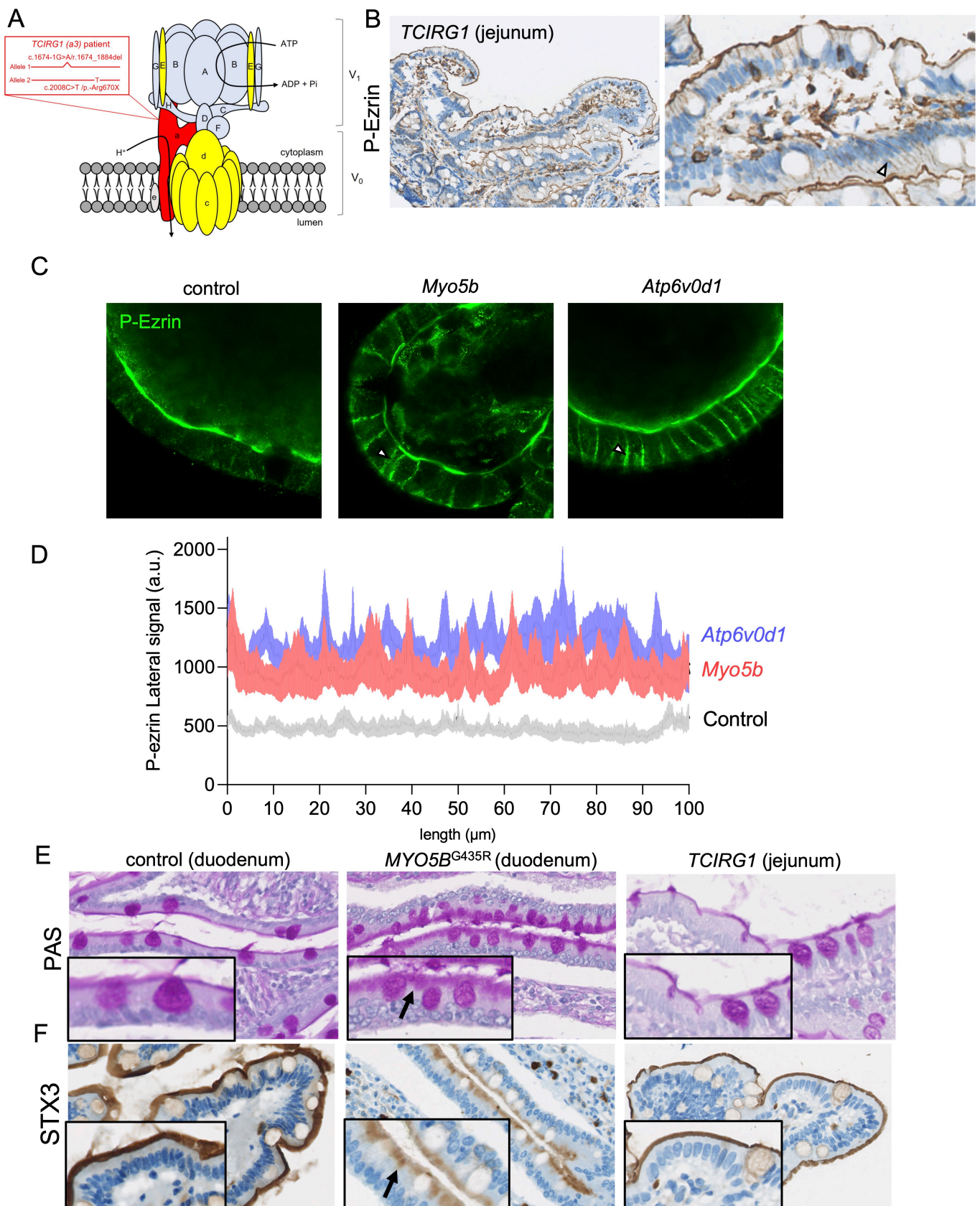
Supplementary Figure 1. MVID-like structural defects. (A) Overview of the enterocytes observed by TEM in the indicated KO organoids. (B-C) Quantification of MV width (B, N=50 MV/organoid, 5-10 organoids) and density (C, N=10 MV/μm/organoid, 5-10 organoids) from TEM images. (D) Additional images of the MVs induced by *Atp6v0d1* and *Myo5b* KO in organoids. (E) KO of the V_0 -ATPase subunit *Atp6v0c* also induces the appearance of F-actin⁺ MVs. The insert is a magnified view of the selected area. (F-G) Knockout of both *Atp6v0d1* and *Myo5b* induce mixed organelles (F, arrowheads) and lateral microvilli (G, arrows). (H) Abnormal lysosomes are observed upon V_0 - (*Atp6v0d1*), V_1 -ATPase (*Atp6v1e2*) and *Myo5b* KO.

Sample	Control	<i>Atp6v0d1</i> -KO	<i>Myo5b</i> -KO	<i>Atp6v1e2</i> -KO
BB/Microvilli	Normal	Atrophy (100%) Variable atrophy of brush-border MV, local BB denudation, altered dimensions of apical MV	Atrophy (100%) Variable dystrophy of brush-border MV, altered dimensions of apical MV	Normal
Subapical vesicular structures	No accumulation	No accumulation	Subapical accumulation of different vesicles and tubules ("secretory granules") (100%)	No accumulation
Enlarged vacuolar structures/Mixed organelles	No	Abnormal vesicle-like (mixed) organelles (100%) various sizes, shapes, and electron density, with components of immature granules and lysosomes	Abnormal vesicle-like (mixed) organelles (100%) various sizes, shapes, and electron density, with components of immature granules and lysosomes	No
Microvillus inclusions (MVIs)	No	MVIs (40%) lined by inward-pointing microvilli located in the apical/middle cytoplasm	MVIs (100%) lined by inward-pointing microvilli located in the apical/middle/basal cytoplasm	No
Lysosomes	Small and normal (33%)	Giant and abnormal (100%) Non-functional autolysosomes with heterogeneous sizes and contents, Acidification/degradation defects	Abnormal (100%) Non-functional autolysosomes with heterogeneous sizes and contents, Acidification/degradation defects	Abnormal (100%) Non-functional autolysosomes with heterogeneous sizes and contents, Acidification/degradation defects
Ectopic lumen	No	Lateral lumen with microvilli-like structures (50%)	Lateral lumen with microvilli-like structures (20%)	No
Intercellular spaces/Lateral interdigitations	(22%)	Widened lateral spaces with abundant lateral interdigitations, as well as bundles of ectopic microvilli facing laterally (100%)	Widened lateral spaces with abundant lateral interdigitations, as well as bundles of ectopic microvilli facing laterally (100%).	Widened lateral spaces with abundant lateral interdigitations, as well as bundles of ectopic microvilli facing laterally (100%).
Basal membrane	Normal	Basal interdigitations (100%)	Basal interdigitations (90%)	Basal interdigitations (90%)

Supplementary Table 1. Phenotypic comparison between control, *Atp6v0d1*, *Myo5b* and *Atp6v1e2* KO organoids.



Supplementary Figure 2. Analysis of apical membrane trafficking. Mouse intestinal organoids were stained with periodic acid Schiff (PAS) (A) or with antibodies directed against DPPiV (B), Rab11 (C) or STX3 (E). (D-F) Quantification of the number of organoids presenting cells with a subapical accumulation of Rab11 (D, N= 23-28 organoids from 2 independent experiments) and STX3 (F, N= 23-32 organoids from 3 independent experiments). Inserts are magnified images of the indicated ROIs. Arrows, open and closed arrowheads indicate the subapical accumulation of markers, MVIs, and the basolateral appearance of markers, respectively. n.s., non significant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



Supplementary Figure 3. Conservation of V-ATPase function in human samples. (A) Compound heterozygote mutations affect *TCIRG1* transcript's splicing (c.1674-1G>A) and translation (c.2008C>T). (B) IHC directed against Phospho-ezrin on jejunum samples from the patient carrying *TCIRG1* mutations. (C-D) The indicated organoids were stained for phospho-ezrin. (C) shows representative images and (D) the mean \pm SEM of phospho-ezrin signal along a 100 μ m line crossing the lateral membranes of cells (N= 10-14 organoids). (E-F) Intestinal samples from patients with MVID (*MYO5B*^{G435R}) or carrying mutations on *TCIRG1* were stained with PAS (E) or with antibodies directed STX3 (F). Inserts are magnified images. Arrows, and arrowheads indicate the subapical accumulation of markers and the basolateral appearance of markers, respectively.

2. Three-Dimensional Imaging of Organoids to Study Primary Ciliogenesis During ex vivo Organogenesis (Duclos et al., 2021)

J'ai passé la première partie de ma thèse (octobre 2019- janvier 2021) sous la direction de Roland Le Borgne, et mon projet s'intitulait « Remodelage des jonctions cellulaires au cours de la division asymétrique des cellules souches mammaires ». Celui-ci consistait à mettre en place des lignées d'organoïdes mammaires exprimant des protéines des jonctions fluorescentes, via des knock-in par CRISPR-CAS9. Le but était ensuite d'observer en temps réel le remodelage des jonctions cellulaires au cours des divisions cellulaires dans les organoïdes mammaires, notamment celles des cellules souches. Suite à de nombreuses complications techniques, j'ai changé de directeur et de sujet de thèse en janvier 2021. Lors de cette première partie de thèse, j'ai cependant appris à cultiver des organoïdes mammaires, à réaliser des immunomarquages sur ces mêmes organoïdes, et à les imager, en collaboration avec Vincent Guen (postdoc dans l'équipe de C. Prigent à l'IGDR, maintenant CR Inserm à Nantes). C'est avec lui que j'ai écrit le protocole récapitulant la procédure à suivre pour réaliser des immunomarquages des organoïdes mammaires et leur observation au microscope à feuille de lumière (*light-sheet*).

Three-Dimensional Imaging of Organoids to Study Primary Ciliogenesis During *ex vivo* Organogenesis

Maela Duclos¹, Claude Prigent^{1,2}, Roland Le Borgne¹, Vincent J. Guen^{1,3}

¹ Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes) ² CRBM, CNRS, University Montpellier ³ CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes

Corresponding Author

Vincent J. Guen

vincent.guen@univ-nantes.fr

Citation

Duclos, M., Prigent, C., Le Borgne, R., Guen, V.J. Three-Dimensional Imaging of Organoids to Study Primary Ciliogenesis During *ex vivo* Organogenesis. *J. Vis. Exp.* (171), e62365, doi:10.3791/62365 (2021).

Date Published

May 14, 2021

DOI

10.3791/62365

URL

jove.com/video/62365

Abstract

Organoids are stem cell-derived three-dimensional structures that reproduce *ex vivo* the complex architecture and physiology of organs. Thus, organoids represent useful models to study the mechanisms that control stem cell self-renewal and differentiation in mammals, including primary ciliogenesis and ciliary signaling. Primary ciliogenesis is the dynamic process of assembling the primary cilium, a key cell signaling center that controls stem cell self-renewal and/or differentiation in various tissues. Here we present a comprehensive protocol for the immunofluorescence staining of cell lineage and primary cilia markers, in whole-mount mouse mammary organoids, for light sheet microscopy. We describe the microscopy imaging method and an image processing technique for the quantitative analysis of primary cilium assembly and length in organoids. This protocol enables a precise analysis of primary cilia in complex three-dimensional structures at the single cell level. This method is applicable for immunofluorescence staining and imaging of primary cilia and ciliary signaling in mammary organoids derived from normal and genetically modified stem cells, from healthy and pathological tissues, to study the biology of the primary cilium in health and disease.

Introduction

Development of multicellular organisms and the maintenance of homeostasis in their adult tissues reside in a fine-tuned regulation between self-renewal and differentiation of stem cells, which orchestrate in time and space normal tissue development and regeneration¹. Subversion of this regulation causes developmental anomalies and cancers². Thus, understanding the molecular and cellular mechanisms

that orchestrate stem cell self-renewal and differentiation is of key interest in developmental and cancer biology.

Recent development of *ex vivo* organogenesis methods, in which tissue stem cells generate three-dimensional organoids have transformed our capabilities to study the dynamics of stem cells during mammalian organogenesis and maintenance of tissue homeostasis in a dish³. Organoids

represent a good alternative to cumbersome genetically modified animal models to study these processes. Protocols for the development of organoids from tissue stem cells of many organs have now been developed³, including small intestine and colon, stomach, liver, pancreas, prostate, and mammary gland³. Additionally, the development of somatic genome-editing techniques in organoid-forming stem cells now enables to quickly interrogate the molecular and cellular mechanisms that control their biology^{4,5}.

The primary cilium is a microtubule-based structure that is assembled at the surface of stem and/or differentiated cells of various tissues⁶. It is generally non-motile and is assembled as a single structure per cell⁷. Primary ciliogenesis is the dynamic process of assembling the primary cilium⁷. At the cell surface, the cilium acts as a cell signaling platform⁸. Thus, the primary cilium is thought to act as a key regulator of stem cell self-renewal and/or differentiation in many tissues, including the brain^{9,10}, the mammary gland^{4,11}, the adipose tissue¹², and the olfactory epithelium¹³, among others. Primary ciliogenesis and/or ciliary signaling are dynamically regulated in distinct cell lineages and at different developmental stages^{4,13,14}, but the underlying mechanisms remain to be largely determined.

Ex vivo organogenesis shows promise for the development of basic knowledge on the molecular and cellular mechanisms that control stem cell biology, including primary ciliogenesis and ciliary signaling. However, it relies on the ability to properly image whole mount organoids at the single cell level and at sub-cellular scales. We recently used a mouse mammary stem cell-derived organoid model to show that primary cilia positively control mouse mammary stem cell organoid-forming capacity⁴. Here we present a comprehensive protocol for the immunofluorescence staining

of whole mount mouse mammary organoids (**Figure 1A,B**), which enables the analysis of primary cilia through light sheet microscopy during *ex vivo* organogenesis in three-dimension. Alternative methods were recently published for the immunofluorescence staining and imaging of organoids through confocal microscopy^{15,16}. This protocol focuses instead on the preparation and imaging of organoids through light sheet microscopy.

Protocol

NOTE: The protocol below is recommended for the staining of organoids that were grown in 5 wells of a 96 well plate and pooled together (> 100 organoids). Organoids were derived from mouse mammary stem cells. Donor mice were housed and handled in accordance with protocols approved by the Animal Care Committee of the University of Rennes (France).

1. Reagents

1. To prepare the fixative solution, dilute 125 μL of 16% paraformaldehyde (PFA) aqueous commercial solution in 375 μL of phosphate-buffered saline (PBS) to generate a 4% PFA solution.
CAUTION: Manipulate PFA that is a toxic substance under a chemical hood.
2. To prepare the permeabilization buffer, dilute 1.5 μL of Triton X100 in 500 μL of PBS, to produce a 0.3% Triton X100 solution.
3. To prepare the blocking buffer, dilute 1.5 μL of Tween-20 and 75 μL of normal goat serum in PBS, to generate a 5% goat serum-0.1% Tween 20 solution.
4. To prepare the light sheet mounting medium, dissolve 1 g of ultrapure low melting point agarose in 100 mL of dH₂O

or PBS at 65 °C. Prepare 1 mL aliquots and store at room temperature.

2. Organoids recovery

1. Transfer organoids from the culture wells to a low binding polymer 1.7 mL tube, after pipetting them up and down 3 times in the wells, with an FBS-coated tip for which the end was cut (minimal diameter of the extremity 1.5 mm).
NOTE: The coating prevents organoids from sticking to the tip. The low-binding polymer material enables to reduce the attachment of organoids to the side of the tube during the entire staining procedure.
2. Fill the tube with PBS, and spin down at 350 x g for 3 min. Remove the supernatant.

3. Fixation, permeabilization and blocking

1. Resuspend the organoids in 500 µL of 4% PFA. Incubate for 30 min at room temperature. Spin down at 350 x g for 30 s. Remove the supernatant.
NOTE: From this step onwards, resuspend organoids in the different buffers by simply adding the buffers on the pellet of organoids without touching them. Perform all washing steps at room temperature.
2. Wash the organoids with 1 mL of PBS for 3 min. Spin down at 350 x g for 30 s. Remove the supernatant.
PAUSE: Fixed organoids can be kept in PBS at 4 °C for at least a week.
3. Permeabilize the organoids by resuspending them in 500 µL of PBS-Triton X100 0.3% and incubate for 30 min at room temperature. Spin down the organoids at 350 g for 30 s.

4. Wash the organoids by resuspending them with 1 mL of PBS and incubate for 3 min. Spin down at 350 x g for 30 s. Remove the supernatant. Repeat once.
5. Optional: Resuspend the organoids in 500 µL of ice-cold methanol. Incubate at - 20 °C for 10 min. This step may be required for the staining of specific centrosomal markers.
6. Optional (if step 5 was performed): Wash the organoids with 1 mL of PBS for 3 min. Spin down at 350 x g for 30 s. Remove the supernatant. Repeat once.
7. Block non-specific antibody binding sites in organoids by resuspending them with 500 µL of blocking buffer (PBS, 5% goat serum, 0.1% Tween 20). Incubate 1 h and 30 min at room temperature. Spin down at 350 g for 30 s. Remove the supernatant.
8. Wash the organoids by resuspending them with 1 mL of PBS and incubate for 3 min. Spin down at 350 x g for 30 s. Remove the supernatant.

4. Labelling

1. Resuspend the organoids with 200 µL of blocking buffer with diluted primary antibodies and incubate overnight at 4 °C with mild shaking (60 rpm on a horizontal shaker). Place the tubes with a 45° angle with the horizontal plan of the shaker. It will maintain the organoids at the bottom of the tubes in the staining buffer.
2. Wash the organoids by resuspending them with 1 mL of PBS and incubate for 5 min. Spin down at 350 x g for 30 s. Remove the supernatant. Repeat twice.
NOTE: Some organoids in the last step may stick to the side of the tube, resulting in organoid loss during aspiration of the supernatant after centrifugation, adding

0.2% (w/v) bovine serum albumin (BSA) to the PBS in the washing steps may reduce organoid loss.

- Resuspend the organoids with 200 μ L of blocking buffer with secondary antibodies and incubate for 1 h and 30 min with mild shaking (60 rpm on a horizontal shaker). Place the tubes with a 45° angle with the horizontal plan of the shaker. It will maintain the organoids at the bottom of the tubes in the staining buffer.

NOTE: Hoechst (or other nuclear dyes, such as DAPI or DRAQ5) can be added to the buffer with secondary antibodies.

- Wash the organoids by resuspending them with 1 mL of PBS and incubate for 5 min. Spin down at 350 x *g* for 30 s. Remove the supernatant. Repeat twice.

NOTE: Some organoids in the last step may stick to the side of the tube, resulting in organoid loss during aspiration of the supernatant after centrifugation, adding 0.2% (w/v) BSA to the PBS in the washing steps may reduce organoid loss.

5. Preparation of the agarose sample for imaging

- Melt light sheet mounting medium by incubating it at 65 °C. Once the medium has melted, incubate it at 37 °C for 5 min.
- Resuspend the organoids in 100 μ L of mounting medium using a 200 μ L tip, with the extremity of the tip cut (minimal size of the extremity: 1.5 mm), by pipetting up and down twice.
- Suck the mounting medium with the organoids in a glass capillary (green capillary, inner diameter: 1.5 mm) using a plunger. Incubate the capillary at room temperature for 5 min for the mounting medium to solidify.

PAUSE: Capillary can be stored in PBS at 4 °C for a week before imaging.

6. Imaging

- Using a light sheet microscope (e.g., ZEISS Lightsheet Z.1), image the organoids with 20x or 40x water immersion objectives.
 - Place the glass capillary in the observation chamber. Locate the capillary with the front camera and place the tip of the glass capillary at the upper limit of the detection objective.
 - Select the sample and set the optimal focus using the tip of the glass capillary in brightfield illumination. Push out the agarose sample slowly from the capillary and locate organoids within the solidified agarose.
 - Keep the organoids to be imaged close to the tip of the capillary, to reduce movements of the agarose sample in the PBS. Rotate the capillary to set the optimal sample orientation and define the desired zoom.
 - Select acquisition mode. Define the channels to image, set proper orientations of the light sheet, set the laser power for each channel (to reduce photobleaching, use low laser power), set the size of the image and the desired illumination side(s). Example of imaging parameters: Image size 1920 x 1920, illumination: dual side.
 - Define the Z-stack to image by setting the Z-extremities of the stack using the Z-stack module and set the Z-step size to optimal.

2. Process the output file using the image processing module of the microscope software to navigate in the sample, obtain a Z-projection and 3D-representation.
3. Turn the sample and acquire a new image from a different angle or image other organoids.
4. Analyze images with an interactive microscopy image analysis software (e.g., Imaris) enabling (i) the visualization of the sample in 3D (ii) the segmentation of objects (iii) identification and quantitative analysis of objects.

Representative Results

Ex vivo organogenesis methods are transforming our capabilities to study mammalian tissue development and maintenance of tissue homeostasis in a dish. The analysis of molecular and cellular mechanisms that regulate these processes, including primary ciliogenesis and ciliary signaling, relies on the ability to image organoids in three-dimension.

The protocol described above enables the staining of whole-mount mammary organoids. They arise from mammary stem

cell-enriched basal cells that are FACS-purified from adult female mice (**Figure 1A**)⁴. The staining procedure enables the visualization of cell lineage, centrosome, and primary cilium markers in organoids in less than 24 h (**Figure 1B**). The strength of the immunofluorescence staining and imaging procedures that we describe for the visualization of the three-dimensional architecture of organoids is exemplified here through the staining and visualization of integrin $\alpha 6$, also known as CD49f (**Figure 1C**). Additionally, the staining of primary cilia (through the staining of Arl13b, a primary cilium marker), of centrosomes (through a γ tubulin staining), and of mammary-stem cell enriched basal cells (through the staining of Slug, an epithelial-mesenchymal transition marker) illustrates the ability to visualize whole-mount organoids at the cellular and sub-cellular scales (**Figure 1C**).

The method described here enables semi-automated segmentation of objects and image analysis (**Figure 1C**, **Animated Figure 1**). Using an interactive microscopy image analysis software, the total cell number, the number of cells from distinct cell lineages, and the number and size of primary cilia can be quantified with accuracy.

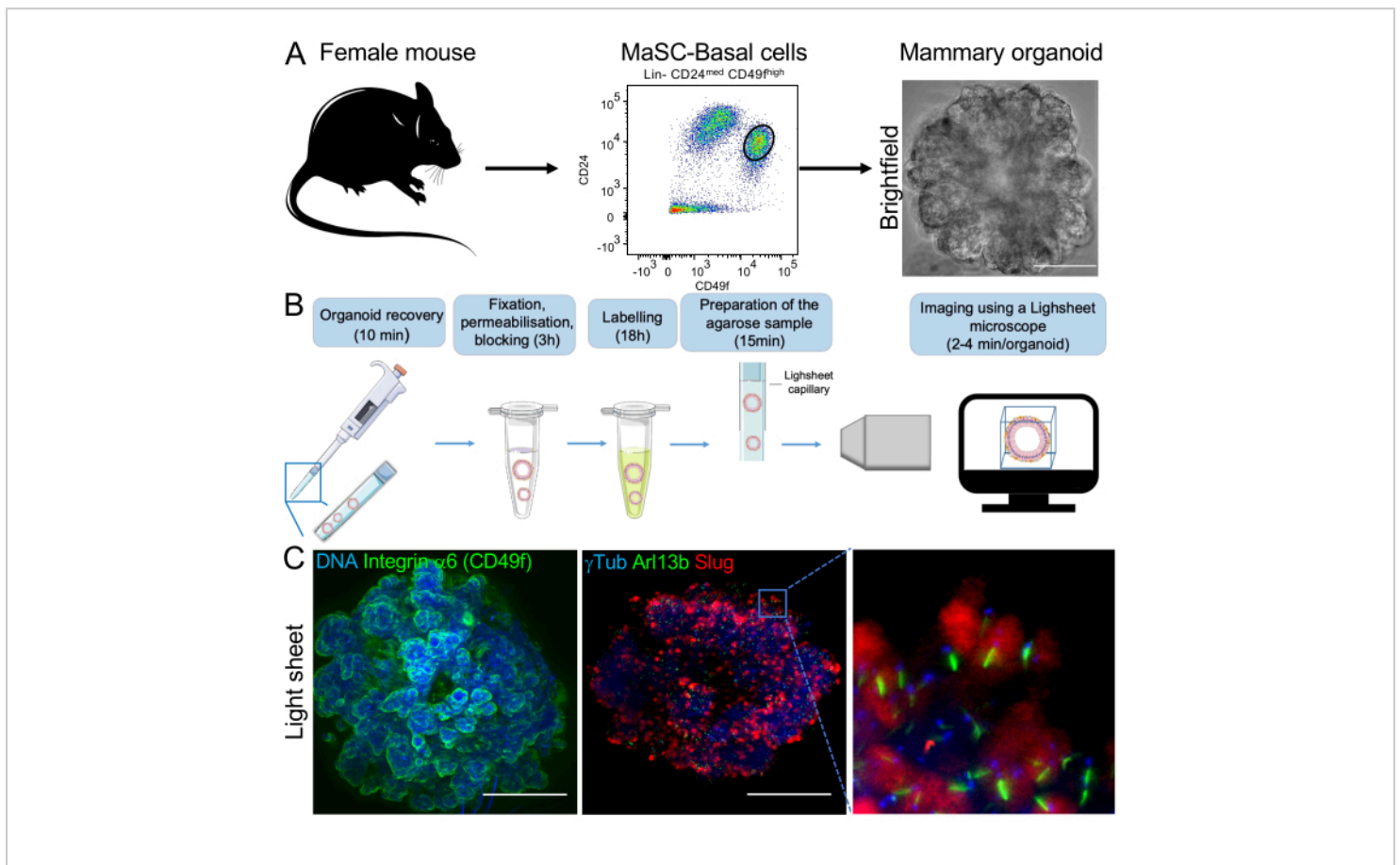


Figure 1: Overview of the immunofluorescence staining and imaging procedures for the analysis of mammary organoids. (A) Mammary glands from adult C57BL6/J female mice are dissociated and mammary stem cell-enriched basal cells are FACS-purified (CD49f^{high};CD24^{med} phenotype) and plated in three-dimension according to Guen et al., 2017⁴. Mammary organoids ranging from 100-300 μm in size are observed 7-14 days after plating by brightfield microscopy. Scale bar: 100 μm. (B) Organoids are recovered, fixed, permeabilized and stained prior to be embedded in agarose in a glass capillary. The procedure takes less than 24 h. Agarose samples containing the organoids are imaged through light sheet microscopy. Imaging of an organoid takes 2-4 min. (C) Mammary organoids were stained for the indicated proteins and imaged following the procedure described above. Hoechst was used as a nuclear dye. All scale bars 100 μm. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Animated Figure 1: Three-dimensional analysis of an organoid at the cellular and sub-cellular scales. Slug-expressing basal cells (Slug staining: red), primary cilia (Arl13b staining: green) and centrosomes (gTubulin staining: magenta) were observed in a mouse mammary organoid through post-acquisition image processing using an

interactive image analysis software enabling semi-automated segmentation. Hoechst was used as a nuclear dye (blue). [Please click here to download this File.](#)

Discussion

The detailed protocol presented here enables the staining and imaging of mouse mammary organoids that grow in semi-solid medium. This protocol is presumably applicable to the staining of organoids mimicking the architecture of various tissues that grow in semi-solid and solid media. For organoids that grow in 100% Matrigel with medium on top, the recovery and fixation steps slightly differ. The culture medium must be removed from the culture well. After a quick PBS wash, the fixative solution (4% PFA) may be directly added in the culture well on the Matrigel-containing organoids. Organoids in Matrigel can be incubated with the fixative solution for 30-60 min at room temperature. Fixed organoids are subsequently transferred to the staining tube after resuspending them in the fixative solution. The fixative solution and the residual Matrigel must be completely removed after centrifugation and prior to the permeabilization step. Organoid permeabilization is a critical step in the protocol. Co-staining of primary cilium and centrosome markers generally requires Triton X-100 and methanol incubation steps. The co-staining of other markers such as cell-cell junction markers or other cytoskeletal proteins may be affected by these permeabilization steps and other strategies may have to be used.

Loss of organoids is an issue during the entire staining procedure. To reduce organoid loss, it is critical to coat the tip that is used to transfer the organoids from the culture well to the staining tube. It is also critical to use a low-binding polymer tube as the staining tube. These measures will prevent organoids from sticking to the tip or the tube during the transferring and washing steps, respectively. Organoids may still be lost during the washing steps after the incubations with antibodies. Adding 0.2% (w/v) BSA to the PBS in the washing steps may reduce organoid sticking to the side of the tube and organoid loss. To ensure enough recovery of organoids for

imaging at the end of the procedure, we recommend starting the experiment with more than 100 organoids.

The protocol presented here enables whole-mount immunofluorescence staining and preparation of organoids for light sheet microscopy. Alternative methods for the staining and preparation of organoids for confocal microscopy were recently published^{15,16}. The light sheet microscopy technology enables faster imaging of organoids than confocal microscopy and offers the possibility to image organoids at the subcellular scale while keeping the overview of entire 3D structures. Visualization of entire structures facilitates the analysis of molecular and cellular mechanisms that occur in a heterogeneous manner in organoids, such as primary ciliogenesis. In the protocol presented here, organoids are embedded in agarose in a glass capillary and can be rotated along the Y-axis in order to facilitate their imaging through the best-suited angle of observation. Proper embedding of the organoids in agarose for imaging is a critical step of the protocol. In the last PBS wash following the incubation with the secondary antibodies, as much PBS as possible must be removed from the staining tube, without sucking the organoids. Reducing the amount of PBS in the staining tube prior to organoid resuspension in the mounting medium will reduce dilution of the agarose solution and ensure proper solidification of the agarose sample in the capillary.

Proper positioning of the agarose sample containing the organoids during imaging is another critical step. It is important to keep the organoids to be imaged in the agarose sample out but close to the tip of the glass capillary. The agarose sample far from the glass capillary tends to move in the PBS in the observation chamber. However, the agarose close to the glass capillary remain immobilized for proper imaging of the organoids. If a movement close to the capillary

is still affecting proper imaging, cutting the extremity of the agarose sample that is floating in the observation chamber may solve the problem. While the glass capillary may be re-used for multiple samples, we do not recommend the re-use of the plunger. We found that the agarose sample tend to slowly escape from the glass capillary when a plunger is re-used, affecting significantly the possibility to image organoids.

The protocol presented here does not include optical clearing of organoids. We found that organoids can be efficiently imaged up to 100-150 μm in depth using our protocol. Imaging of larger whole organoids may require the acquisition of two images from each side of the same organoid. The images can be stitched during the image processing step. Nevertheless, an optical clearing step, as described by others¹⁵, is presumably compatible with the protocol as well. It must be performed after the labelling step and before agarose-embedding of the samples. While optical clearing is not strictly necessary for organoid imaging using a light sheet microscope, optical clearing is especially valuable when imaging organoids with a confocal microscope. Rotation of samples is not possible with this type of microscope.

Light sheet microscopes enable faster image acquisition than standard confocal microscopes and thus enable the analysis of many organoids in a short period of time. The study of multiple organoids enables robust statistical analysis when quantitative measurements are performed during post-acquisition image processing. Advanced confocal microscopes may, however, offer higher image resolution than light sheet microscopes. Both types of microscopy require time consuming post-acquisition image processing for the analysis of organoids in three-dimension. This limitation should be considered. The output file in light sheet microscopy is very large (e.g. 3-8 GB per image) and

management of large datasets can be an issue. The protocol presented here enables three-dimensional analysis of fixed organoids. The fixation and agarose-embedding steps may of course represent a limitation for some applications that require the analysis of very dynamic events in the same organoid over an extended period of time. Live-imaging of organoids, which express fluorescent reporters, may be more appropriate for such analysis. In this setting, organoids would have to be embedded and imaged in a specific gel and in a medium at the appropriate temperature, which preserve the viability and normal physiology of organoids. The light sheet illumination method that reduces photobleaching and phototoxicity and enables faster imaging of samples, in comparison to standard illumination with a confocal microscope, is especially valuable for live-imaging.

In conclusion, the protocol presented here enables the immunofluorescence staining of whole mount mammary organoids that arise from normal and genetically modified mouse mammary stem cells with or without diverse pharmacological perturbations. Thus, it allows an in-depth analysis of the molecular and cellular processes, including primary ciliogenesis and ciliary signaling, that regulate stem-cell self-renewal and differentiation during the course of *ex vivo* organogenesis. This protocol may also be applicable to the staining of breast cancer organoids that arise from transformed cells of cancerous tissues. Therefore, this method should contribute to the development of our knowledge on the biology of the cilium during mammary organoid formation in healthy and pathological conditions. This protocol is presumably applicable to the staining of organoids derived from stem cells of different tissues, with minor modifications. Thus, it may enable the analysis of the

biology of the primary cilium in many tissues in health and disease.

Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Xavier Pinson for help in development of light sheet microscopy; the Biosit biotechnology center, including MRic, Arche, the Flow cytometry core facilities, and SFR Santé F. Bonamy, including the MicroPICell core facility, for technical support. This work was supported by Fondation ARC, Cancéropôle Grand Ouest, Université de Rennes 1, Fondation de France. M.D. was supported by a Graduate Fellowship from the University of Rennes. V.J.G. was supported by a Postdoctoral Fellowship from Fondation ARC.

References

1. Visvader, J. E., Clevers, H. Tissue-specific designs of stem cell hierarchies. *Nature Cell Biology*. **18** (4), 349-355 (2016).
2. Battle, E., Clevers, H. Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine*. **23** (10), 1124-1134 (2017).
3. Clevers, H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*. **165** (7), 1586-1597 (2016).
4. Guen, V. J. *et al.* EMT programs promote basal mammary stem cell and tumor-initiating cell stemness by inducing primary ciliogenesis and Hedgehog signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 10.1073/pnas.1711534114 (2017).
5. Hendriks, D., Clevers, H., Artegiani, B. CRISPR-Cas Tools and Their Application in Genetic Engineering of Human Stem Cells and Organoids. *Cell Stem Cell*. **27** (5), 705-731 (2020).
6. Satir, P., Pedersen, L. B., Christensen, S. T. The primary cilium at a glance. *Journal of Cell Science*. **123** (Pt 4), 499-503 (2010).
7. Guen, V. J., Prigent, C. Targeting Primary Ciliogenesis with Small-Molecule Inhibitors. *Cell Chemical Biology*. **27** (10), 1224-1228 (2020).
8. Goetz, S. C., Anderson, K. V. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature Reviews Genetics*. **11** (5), 331-344 (2010).
9. Han, Y. G. *et al.* Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nature Neuroscience*. **11** (3), 277-284 (2008).
10. Tong, C. K. *et al.* Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **111** (34), 12438-12443 (2014).
11. Wilson, M. M., Weinberg, R. A., Lees, J. A., Guen, V. J. Emerging Mechanisms by which EMT Programs Control Stemness. *Trends in Cancer*. **6** (9), 775-780 (2020).
12. Hilgendorf, K. I. *et al.* Omega-3 Fatty Acids Activate Ciliary FFAR4 to Control Adipogenesis. *Cell*. **179** (6), 1289-1305 e1221 (2019).
13. Joiner, A. M. *et al.* Primary Cilia on Horizontal Basal Cells Regulate Regeneration of the Olfactory Epithelium. *Journal of Neuroscience*. **35** (40), 13761-13772 (2015).
14. Bangs, F. K., Schrode, N., Hadjantonakis, A. K., Anderson, K. V. Lineage specificity of primary cilia in the mouse embryo. *Nature Cell Biology*. **17** (2), 113-122 (2015).

15. van Ineveld, R. L., Ariese, H. C. R., Wehrens, E. J., Dekkers, J. F., Rios, A. C. Single-Cell Resolution Three-Dimensional Imaging of Intact Organoids. *Journal of Visualized Experiments*. 10.3791/60709 (160) (2020).
16. Pleguezuelos-Manzano, C. *et al.* Establishment and Culture of Human Intestinal Organoids Derived from Adult Stem Cells. *Current Protocols in Immunology*. **130** (1), e106 (2020).

Discussion

Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé les défauts de polarité et une partie des mécanismes impliqués dans le contrôle de la prolifération intestinale par AP-1B dans un modèle cellulaire murin. J'ai également mis en évidence son rôle dans le contrôle de la différenciation des cellules intestinales, notamment celle du lignage sécrétoire. En effet, les organoïdes mutés pour *Ap1m2* présentent une hyper-prolifération dépendante des voies de signalisation EGFR et mTOR. L'activation de ces voies pourrait être liée à des défauts de polarité et de trafic, notamment des défauts de localisation apicale du déterminant de polarité CDC42 et des endosomes Rab11+. Cette hypothèse repose notamment sur le fait que la perte de CDC42 entraîne également une hyper-prolifération intestinale, dépendante de l'activation d'une voie de signalisation YAP-EGFR-mTOR (Zhang et al., 2022). L'intensité nucléaire de YAP est également augmentée dans les cryptes des organoïdes mutés pour *Ap1m2*, ce qui peut contribuer à l'hyper-prolifération observée. Cette augmentation n'est cependant pas en amont de l'activation des voies EGFR et mTOR, contrairement à la voie YAP-EGFR-mTOR décrite dans les souris KO pour *Cdc42*. Les mécanismes sous-tendant la prolifération sont donc similaires, mais pas identiques. La translocation nucléaire de YAP pourrait être parallèle à l'activation des voies EGFR et mTOR, ou en aval de l'activation de mTOR, comme cela a pu être décrit précédemment (Liang et al., 2014). La voie WNT/ β -caténine ne semble pas être fortement activée lorsque qu'*Ap1m2* est muté, et ne serait donc pas une des voies majeures contribuant à l'hyper-prolifération intestinale observée dans les organoïdes. En plus de son rôle dans le contrôle de la prolifération, nos résultats montrent qu'AP-1B est également nécessaire à la différenciation intestinale. Lorsqu'*Ap1m2* est muté, les organoïdes présentent un nombre important de cellules sécrétoires au phénotype mixte, possédant des granules de sécrétion caractéristiques des cellules calciformes et des cellules de Paneth. De plus, les cellules de Paneth envahissent les zones en dehors des cryptes, tout comme les cellules souches/progénitrices. Les défauts concernant les cellules de Paneth sont indépendants des voies EGFR et mTOR, et pourraient provenir d'une perturbation de l'équilibre des voies WNT et Notch, les voies majeures impliquées dans la régulation de la différenciation intestinale. AP-1B est donc un acteur essentiel dans le maintien de l'homéostasie, que ce soit à travers la régulation de la polarité apico-basale, ou à travers le contrôle de la prolifération et de la différenciation, qui sont des fonctions moins connues de ce complexe.

I. AP-1B contribue au maintien de la polarité cellulaire intestinale

Les organoïdes mutés pour *Ap1m2* présentent plusieurs défauts importants de polarité cellulaire., ce qui est cohérent avec la littérature (Hase et al., 2013; Shafaq-Zadah et al., 2012; Zhang et al., 2012). L'analyse de la localisation d'une protéine apicale, la *phopsho-ezrine*, et d'une protéine baso-latérale, l'Ephrin B2, a montré que celles-ci ne sont plus localisées de manière exclusive au niveau d'un des deux pôles. De plus, l'analyse par MET a permis de mettre évidence la présence de lumières ectopiques présentant des microvillosités, phénotype décrit chez *C. elegans* (Shafaq-Zadah et al., 2012; Zhang et al., 2012), des défauts d'organisation des jonctions cellulaires, ainsi que la présence au niveau de

certaines cellules de microvillosités au niveau du pôle basal. La morphologie de la bordure en brosse apicale, quant à elle, est parfaitement normale. Les organoïdes mutés pour *Ap1m2* présentent également une altération de la localisation apicale de CDC42 et des endosomes Rab11+. AP-1B contrôle donc la localisation d'une partie des protéines polarisées, nécessaires à l'organisation et à l'homéostasie des cellules épithéliales intestinales.

1. AP-1B ne joue pas un rôle majeur dans le maintien de la bordure en brosse apicale

Les organoïdes mutés pour *Ap1m2* ne présentent pas de défauts au niveau de la bordure en brosse apicale. La longueur, la largeur ou encore la densité en actine des microvillosités, quantifiées à partir des images de MET, ne sont pas affectées (résultats non montrés). Bien qu'elle soit aussi localisée au niveau de la membrane latérale, la *phospho-ezrine* reste fortement localisée au niveau de la bordure en brosse. La localisation de l'actine semble également normale. Les protéines nécessaires au maintien de la bordure en brosse sont donc correctement ciblées, ou alors en quantité suffisante, vers le domaine apical. Dans les souris *Ap1m2^{-/-}*, d'autres protéines de la bordure en brosse, la villine et la sucrase-isomaltase, sont exprimées fortement au niveau apical, bien qu'elles soient localisées aussi au niveau de la membrane latérale. Des défauts mineurs au niveau de la bordure en brosse sont cependant observés par MET (Hase et al., 2013). La perte d'AP-1B étant effective durant le développement des souris *Ap1m2^{-/-}*, il est possible que les différences de phénotype observées soient dues à des rôles différentiels d'AP-1B lors du développement et du maintien. AP-1B ne semble donc pas jouer un rôle majeur dans le maintien de la bordure en brosse intestinale. Il est cependant difficile d'avoir la certitude que celle-ci soit parfaitement fonctionnelle dans les organoïdes, car il faudrait analyser l'expression de nombreux transporteurs pour cela. Les souris *Ap1m2^{-/-}* présentent des symptômes de malnutrition, notamment une baisse des niveaux de glucose et d'albumine dans le sérum. Déterminer la cause précise de ces symptômes est difficile, car de nombreux défauts pourraient y contribuer, notamment la dysplasie des villosités, hypothèse avancée par les auteurs (Hase et al., 2013).

2. Les mutations d'*Ap1m2* entraînent des défauts d'organisation des jonctions serrées et adhérentes

La localisation de l'E-cadhérine, composant des jonctions adhérentes, et de ZO-1, composant des jonctions serrées, est normale dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*. Des défauts d'organisation ont cependant pu être observés en MET. En effet, les jonctions serrées semblent plus longues et peuvent être retrouvées sur ce qui semble être toute la largeur de la cellule, tout comme les jonctions adhérentes. Cependant, au vu de la désorganisation globale de la couche épithéliale, il est parfois difficile d'identifier les phénotypes liés aux jonctions. Les organoïdes mutés pour *Ap1m2* présentent également des défauts d'adhésion, caractérisés par la présence d'espaces intercellulaires importants observés en MET. AP-1B semble donc nécessaire à l'organisation correcte des jonctions cellulaires, mais pas à leur localisation polarisée. Au vu des différents travaux sur ce sujet, le rôle d'AP-1B dans le contrôle de localisation des protéines jonctionnelles, notamment l'E-cadhérine, semble complexe. En effet, ce rôle apparaît comme probablement tissu-spécifique, et pourrait être différent lors de la mise en place ou du maintien des jonctions.

Chez *C. elegans*, la localisation de l'E-cadhérine-caténine est affecté par la perte d'AP-1 dans l'épiderme, mais pas dans l'intestin (Gillard et al., 2015). Dans les cellules MDCK, la perte de la sous-unité μ 1B n'affecte pas la localisation de l'E-cadhérine, de la β -caténine ou de ZO-1 (Gravotta et al., 2007). Ces résultats sont en contradiction avec les observations effectuées dans les cellules LLC-PK1, dans lesquelles l'E-cadhérine et la β -caténine sont enrichies dans le cytoplasme, phénotype qui est corrigé lors de la surexpression de la sous-unité μ 1B (Mimura et al., 2012). Cet enrichissement cytoplasmique de l'E-cadhérine est également observé lors de la perte d'AP-1 chez *Drosophila*, où l'E-cadhérine est localisée au niveau du Golgi et des endosomes de recyclage (Moreno et al., 2022) et lors de la perte d'AP-1B dans l'intestin grêle murin (Hase et al., 2013). Enfin, la déplétion d'*AP1S1*, entraînant la perte des complexes AP-1A et AP-1B, altère la localisation basolatérale de l'E-cadhérine dans les kératinocytes du poisson-zèbre (Montpetit et al., 2008), ce qui n'est pas le cas dans les cellules intestinales Caco-2, où seule la localisation de ZO-1 est perturbée (Klee et al., 2020). Il est difficile de séparer la fonction d'AP-1A de celle d'AP-1B dans le contrôle de la localisation des protéines jonctionnelles, notamment dans les études réalisées sur des organismes modèles. De plus, il semblerait que cette fonction soit tissu-spécifique, comme le montrent les différences observées entre l'épiderme et l'intestin chez *C. elegans*, ou entre les effets de la déplétion d'*AP1S1* dans les kératinocytes du poisson-zèbre et dans les cellules Caco-2. Enfin, AP-1B pourrait avoir des rôles différents lors de la mise en place des jonctions et lors du maintien de celles-ci. Cela pourrait expliquer les différences de localisation de l'E-cadhérine observées entre les souris KO pour *Ap1m2* et les organoïdes mutés pour *Ap1m2*. En effet, dans les souris *Ap1m2*^{-/-}, le KO touche tous les tissus de l'organisme et est effectif durant le développement des souris (Hase et al., 2013) ; les effets observés sur la localisation de l'E-cadhérine et de la β -caténine pourraient donc être causés par des défauts lors de la mise en place des jonctions, et pourraient ne pas être spécifiques au tissu intestinal. Pour mieux comprendre ces différences, nous comptons réaliser des immunomarquages de l'E-cadhérine et de la β -caténine sur les coupes d'intestin des souris *VillinCreERT2 Ap1m2*^{f/f}, pour lesquelles la délétion d'*Ap1m2* est intestin-spécifique et a été induite après la naissance des souris.

3. AP-1B contrôle l'enrichissement apical de CDC42

Dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*, le ratio apico-cytoplasmique de CDC42 et des endosomes Rab11+ est diminué. Nous émettons donc l'hypothèse qu'AP-1B contrôle en partie la localisation apicale de CDC42 à travers la régulation de la localisation des endosomes Rab11+. En effet, il a été montré chez *C. elegans* qu'AP-1 était nécessaire à la localisation apicale des endosomes Rab11+ dans l'intestin (Zhang et al., 2012), et il a été démontré qu'il était localisé au niveau des endosomes de recyclage dans des cellules épithéliales mammifères (Fölsch et al., 2001). Or, les endosomes Rab11+ sont nécessaires à la localisation apicale de CDC42, que ce soit chez *C. elegans* (Shafaq-Zadah et al., 2012), *Drosophila* (Colombié et al., 2017), ou dans les cystes MDCK (Bryant et al., 2010). Cependant, l'altération de la localisation apicale de CDC42 est-elle suffisante pour perturber ses différentes fonctions et participer à l'hyper-prolifération observée dans les organoïdes *Ap1m2* ? Plusieurs éléments peuvent nous conforter dans cette hypothèse. Tout d'abord, nos résultats révèlent une diminution de la localisation apicale d'aPKC, dont le recrutement à la membrane apicale est dépendant de CDC42, ce qui laisse penser que la fonction de CDC42 est affectée. Ensuite, ce sont les fonctions de CDC42 dans le maintien et la mise en place de la polarité qui sont identifiées comme contrôlant la prolifération intestinale dans les souris KO pour *Cdc42*. En effet, les principales caractéristiques observées dans les souris KO pour *Cdc42* (hyper-prolifération, augmentation de l'expression de YAP, augmentation de l'expression des effecteurs de la signalisation mTOR, ect), sont phénotypées dans

les souris KO pour *Scribble* (Zhang et al., 2022), ce qui suggère que ces phénotypes sont provoqués par des défauts de polarité cellulaire. Les fonctions de CDC42 dans la polarité étant dépendantes de sa localisation, on peut supposer qu'au moins une partie des fonctions de CDC42 soient altérées dans les organoïdes *Ap1m2*, et que ces altérations contribuent aux phénotypes observés, notamment d'hyper-prolifération.

II. Voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération par AP-1B

Mes résultats ont permis de montrer l'implication des voies de signalisation EGFR et mTOR dans la prolifération induite par les mutations d'*Ap1m2*. Sans autres données que celles issues des expériences d'inhibition de ces voies, il est difficile d'affirmer si la voie EGFR active la voie mTOR, un processus classiquement décrit dans la littérature (Dobashi et al., 2009; Freudlsperger et al., 2011; Zhang et al., 2022), ou si ces voies sont activées en parallèle. La voie de signalisation Hippo pourrait également être impliquée, étant donné que l'expression nucléaire de YAP augmente lorsqu'*Ap1m2* est muté. Enfin, de façon surprenante, la voie WNT/ β -caténine ne semble pas être activée, bien que des changements d'expression subtils aient pu échapper à notre analyse. L'étude de l'expression protéique et des ARNm de différents effecteurs de ces voies sera nécessaire à la formulation d'une conclusion définitive.

1. Activation de la voie EGFR

L'hyper-prolifération observée dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2* est inhibée lorsque ceux-ci sont cultivés en présence d'Afatinib, un inhibiteur irréversible des récepteurs EGFR et ErbB2. Bien que la présence de cet inhibiteur inhibe également la prolifération dans les organoïdes contrôle, cette inhibition est nettement plus importante dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*. En effet, en présence d'Afatinib, la prolifération dans les organoïdes contrôle est divisée par 1,5, tandis qu'elle est divisée par 8 dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*. Il est d'ailleurs cohérent que la prolifération soit inhibée dans les organoïdes contrôle, la présence d'EGF dans le milieu étant nécessaire à leur croissance et à leur prolifération (Sato, 2009). Les mutations d'*Ap1m2* entraînent donc l'activation de la voie de signalisation EGFR, et plusieurs hypothèses peuvent être émises quant aux mécanismes conduisant à l'activation de cette voie.

a. Rôle possible de CDC42

Il a été montré récemment que l'hyper-prolifération induite par la perte de CDC42 dans les cellules Olfm4+ intestinales reposait sur l'activation d'une voie YAP-EGFR-mTOR (Zhang et al., 2022), nous conduisant à émettre l'hypothèse d'un lien entre les défauts de localisation de CDC42 et l'activation de la voie EGFR. Dans le mécanisme décrit par les auteurs, l'activation de la voie EGFR se fait à travers l'activation de la transcription d'*Ereg*, le gène codant pour l'épiréguline, un ligand de l'EGFR. Une fois activée, la voie EGFR entraîne l'activation de la voie mTOR. L'analyse de l'expression de différents effecteurs de ces voies dans différents contextes d'inhibition (KO pour *Yap*, Afatinib, Rapamycine) a permis d'identifier l'ordre dans lequel ces différentes voies sont activées. Lorsque CDC42 est absent,

YAP n'est plus dégradé par le protéasome, ce qui entraîne une augmentation de son expression, l'activation de la transcription d'*Ereg* et donc celle de la voie EGFR, suivie par l'activation de la voie mTOR. Or, nos résultats montrent que l'augmentation nucléaire de YAP disparaît lorsque les voies EGFR ou mTOR sont inhibées, ce qui laisse penser que YAP se situe en aval de ces voies, contrairement au mécanisme décrit dans les souris KO pour *Cdc42*. L'activation de la voie EGFR ne découlerait donc pas de l'augmentation nucléaire de YAP dans notre modèle. Afin de confirmer ces résultats, il faudrait réaliser un KO ou KD de *Yap* dans nos organoïdes mutés pour *Ap1m2*, et étudier l'effet de celui-ci sur la prolifération et l'expression de *phospho*-EGFR, marqueur de l'activation de la voie EGFR. Il est également prévu d'analyser l'expression d'*Ereg* par qRT-PCR, ce qui nous permettra de savoir si les mécanismes à l'œuvre dans l'hyper-prolifération induite par les mutations d'*Ap1m2* présentent d'autres similitudes avec ceux décrits lors de la perte de CDC42.

L'hypothèse d'un impact des défauts de localisation de CDC42 sur l'EGFR lui-même a également été envisagée. Cependant, les études existantes pointant un lien direct entre CDC42 et l'EGFR montrent que CDC42 possède une fonction d'activation de la voie EGFR, et donc que sa perte de fonction diminue cette signalisation (Hirsch et al., 2006; Wu et al., 2003; Zhang et al., 2020). En effet, dans les organoïdes intestinaux, la perte de CDC42 provoque la mort cellulaire de ceux-ci par apoptose en 72h, et celle-ci serait provoquée par la diminution de la voie EGFR, notamment de la voie de signalisation MAPK (Zhang et al., 2020). La perte de CDC42 entraîne la dépolarisation de l'EGFR et une diminution de son endocytose qui se traduit par une baisse d'expression de *phospho*-EGFR, la forme active du récepteur (Zhang et al., 2020). De plus, dans des lignées non intestinales, CDC42-GTP inhibe la dégradation de l'EGFR à travers la séquestration de c-Cbl, dont l'activité ubiquitine-ligase est nécessaire à la dégradation du récepteur (Hirsch et al., 2006; Wu et al., 2003). L'interaction de CDC42-GTP avec c-Cbl est médiée par son effecteur p85Cool-1 (cloned-out-of-library)/ β -Pix (PAK-interactive exchange factor) (Wu et al., 2003). Ces différents travaux mettent en évidence que les interactions directes ou indirectes de CDC42 avec EGFR aboutissent à une activation de la voie EGFR, notamment à travers son rôle dans l'endocytose du récepteur dans des cellules épithéliales intestinales. L'hypothèse selon laquelle les défauts de localisation apicale de CDC42 observés dans les organoïdes *Ap1m2* induiraient l'activation de la voie EGFR à travers un effet sur la localisation ou le trafic du récepteur semble donc peu probable.

Il est ainsi difficile d'établir une relation directe entre les défauts de localisation apicale de CDC42 et l'activation de la voie EGFR. Cependant, l'activation de la voie EGFR-mTOR dans l'intestin grêle de souris KO pour CDC42 (Zhang et al., 2022) laisse tout de même supposer un lien entre les défauts de localisation observés et l'activation de ces voies. Afin de mieux comprendre le rôle de CDC42 dans l'hyper-prolifération induite par les mutations *Ap1m2*, nous avons essayé de générer des organoïdes mutés pour *Cdc42* de manière inductible à l'aide de CRISPR-CAS9. Malheureusement, ces expériences n'ont pas pu être menées à bout à cause d'une mortalité trop importante de ces organoïdes. Utiliser des inhibiteurs de CDC42, comme ML141 (Surviladze et al., 2010), nous permettrait d'obtenir des réponses. Afin de déterminer si les mutations d'*Ap1m2* ont d'autres effets sur CDC42 que celui d'altérer sa localisation, nous souhaitons étudier l'expression protéique de CDC42 par western-blot, dans les cryptes des organoïdes mutés pour *Ap1m2*. Il serait également intéressant d'étudier les effets des mutations *Ap1m2* sur l'activité GTPase de CDC42 en utilisant une sonde EGFP-wGBD, basée sur le domaine de WASP se liant à CDC42 (Dehapiot et al., 2013). Il apparaît donc qu'identifier les mécanismes dépendants de CDC42 possiblement impliqués dans l'activation de la voie EGFR sera complexe et demandera très probablement des études complémentaires.

b. Rôle du trafic

L'activation de la voie EGFR dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2* pourrait résulter de défauts de trafic des récepteurs ou des ligands, car des défauts de localisation de ceux-ci peuvent entraîner l'activation de cette voie. AP-1B étant un adaptateur de clathrine impliqué dans le tri des protéines polarisées, il pourrait jouer un rôle dans le trafic des ligands ou récepteurs de la voie EGFR et ainsi contribuer à l'homéostasie intestinale.

1. Trafic des ligands

La signalisation EGFR comporte de nombreux ligands, le plus connu étant évidemment l'EGF. Tous ces ligands, excepté l'EGF, sont adressés à la membrane latérale après leur synthèse (Singh and Coffey, 2014). En effet, le précurseur de l'EGF (proEGF) est adressé de manière équivalente vers la membrane apicale et latérale, mais il est clivé de manière sélective au niveau de cette dernière, ce qui permet la production d'une forme d'EGF de 170kDa soluble (Dempsey et al., 1997). Des défauts d'adressage de deux de ces ligands, entraînant des défauts de localisation, provoquent une activation aberrante de la signalisation EGFR (Singh et al., 2013; Singh et al., 2015; Singh et al., 2021). En effet, l'adressage apical forcé de l'EREG dans des cellules MDCK, réalisé grâce à la modification de son motif d'adressage, conduit à la phosphorylation prolongée des résidus tyrosine de l'EGFR, et donc à l'activation prolongée de cette voie de signalisation (Singh et al., 2013). Les cellules MDCK sont ainsi transformées, et forment dix fois plus de colonies que des cellules MDCK wild-type (WT) *in vitro*, ainsi que des tumeurs lorsqu'elles sont transplantées dans des souris nude (Singh et al., 2013). De façon surprenante, l'adressage forcé de l'EREG vers la membrane apicale conduit également à la formation de lumières ectopiques dans des cystes de cellules MDCK (Singh et al., 2021). Ces lumières ectopiques sont formées *de novo*, et leur formation dépend du clivage de l'EREG médié par une métalloprotéase, donc de l'activité de l'EREG (Singh et al., 2021).

Ce phénotype a également été décrit dans des cellules MDCK en monocouche, lorsque la BTC, autre ligand de l'EGFR, est adressée vers la membrane apicale, encore une fois grâce à des modifications de son motif d'adressage (Singh et al., 2015). Ces lumières ectopiques se forment après la mise en place de la polarité apico-basale, et ne résultent pas de la transcytose de protéines apicales. Comme pour celles décrites dans les cystes MDCK, leur formation est dépendante de la signalisation EGFR, celle-ci étant inhibée en présence d'un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (Singh et al., 2015). Les cellules MDCK dans lesquelles l'adressage apical de la BTC a été forcé présentent enfin une croissance plus importante, avec un nombre de cellules deux fois plus important que celui des cellules WT (Singh et al., 2015).

Des défauts d'adressage de ligands de la signalisation EGFR peuvent donc aboutir à une forte activation de cette voie, entraînant la formation de lumières ectopiques et une prolifération accrue, deux caractéristiques phénotypiques des organoïdes mutés pour *Ap1m2*. AP-1B étant impliqué dans le tri des protéines polarisées, des perturbations de sa fonction pourrait entraîner ces défauts d'adressage. AP-1B ne semble néanmoins pas impliqué dans le trafic de l'EREG, sa localisation étant latérale dans les cellules LLC-PK1 (dépourvues d'AP-1B) et dans des cellules MDCK KO pour μ 1B (Singh et al., 2013). Son rôle dans le trafic de la BTC n'est pas connu. A ce jour, seul le recyclage de l'AREG a été identifié comme dépendant d'AP-1B (Gephart et al., 2011), et les conséquences que pourraient avoir des défauts de trafic de ce ligand sur les cellules polarisées ne sont pas connues. Ainsi, il est donc possible que les mutations d'*Ap1m2* causent des défauts de trafic d'un ou plusieurs ligands de la voie

EGFR, entraînant des défauts de localisation de ceux-ci et l'activation aberrante de la signalisation EGFR. Afin de vérifier cette hypothèse, une analyse de l'expression et de la localisation des différents ligands de la voie EGFR serait nécessaire.

2. Trafic des récepteurs

L'activation de la voie EGFR dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2* pourrait également être due à des défauts de trafic des récepteurs de cette voie, notamment l'EGFR et ErbB2, dont le trafic est dépendant d'AP-1B.

L'EGFR est localisé au niveau de la membrane latérale des cellules épithéliales intestinales (Playford et al., 1996). Cette localisation dépend de deux voies d'adressage biosynthétique : une dépendante de la phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) de la Thr654, utilisée de façon préférentielle lors de la formation des jonctions cellulaires (Cotton et al., 2013a), et une voie dépendante d'AP-1B, à travers l'interaction avec un motif dileucine (Ryan et al., 2010). En ce qui concerne la première voie, les auteurs postulent que l'EGFR est séquestré au niveau des endosomes Rab11+ subapicaux jusqu'à ce que les jonctions cellulaires soient assemblées, et est ensuite recyclé vers la membrane basolatérale par un mécanisme impliquant la phosphorylation PKC-dépendante de la Th654 (Cotton et al., 2013a; Ryan et al., 2010). Lorsque les jonctions cellulaires sont établies, la localisation basolatérale de l'EGFR est dépendante de l'interaction entre un motif 658-LL et AP-1B. Le tri de l'EGFR par AP-1B s'effectuerait probablement au niveau de compartiments endosomaux post-TGN (Cotton et al., 2013a; Ryan et al., 2010).

Des perturbations d'une de ces deux voies aboutissent à la localisation partiellement apicale de l'EGFR, avec comme exemple les cellules LLC-PK1 (Ryan et al., 2010). Ce phénotype de localisation apicale de l'EGFR est présent dans les cellules de patients souffrant d'une polykystose rénale, et serait en partie responsable de la prolifération cellulaire observée à travers une suractivation de la voie de signalisation EGFR (Wilson, 2011). Perturber la voie de trafic AP-1B dépendante, en modifiant le motif d'adressage reconnu, aboutit de manière intéressante à la formation de plusieurs AMIS dans des cystes de cellules MDCK (Cotton et al., 2013a). Il est donc possible que l'activation de la voie EGFR dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2* soit provoquée par un défaut de localisation apicale due à un défaut de trafic de la voie dépendante d'AP-1B. Afin de confirmer cette hypothèse, des immunomarquages de l'EGFR pourraient être réalisés.

D'autres facteurs impliqués dans le trafic de l'EGFR ont été identifiés dans des cellules cancéreuses présentant une faible polarité apico-basale, notamment les endosomes Rab11+, impliqués dans le recyclage de l'EGFR (Chi et al., 2011; Palmieri et al., 2006), les endosomes Rab12+ (Wang et al., 2023), l'adaptateur de clathrine Eps15S (Chi et al., 2011) ou encore AP-1 (Uemura et al., 2021; Wang et al., 2023). Cependant, perturber la fonction de ces différents facteurs aboutit de façon générale à une baisse de la prolifération, ou une baisse de la réponse proliférative à l'EGF (Chi et al., 2011; Palmieri et al., 2006; Uemura et al., 2021; Wang et al., 2023). Au vu des différences entre les cellules utilisées dans ces études et des cellules épithéliales polarisées, l'EGFR ne présentant pas de localisation polarisée dans les cellules HeLa ou HEK293T (Uemura et al., 2021; Wang et al., 2023), les mécanismes mis au jour dans ces cellules ne sont pas forcément conservés dans notre cas de figure.

Le trafic de ErbB2, autre récepteur de la voie EGFR, dont la localisation est basolatérale dans les cellules épithéliales polarisées, est en partie dépendant d'AP-1B. En effet, sa localisation est partiellement apicale dans les cellules LLC-PK1, et devient basolatérale lorsque ces cellules sont

transfectées avec μ 1B (Dillon et al., 2002). Les voies de signalisation activées lorsque ErbB2 est apical semblent différentes de celles activées lorsqu'il est basolatéral, car ErbB2 apical est phosphorylé sur la tyrosine 1139, contrairement à ErbB2 basolatéral (Pfister et al., 2010). Cette localisation apicale peut être induite par la surexpression d'ErbB2 ou l'expression de Muc4 dans des cellules Caco-2 (Pfister et al., 2010; Ramsauer et al., 2006). L'expression de Muc4 induit l'activation de la voie Akt et p38 MAPK (Ramsauer et al., 2006), cette dernière étant également activée par la surexpression de ErbB2 (Pfister et al., 2010). La voie canonique Ras-Raf-ERK n'est cependant pas activée (Pfister et al., 2010; Ramsauer et al., 2006). Ces travaux montrent que les voies de signalisation activées peuvent être différentes en fonction de la localisation du récepteur ErbB2. Bien que la voie majeure activée lorsque celui-ci est apical soit plutôt impliquée dans la survie plus que dans la prolifération, son trafic est à priori dépendant d'AP-1B, il serait donc intéressant d'analyser l'expression, la localisation et l'activation de ce récepteur dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*.

Les récepteurs de la voie de signalisation EGFR sont fortement exprimés dans les cellules souches, ainsi que dans les cellules de la TA (Abud et al., 2021), et une étude récente semble montrer une forte régulation du trafic de l'EGFR dans les ISCs, soulignant l'importance de cette voie et de sa régulation par le trafic. En effet, les ISCs orientent latéralement leur appareil de Golgi vers la cellule de Paneth avec laquelle elles sont en contact, ce qui permet d'augmenter l'efficacité du transport de l'EGFR, qui est corrélée avec une forte phosphorylation de ERK1/2 (Scharaw et al., 2023). Les ISCs peuvent également diviser leur appareil de Golgi en plusieurs unités si celles-ci sont en contact avec deux cellules de Paneth (Scharaw et al., 2023).

Il apparaît donc que le trafic des effecteurs de la signalisation EGFR est finement régulé, et que des perturbations de celui-ci peuvent résulter en l'activation aberrante de cette voie. L'hyper-prolifération des organoïdes mutés pour *Ap1m2*, dépendante de l'activation de la voie EGFR, pourrait donc provenir de défauts de trafic des différents ligands ou récepteurs de cette voie. Enfin, afin de mieux caractériser l'activation de celle-ci et celle de mTOR, et déterminer avec certitude celle qui est en aval, il faudra analyser l'expression de différents effecteurs de ces deux voies, comme *phospho*-EGFR, *phospho*-ERK1/2, *phospho*-Akt pour la voie EGFR, *phospho*-4EBP et *phospho*-S6 pour mTOR, et ce lors de cultures avec les différents inhibiteurs.

c. Rôle de Merlin

Les organoïdes mutés pour *Ap1m2* présentent une altération de la localisation apicale des endosomes Rab11+. Or, Rab11a est nécessaire à localisation de Merlin/Nf2 (Goswami et al., 2021), un supresseur de tumeur identifié comme régulateur de la signalisation EGFR (Curto et al., 2007). En effet, Merlin est recruté au niveau des jonctions adhérentes en formation, où il est activé et participe à la stabilisation des complexes jonctionnels. En parallèle, il séquestre un pool de l'EGFR, avec lequel il interagit via l'adaptateur NHERF1, qui ne peut donc être internalisé ou en contact avec ces cibles directes. Cela entraîne une diminution de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR au niveau des jonctions cellulaires. Lorsque Merlin est absent, les cellules prolifèrent de manière excessive de façon EGFR-dépendante (Curto et al., 2007). Il est donc possible que l'altération de la localisation des endosomes Rab11+ observée dans les organoïdes *Ap1m2* perturbe la localisation de Merlin, et donc sa régulation de la voie EGFR, participant donc à l'activation aberrante de cette voie.

2. Activation de la signalisation YAP

Mes résultats ont montré une accumulation nucléaire de YAP dans les cryptes des organoïdes mutés pour *Ap1m2*. Cette accumulation, marqueur de l'activation de la signalisation YAP, pourrait contribuer à l'hyper-prolifération observée. Cette accumulation semble cependant en aval de l'activation des voies EGFR et mTOR, contrairement à ce qui a été décrit dans les souris KO pour *Cdc42*.

a. Rôle de la polarité

Dans les souris KO pour *Cdc42*, Zhang et al. proposent que l'accumulation de YAP, au niveau cytoplasmique puis nucléaire, soit provoquée par une perte de polarité globale, causée par la perte de CDC42 (Zhang et al., 2022). En effet, lorsque CDC42 est absent, la liaison de Scribble au complexe MST1/2-LATS1/2-YAP diminue, et la diminution de cette liaison serait responsable de la baisse de la phosphorylation de MST1/2, ainsi que celle de LATS1/2, et donc de celle de YAP. La diminution de la phosphorylation de YAP entraîne une diminution de sa dégradation, donc son accumulation cytoplasmique puis sa translocation nucléaire. La perte de Scribble phénocopie la perte de CDC42, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle l'accumulation de YAP est provoquée par une perte de polarité globale. Cependant, la perte de Scribble produit des phénotypes plus modérés, laissant penser que CDC42 possède des fonctions supplémentaires dans les ISCs. L'altération de la localisation apicale de CDC42 dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*, et la perturbation de la polarité en résultant, pourraient donc contribuer à l'accumulation nucléaire de YAP observée. Afin de mieux caractériser les mécanismes contribuant à celle-ci, il serait intéressant d'étudier la liaison du complexe MST1/2-LATS1/2-YAP à Scribble par co-immunoprécipitation, et l'expression de YAP, MST1/2, LATS1/2, ainsi que celle de leurs formes phosphorylées.

b. Rôle des endosomes Rab11+

Il a également été montré que les endosomes Rab11+ jouent un rôle important dans la séquestration cytoplasmique de YAP. Dans les cellules Caco-2, la perte de Rab11a entraîne une baisse de la phosphorylation de YAP au niveau de la sérine 127, phosphorylation importante pour la séquestration cytoplasmique de YAP, ce qui suggère une interaction entre Rab11a et l'activité kinase de LATS1/2, responsable de cette phosphorylation (Goswami et al., 2021). La perte de Rab11a altère également l'organisation des jonctions adhérentes et leur liaison avec YAP, ce qui a amené les auteurs à théoriser un modèle de *signalosome* Hippo-YAP, présent au niveau des jonctions adhérentes, et dépendant des endosomes Rab11a+. Dans une situation homéostatique, les endosomes Rab11a+ s'associeraient donc avec YAP, des protéines des jonctions adhérentes, α et β -caténine, et des protéines échafaudage, AMOTL-2 et Merlin, aussi appelée Nf2. Merlin est un suppresseur de tumeur, et joue un rôle dans la régulation de la signalisation Hippo-YAP en se liant à LATS1/2 (Yin et al., 2013), et sa perte phénocopie celle de Rab11a dans les cellules Caco-2 (Goswami et al., 2021). Lorsque ce complexe est présent, YAP serait donc phosphorylé par LATS1/2 et séquestré dans le cytoplasme puis dégradé. L'altération de la localisation apicale des endosomes Rab11+ dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2* pourrait donc perturber la mise en place de ce complexe de signalisation et contribuer à l'augmentation de l'expression nucléaire de YAP. Etudier l'expression et la localisation de Merlin pourrait nous apporter d'autres éléments de réponse.

3. Rôle de la signalisation mTOR

Dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*, l'accumulation nucléaire de YAP disparaît lors l'inhibition des voies EGFR ou mTOR, ce qui suggère que celle-ci se trouve en aval des signalisation EGFR et mTOR. Ce cas de figure est peu commun dans la littérature, l'activation de la signalisation YAP se trouvant généralement en amont des voies EGFR et mTOR. Cependant, une étude a décrit un mécanisme par lequel l'activation de la voie mTOR aboutit à l'accumulation nucléaire de YAP (Liang et al., 2014). En effet, YAP peut être dégradé de plusieurs façons : par le protéasome, mécanisme qui dépend de sa phosphorylation, donc de la voie Hippo, ou par les autophagosomes/lysosomes. La perte de *Tsc2*, un régulateur négatif de la voie mTOR, aboutit à une accumulation nucléaire de YAP et une hyper-prolifération. De façon surprenante, cette accumulation n'est pas due à une perturbation de la dégradation protéosomale de YAP : aucune altération de l'activité kinase de LATS1/2 n'est détectée. Cependant, l'utilisation de la chloroquine, substance lysosomotropique et inhibitrice de l'autophagie, induit une accumulation de YAP dans les cellules contrôle, mais pas dans celles *Tsc2*^{-/-}. De plus, la fraction de YAP colocalisant avec des vésicules Lamp2+ (un marqueur de lysosomes), est plus faible dans les cellules *Tsc2*^{-/-}. Ces résultats suggèrent donc que l'accumulation nucléaire de YAP est provoquée par des perturbations de la voie de dégradation autophagique, causées par l'activation de la signalisation mTOR. Nous avons observé par MET une perturbation des compartiments de dégradation lysosomaux (augmentation de leur nombre, présence de lysosomes géants), il est ainsi possible qu'un mécanisme similaire soit à l'œuvre dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*. Traiter les organoïdes avec de la chloroquine et réaliser un co-immunomarquage de Lamp2 et YAP permettrait de vérifier cette hypothèse.

3. Pas d'activation apparente de la voie WNT/ β -caténine

De façon surprenante, aucune accumulation nucléaire de la β -caténine, caractéristique de l'activation de la voie de signalisation WNT/ β -caténine, n'a pu être détectée dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*. Nos méthodes d'immunomarquages et d'imagerie sont pourtant suffisantes pour détecter l'accumulation nucléaire de la β -caténine induite par l'inhibition de GSK3 β . Afin de confirmer ces résultats, il sera nécessaire d'analyser l'expression par qRT-PCR de différentes cibles de la voie WNT/ β -caténine, comme *c-myc*, *CD44*, ou *Axin2*. Nous pourrions également cultiver les organoïdes avec IWR1, un inhibiteur de la β -caténine promouvant sa dégradation (Hase et al., 2013), et analyser son effet sur la prolifération, ce qui nous permettrait de savoir si l'hyper-prolifération induite par les mutations d' *Ap1m2* est dépendante de la voie WNT/ β -caténine. Au vu de l'importance de cette voie dans la régulation de la prolifération et la différenciation intestinale, ainsi que des résultats obtenus dans les souris KO pour *Ap1m2*, il est peu probable qu'elle ne soit pas du tout perturbée. Cependant, ces perturbations ne sont peut-être pas suffisamment importantes pour induire une forte activation, donc une accumulation nucléaire détectable de la β -caténine, dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*. Il est également possible que l'activation de la voie WNT/ β -caténine dans les souris *Ap1m2*^{-/-} soit potentialisée par le fait que la perte d'AP1-B soit ubiquitaire, et effective durant le développement des souris. Enfin, les mécanismes décrits dans notre modèle sont strictement épithéliaux, tandis que ceux mis à jour dans le modèle murin peuvent être dépendants des cellules stromales. Il existe en effet une forte communication entre les cellules stromales et épithéliales intestinales, notamment pendant le développement (Maimets et al., 2022), et cette communication peut se faire dans les deux sens :

cellules stromales vers épithéliales, ou l'inverse (Madison et al., 2005). Il est donc possible que l'activation de la voie WNT/ β -caténine dans les souris *Ap1m2*^{-/-} soit provoquée ou renforcée par des signaux provenant du mésenchyme.

III. AP-1B contrôle la différenciation intestinale

En plus de son rôle dans le contrôle de la polarité apico-basale et de la prolifération, AP-1B semble également posséder un rôle dans le contrôle de la différenciation intestinale. En effet, les organoïdes mutés pour *Ap1m2* présentent une expansion de la zone des cellules souches/progénitrices en dehors des cryptes, mais surtout des perturbations majeures de la différenciation du lignage sécrétoire. Tout d'abord, un nombre important de cellules sécrétoires possédant des granules de sécrétion caractéristiques des cellules caliciformes, mais aussi des cellules de Paneth, est observé. Ces cellules présentent un phénotype mixte et sont désignées dans la littérature comme des cellules intermédiaires. Ensuite, des cellules Lysozyme+ (marqueur de cellules de Paneth) sont présentes dans les zones de transition et en dehors des cryptes. Certaines de ces cellules sont des cellules de Paneth matures, mais des cellules intermédiaires composent une partie d'entre elles. Ces cellules intermédiaires sont également présentes dans les cryptes. Le nombre total de cellules de Paneth et de cellules caliciformes n'est cependant pas affecté.

1. Perturbations de la différenciation du lignage sécrétoire

La différenciation du lignage sécrétoire intestinal est dépendante de la signalisation Notch, il est donc probable que cette signalisation soit perturbée dans les organoïdes *Ap1m2*. Plusieurs mécanismes peuvent contribuer à cette perturbation, comme des défauts de trafic des récepteurs ou encore une perte des contacts cellulaires.

a. Perturbations de la signalisation Notch

L'augmentation du nombre de cellules sécrétoires est un phénotype caractéristique de l'inhibition de la signalisation Notch : l'utilisation de dibenzazépine, un inhibiteur de la γ -sécrétase (une enzyme nécessaire au clivage du NICD) induit la différenciation précoce des progéniteurs sécrétoires en différents types cellulaires sécrétoires, et une large partie de ces cellules expriment des marqueurs de cellules de Paneth et de cellules caliciformes (VanDussen et al., 2012). Bien que seul le nombre de cellules intermédiaires soit augmenté dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*, ne reflétant pas toutes les caractéristiques du phénotype de l'inhibition de Notch, il est probable que cette signalisation soit perturbée. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette perturbation.

Tout d'abord, les cellules des organoïdes mutés pour *Ap1m2* présentent des défauts de contacts cellulaires, ce qui pourrait altérer la signalisation Notch, connue pour être dépendante de ces contacts. En effet, la signalisation entre deux cellules est corrélée avec leur surface de contact, et cette relation peut avoir un effet sur le processus d'inhibition latérale, dépendant de la signalisation Notch (Shaya et al., 2017).

Le trafic des ligands Notch ou des récepteurs pourrait également être perturbé. Chez *Drosophila*, dans les cellules filles des SOP, AP-1 joue un rôle dans le trafic basolatéral de Notch, de Sanpodo, un activateur de Notch, et de Delta, son ligand (Bellec et al., 2021; Benhra et al., 2011). Cependant, dans ce cas de figure, AP-1 est un régulateur négatif de la signalisation Notch, et sa perte entraîne l'apparition d'un phénotype gain de fonction Notch (Bellec et al., 2021; Benhra et al., 2011). Il est néanmoins possible que dans le tissu intestinal, la perte d'AP-1B, si celui-ci est impliqué dans le trafic de Notch ou de ses ligands, ait un effet contraire, au vu des différences de régulation de la signalisation Notch entre les deux tissus.

La signalisation Notch est cruciale lors de l'engagement des progéniteurs vers le lignage sécrétoire ou absorbant, il est donc probable que celle-ci soit perturbée dans les organoïdes *Ap1m2*, par des défauts de trafic ou de contacts cellulaires, et que cette perturbation aboutisse à la forte augmentation du nombre de cellules sécrétoires intermédiaires observée. L'analyse de l'expression par qRT-PCR des ligands *Dll1* et *Dll4*, ainsi que celle du récepteur *Notch 2* et celle du facteur *Hes1*, nous permettra de mieux appréhender les altérations possibles de cette voie. Des analyses de localisation seraient cependant nécessaires à une compréhension plus approfondie, notamment à la détection de défauts de trafic.

b. Identité et rôle des cellules intermédiaires ?

Les cellules intermédiaires observées dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2* sont rares dans l'épithélium intestinal adulte (Montero and Erlandsen, 1978). Celles-ci sont prolifératives (Troughton and Trier, 1969), et sont présentes généralement dans la zone de transition, mais elle peuvent également être trouvées dans les villosités (Montero and Erlandsen, 1978). Elles contiennent des granules de mucus, ainsi que des granules contenant du lysozyme, elles peuvent donc être identifiées à l'aide de doubles marquages (Montero and Erlandsen, 1978). La fonction de ces cellules reste floue. Une forte augmentation de leur nombre a été reportée dans des cas d'infection (Kamal et al., 2001), laissant supposer un rôle dans la défense du tissu intestinal. Ces cellules sont également envisagées comme des cellules progénitrices ou « cellules de transition », leur nombre devenant important à la suite de dommages induits à l'épithélium (King et al., 2013), ou de l'inhibition de la signalisation Notch (VanDussen et al., 2012). Il existe plusieurs études rapportant une altération de la différenciation du lignage sécrétoire, et une augmentation du nombre de cellules intermédiaires, permettant d'appréhender la complexité de la régulation de la différenciation intestinale. Ce phénotype est observé lors de la délétion de *Cdc42* dans l'épithélium intestinal murin (Melendez, 2013), de *Lkb1* (kinase essentielle dans le maintien de la polarité) (Kim et al., 2022; Shorning et al., 2009), de *Cdh1* (gène codant pour l'E-cadhérine) (Schneider et al., 2010), des histones déacétylases *Hdac1* et *Hdac2* (Gonneaud et al., 2019) ou encore lors de la perte ubiquitaire de l'activité de NF- κ B (Brischetto et al., 2021). Cependant, l'augmentation du nombre de cellules intermédiaires est accompagnée de variations du nombre de cellules de Paneth et de cellules caliciformes dans la plupart de ces études, ce qui n'est pas le cas dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*. Afin de mieux comprendre les mécanismes responsables de la présence importante de ces cellules intermédiaires, l'analyse de l'expression de différents facteurs impliqués dans la différenciation des cellules de Paneth ou caliciformes, comme SPDEF, SOX9, ATOH1, serait nécessaire.

c. Défauts de migration des cellules de Paneth

Les organoïdes mutés pour *Ap1m2* présentent des cellules Lysozyme+ dans la zone de transition et en dehors des cryptes. Une partie d'entre elles sont des cellules intermédiaires, mais certaines sont des cellules de Paneth matures. Ce phénotype est également présent dans les souris KO pour *Cdc42* (Melendez, 2013; Zhang et al., 2022). Ce phénotype n'est pas corrigé par l'inhibition de la voie EGFR ou mTOR, dans nos organoïdes comme dans les souris KO pour *Cdc42* (Zhang et al., 2012), et semble donc indépendant de la prolifération. Le positionnement et la migration des cellules de Paneth dans l'épithélium intestinal sont dépendants de la signalisation Eph-Ephrin (Batlle et al., 2002) ; l'Ephrin B2 présentant des défauts de localisation dans les organoïdes *Ap1m2*, il est possible que la signalisation Eph-Ephrin soit perturbée. Des analyses plus poussées de l'expression de l'Ephrin B2 et B3 permettraient de déterminer si les organoïdes mutés pour *Ap1m2* présentent des défauts de la signalisation Eph-Ephrin pouvant expliquer la migration aberrante des cellules de Paneth. De façon intéressante, dans les souris KO pour *Cdc42* ou *Cdh1*, qui présentent le même phénotype de cellules de Paneth ectopiques, la signalisation Eph-Ephrin n'est pas perturbée, suggérant la présence d'autres mécanismes pouvant réguler la migration des cellules de Paneth (Schneider et al., 2010; Zhang et al., 2022).

Enfin, AP-1B a été montré comme pouvant jouer un rôle dans la migration cellulaire à travers le contrôle de la localisation de la β 1- intégrine (Kell et al., 2020). Or, les cellules de Paneth possèdent plus de β 4-intégrine sur leur surface basale que les autres cellules de la crypte, et cette adhérence différentielle est nécessaire au processus de fission des cryptes (Langlands et al., 2016). Bien que la β 4-intégrine n'ait pas été identifiée comme impliquée dans la migration des cellules de Paneth à ce jour, on peut imaginer que les mutations d'*Ap1m2* perturbent l'expression de cette intégrine, ce qui pourrait participer à la migration aberrante observée.

2. Expansion de la zone des cellules souches/progénitrices

Enfin, en plus des altérations de la différenciation du lignage sécrétoire, les organoïdes mutés pour *Ap1m2* présentent des cellules Olfm4+ en dehors des cryptes. Olfm4 est connu comme un marqueur d'ISCs, mais une étude récente montre que celui-ci est exprimé par la majorité des cellules de la crypte (Liu and Rodgers, 2022). L'utilisation d'autres marqueurs, comme LGR5, serait donc nécessaire afin de déterminer avec plus de précision l'identité des cellules Olfm4+ présentes en dehors des cryptes. Olfm4 est une cible des voies de signalisation WNT (Liu and Rodgers, 2022), Notch (Kuno et al., 2021; Tsai et al., 2022) et NF- κ B (Chin et al., 2008), la perturbation d'une ou plusieurs de ces voies pourrait donc être à l'origine de l'expression de ce marqueur par des cellules en dehors des cryptes. Il est probable que la voie de signalisation Notch soit diminuée dans les organoïdes *Ap1m2*, au vu du phénotype de différenciation sécrétoire observé, mais une baisse de cette signalisation entraîne aussi une diminution du nombre d'ISCs, donc de cellules Olfm4+, ce qui n'est pas le cas dans les organoïdes *Ap1m2*. Est-ce-que les cellules de Paneth ou les cellules intermédiaires situées en dehors des cryptes pourraient sécréter des facteurs de la niche épithéliale et participer à l'identité souche des cellules voisines ? Sans co-marquage Lysozyme-Olfm4 ou analyse de l'expression de différents marqueurs des voies Notch et WNT (tels que cités plus haut), il est difficile de formuler des hypothèses.

On peut tout de même noter que dans des souris KO pour *Cdc42*, l'expression de l'ARNm d'Olfm4 est plus importante et semble plus étendue, selon l'analyse par hybridation *in situ* (Melendez, 2013).

De façon surprenante, le nombre de cellules Olfm4+ est, au contraire, diminué dans un autre modèle de souris KO pour *Cdc42* (Zhang et al., 2022). Ces modèles de KO sont différents : le premier est un KO touchant toutes les cellules épithéliales et le deuxième seulement les cellules Olfm4+. Les observations de l'augmentation de l'expression de l'ARNm d'Olfm4 peuvent nous suggérer l'implication de CDC42 dans le phénotype d'expansion que nous observons, mais les différences d'observations présentes entre les deux modèles nous laissent penser que le rôle de CDC42 dans la régulation de la différenciation est complexe, et peut différer selon le type cellulaire.

IV. Conclusion

L'ensemble de mes résultats met en évidence un rôle essentiel d'AP-1B dans l'homéostasie épithéliale intestinale. A travers ses fonctions dans le trafic polarisé, il contribue au maintien de la polarité cellulaire, au contrôle de la prolifération et de la différenciation. Certains mécanismes sous-tendant ces processus semblent différents dans les organoïdes et les souris. Les organoïdes intestinaux, bien que capables de récapituler l'essentiel de l'architecture intestinale, ne peuvent reproduire à l'identique les processus à l'œuvre au sein d'un tissu intégré à un organisme, ce qui peut expliquer ces différences. De plus, ils sont constitués uniquement de cellules épithéliales, les mécanismes découverts ne s'appliquent donc qu'à ce type de cellules, et non au tissu entier, ce qui constitue un inconvénient, mais aussi un avantage. En effet, ils peuvent être utilisés pour découpler les contributions des cellules mésenchymateuses et épithéliales à différents processus, comme la production des facteurs de niche. Ils restent également un modèle facilement modifiable génétiquement, contrairement aux souris, et croissent dans un environnement très contrôlé, ce qui rend plus simple la manipulation de certaines voies de signalisation ou de contraintes biomécaniques. La poursuite des investigations sera nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes par lesquels AP-1B contrôle la prolifération et la différenciation intestinale, et si ces mécanismes sont entièrement conservés chez la souris.

- Abud, H. E., Chan, W. H. and Jardé, T.** (2021). Source and Impact of the EGF Family of Ligands on Intestinal Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**,.
- Accarie, A. and Vanuytsel, T.** (2020). Animal Models for Functional Gastrointestinal Disorders. *Front Psychiatry* **11**, 509681.
- Adams, A. E., Johnson, D. I., Longnecker, R. M., Sloat, B. F. and Pringle, J. R.** (1990). CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* **111**, 131–142.
- Ahmed, S. M. and Macara, I. G.** (2017). The Par3 polarity protein is an exocyst receptor essential for mammary cell survival. *Nat Commun* **8**, 14867.
- Alexandre, C., Baena-Lopez, A. and Vincent, J.-P.** (2014). Patterning and growth control by membrane-tethered Wingless. *Nature* **505**, 180–185.
- Al-Sadi, R., Khatib, K., Guo, S., Ye, D., Youssef, M. and Ma, T.** (2011). Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**, G1054-1064.
- Alsaif, H. S., Al-Owain, M., Barrios-Llerena, M. E., Gosadi, G., Binamer, Y., Devadason, D., Ravenscroft, J., Suri, M. and Alkuraya, F. S.** (2019). Homozygous Loss-of-Function Mutations in AP1B1, Encoding Beta-1 Subunit of Adaptor-Related Protein Complex 1, Cause MEDNIK-like Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* **105**, 1016–1022.
- Anastasiadis, P. Z. and Reynolds, A. B.** (2000). The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci* **113 (Pt 8)**, 1319–1334.
- Ang, A. L., Taguchi, T., Francis, S., Fölsch, H., Murrells, L. J., Pypaert, M., Warren, G. and Mellman, I.** (2004). Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *Journal of Cell Biology* **167**, 531–543.
- Aoki, R., Shoshkes-Carmel, M., Gao, N., Shin, S., May, C. L., Golson, M. L., Zahm, A. M., Ray, M., Wisner, C. L., Wright, C. V. E., et al.** (2015). Foxl1-Expressing Mesenchymal Cells Constitute the Intestinal Stem Cell Niche. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **2**, 175–188.
- Arcangelis, A. D., Hamade, H., Alpy, F., Normand, S., Bruyère, E., Lefebvre, O., Méchine-Neuville, A., Siebert, S., Pfister, V., Lepage, P., et al.** (2017). Hemidesmosome integrity protects the colon against colitis and colorectal cancer. *Gut* **66**, 1748–1760.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J.** (1999). Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* **284**, 770–776.
- Assémat, E., Bazellières, E., Palesi-Pocachard, E., Le Bivic, A. and Massey-Harroche, D.** (2008). Polarity complex proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778**, 614–630.
- Au, J. S.-Y., Puri, C., Ihrke, G., Kendrick-Jones, J. and Buss, F.** (2007). Myosin VI is required for sorting of AP-1B–dependent cargo to the basolateral domain in polarized MDCK cells. *Journal of Cell Biology* **177**, 103–114.

- Azzarelli, R., Hurley, C., Sznurkowska, M. K., Rulands, S., Hardwick, L., Gamper, I., Ali, F., McCracken, L., Hindley, C., McDuff, F., et al.** (2017). Multi-site Neurogenin3 Phosphorylation Controls Pancreatic Endocrine Differentiation. *Developmental Cell* **41**, 274-286.e5.
- Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., et al.** (2014). YAP/TAZ Incorporation in the β -Catenin Destruction Complex Orchestrates the Wnt Response. *Cell* **158**, 157–170.
- Baribault, H., Penner, J., Iozzo, R. V. and Wilson-Heiner, M.** (1994). Colorectal hyperplasia and inflammation in keratin 8-deficient FVB/N mice. *Genes Dev* **8**, 2964–2973.
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., et al.** (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003–1007.
- Barry, E. R., Morikawa, T., Butler, B. L., Shrestha, K., de la Rosa, R., Yan, K. S., Fuchs, C. S., Magness, S. T., Smits, R., Ogino, S., et al.** (2013). Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. *Nature* **493**, 106–110.
- Bartles, J. R., Feracci, H. M., Stieger, B. and Hubbard, A. L.** (1987). Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane in vivo: comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation. *Journal of Cell Biology* **105**, 1241–1251.
- Basak, O., van de Born, M., Korving, J., Beumer, J., van der Elst, S., van Es, J. H. and Clevers, H.** (2014). Mapping early fate determination in Lgr5+ crypt stem cells using a novel Ki67-RFP allele. *The EMBO Journal* **33**, 2057–2068.
- Basak, O., Beumer, J., Wiebrands, K., Seno, H., van Oudenaarden, A. and Clevers, H.** (2017). Induced Quiescence of Lgr5+ Stem Cells in Intestinal Organoids Enables Differentiation of Hormone-Producing Enteroendocrine Cells. *Cell Stem Cell* **20**, 177-190.e4.
- Bastide, P., Darido, C., Pannequin, J., Kist, R., Robine, S., Marty-Double, C., Bibeau, F., Scherer, G., Joubert, D., Hollande, F., et al.** (2007). Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *Journal of Cell Biology* **178**, 635–648.
- Battle, E., Henderson, J. T., Beghtel, H., Born, M. M. W. van den, Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., Wetering, M. van de, Pawson, T., et al.** (2002). β -Catenin and TCF Mediate Cell Positioning in the Intestinal Epithelium by Controlling the Expression of EphB/EphrinB. *Cell* **111**, 251–263.
- Bellaïche, Y. and Schweisguth, F.** (2001). Lineage diversity in the Drosophila nervous system. *Current Opinion in Genetics & Development* **11**, 418–423.
- Bellec, K., Pinot, M., Gicquel, I. and Le Borgne, R.** (2021). The Clathrin adaptor AP-1 and Stratum act in parallel pathways to control Notch activation in Drosophila sensory organ precursors cells. *Development* **148**, dev191437.
- Benhra, N., Lallet, S., Cotton, M., Le Bras, S., Dussert, A. and Le Borgne, R.** (2011). AP-1 Controls the Trafficking of Notch and Sanpodo toward E-Cadherin Junctions in Sensory Organ Precursors. *Current Biology* **21**, 87–95.
- Benton, R. and Johnston, D. S.** (2003). Drosophila PAR-1 and 14-3-3 Inhibit Bazooka/PAR-3 to Establish Complementary Cortical Domains in Polarized Cells. *Cell* **115**, 691–704.

- Betschinger, J., Mechtler, K. and Knoblich, J. A.** (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* **422**, 326–330.
- Beumer, J. and Clevers, H.** (2021). Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**, 39–53.
- Beumer, J., Puschhof, J., Yengej, F. Y., Zhao, L., Martinez-Silgado, A., Blotenburg, M., Begthel, H., Boot, C., van Oudenaarden, A., Chen, Y.-G., et al.** (2022). BMP gradient along the intestinal villus axis controls zoned enterocyte and goblet cell states. *Cell Reports* **38**, 110438.
- Bevins, C. L. and Salzman, N. H.** (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* **9**, 356–368.
- Bidaud-Meynard, A., Nicolle, O., Heck, M., Le Cunff, Y. and Michaux, G.** (2019). A V0-ATPase-dependent apical trafficking pathway maintains the polarity of the intestinal absorptive membrane. *Development* dev.174508.
- Bidaud-Meynard, A., Nicolle, O., Bourdais, A., Duclos, M., Saleh, J., Ruemmele, F., Farin, H. F., Delacour, D., Moshous, D. and Michaux, G.** (2022). V0-ATPase downregulation induces MVID-like brush border defects independently of apical trafficking in the mammalian intestine. 2022.11.04.515188.
- Bjerknes, M. and Cheng, H.** (1981). The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. III. Evidence from columnar, enteroendocrine, and mucous cells in the adult mouse. *Am J Anat* **160**, 77–91.
- Bjerknes, M. and Cheng, H.** (1999). Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* **116**, 7–14.
- Bjerknes, M. and Cheng, H.** (2010). Cell Lineage metastability in Gfi1-deficient mouse intestinal epithelium. *Developmental Biology* **345**, 49–63.
- Böhm, H., Brinkmann, V., Drab, M., Henske, A. and Kurzchalia, T. V.** (1997). Mammalian homologues of *C. elegans* PAR-1 are asymmetrically localized in epithelial cells and may influence their polarity. *Current Biology* **7**, 603–606.
- Boisset, J.-C., Vivié, J., Grün, D., Muraro, M. J., Lyubimova, A. and van Oudenaarden, A.** (2018). Mapping the physical network of cellular interactions. *Nat Methods* **15**, 547–553.
- Bomsel, M., Prydz, K., Parton, R. G., Gruenberg, J. and Simons, K.** (1989). Endocytosis in filter-grown Madin-Darby canine kidney cells. *Journal of Cell Biology* **109**, 3243–3258.
- Bonazzi, M., Spanò, S., Turacchio, G., Cericola, C., Valente, C., Colanzi, A., Kweon, H. S., Hsu, V. W., Polishchuck, E. V., Polishchuck, R. S., et al.** (2005). CtBP3/BARS drives membrane fission in dynamin-independent transport pathways. *Nat Cell Biol* **7**, 570–580.
- Bonifacino, J. S.** (2014). Adaptor proteins involved in polarized sorting. *Journal of Cell Biology* **204**, 7–17.
- Bonifacino, J. S. and Dell’Angelica, E. C.** (1999). Molecular Bases for the Recognition of Tyrosine-based Sorting Signals. *Journal of Cell Biology* **145**, 923–926.

- Bonifacino, J. S. and Traub, L. M.** (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**, 395–447.
- Boyden, L. M., Atzmony, L., Hamilton, C., Zhou, J., Lim, Y. H., Hu, R., Pappas, J., Rabin, R., Ekstien, J., Hirsch, Y., et al.** (2019). Recessive Mutations in AP1B1 Cause Ichthyosis, Deafness, and Photophobia. *The American Journal of Human Genetics* **105**, 1023–1029.
- Bray, S. J.** (2016). Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 722–735.
- Brischetto, C., Krieger, K., Klotz, C., Krahn, I., Kunz, S., Kolesnichenko, M., Mucka, P., Heuberger, J., Scheidereit, C. and Schmidt-Ullrich, R.** (2021). NF- κ B determines Paneth versus goblet cell fate decision in the small intestine. *Development* **148**, dev199683.
- Brugman, S.** (2016). The zebrafish as a model to study intestinal inflammation. *Dev Comp Immunol* **64**, 82–92.
- Bruurs, L. J. M., Zwakenberg, S., van der Net, M. C., Zwartkruis, F. J. and Bos, J. L.** (2017). A Two-Tiered Mechanism Enables Localized Cdc42 Signaling during Enterocyte Polarization. *Molecular and Cellular Biology* **37**, e00547-16.
- Bryant, D. M., Datta, A., Rodríguez-Fraticelli, A. E., Peränen, J., Martín-Belmonte, F. and Mostov, K. E.** (2010). A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen. *Nat Cell Biol* **12**, 1035–1045.
- Bucci, C., Wandinger-Ness, A., Lütcke, A., Chiariello, M., Bruni, C. B. and Zerial, M.** (1994). Rab5a is a common component of the apical and basolateral endocytic machinery in polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5061–5065.
- Buchon, N. and Osman, D.** (2015). All for one and one for all: Regionalization of the Drosophila intestine. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **67**, 2–8.
- Buckley, C. E. and St Johnston, D.** (2022). Apical–basal polarity and the control of epithelial form and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 559–577.
- Buckley, C. D., Tan, J., Anderson, K. L., Hanein, D., Volkmann, N., Weis, W. I., Nelson, W. J. and Dunn, A. R.** (2014). Cell adhesion. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science* **346**, 1254211.
- Buczacki, S. J. A., Zecchini, H. I., Nicholson, A. M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R. and Winton, D. J.** (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature* **495**, 65–69.
- Caceres, P. S., Gravotta, D., Zager, P. J., Dephoure, N. and Rodriguez-Boulan, E.** (2019). Quantitative proteomics of MDCK cells identify unrecognized roles of clathrin adaptor AP-1 in polarized distribution of surface proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 11796–11805.
- Cancino, J., Torrealba, C., Soza, A., Yuseff, M. I., Gravotta, D., Henklein, P., Rodriguez-Boulan, E. and González, A.** (2007). Antibody to AP1B Adaptor Blocks Biosynthetic and Recycling Routes of Basolateral Proteins at Recycling Endosomes. *MBoC* **18**, 4872–4884.

- Cartón-García, F., Overeem, A. W., Nieto, R., Bazzocco, S., Dopeso, H., Macaya, I., Bilic, J., Landolfi, S., Hernandez-Losa, J., Schwartz, S., et al.** (2015). Myo5b knockout mice as a model of microvillus inclusion disease. *Sci Rep* **5**, 12312.
- Carvajal-Gonzalez, J. M., Gravotta, D., Mattera, R., Diaz, F., Perez Bay, A., Roman, A. C., Schreiner, R. P., Thuenauer, R., Bonifacino, J. S. and Rodriguez-Boulan, E.** (2012). Basolateral sorting of the coxsackie and adenovirus receptor through interaction of a canonical YXXΦ motif with the clathrin adaptors AP-1A and AP-1B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 3820–3825.
- Casanova, J. E., Wang, X., Kumar, R., Bhartur, S. G., Navarre, J., Woodrum, J. E., Altschuler, Y., Ray, G. S. and Goldenring, J. R.** (1999). Association of Rab25 and Rab11a with the Apical Recycling System of Polarized Madin–Darby Canine Kidney Cells. *MBoC* **10**, 47–61.
- Castillo-Azofeifa, D., Wald, T., Reyes, E. A., Gallagher, A., Schanin, J., Vlachos, S., Lamarche-Vane, N., Bomidi, C., Blutt, S., Estes, M. K., et al.** (2023). A DLG1-ARHGAP31-CDC42 axis is essential for the intestinal stem cell response to fluctuating niche Wnt signaling. *Cell Stem Cell* **30**, 188-206.e6.
- Castillon, G. A., Burriat-Couleru, P., Abegg, D., Criado Santos, N. and Watanabe, R.** (2018). Clathrin and AP1 are required for apical sorting of glycosyl phosphatidyl inositol-anchored proteins in biosynthetic and recycling routes in Madin-Darby canine kidney cells. *Traffic* **19**, 215–228.
- Cayouette, M. and Raff, M.** (2002). Asymmetric segregation of Numb: a mechanism for neural specification from *Drosophila* to mammals. *Nat Neurosci* **5**, 1265–1269.
- Chen, X. and Macara, I. G.** (2005). Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nat Cell Biol* **7**, 262–269.
- Chen, C. C.-H., Schweinsberg, P. J., Vashist, S., Mareiniss, D. P., Lambie, E. J. and Grant, B. D.** (2006). RAB-10 Is Required for Endocytic Recycling in the *Caenorhabditis elegans* Intestine. *Mol Biol Cell* **17**, 1286–1297.
- Chen, Y., Lin, Y., Davis, K. M., Wang, Q., Rnjak-Kovacina, J., Li, C., Isberg, R. R., Kumamoto, C. A., Meccas, J. and Kaplan, D. L.** (2015). Robust bioengineered 3D functional human intestinal epithelium. *Sci Rep* **5**, 13708.
- Chen, L., Toke, N. H., Luo, S., Vasoya, R. P., Fullem, R. L., Parthasarathy, A., Perekatt, A. O. and Verzi, M. P.** (2019). A reinforcing HNF4–SMAD4 feed-forward module stabilizes enterocyte identity. *Nat Genet* **51**, 777–785.
- Cheng, H. and Leblond, C. P.** (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. *American Journal of Anatomy* **141**, 537–561.
- Cheong, K. H., Zacchetti, D., Schneeberger, E. E. and Simons, K.** (1999). VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 6241–6248.
- Chi, S., Cao, H., Wang, Y. and McNiven, M. A.** (2011). Recycling of the Epidermal Growth Factor Receptor Is Mediated by a Novel Form of the Clathrin Adaptor Protein Eps15. *J Biol Chem* **286**, 35196–35208.

- Chin, K. L., Aerbajinai, W., Zhu, J., Drew, L., Chen, L., Liu, W. and Rodgers, G. P.** (2008). The regulation of OLFM4 expression in myeloid precursor cells relies on NF- κ B transcription factor. *British Journal of Haematology* **143**, 421–432.
- Choi, J., Troyanovsky, R. B., Indra, I., Mitchell, B. J. and Troyanovsky, S. M.** (2019). Scribble, Erbin, and Lano redundantly regulate epithelial polarity and apical adhesion complex. *Journal of Cell Biology* **218**, 2277–2293.
- Clevers, H.** (2006). Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* **127**, 469–480.
- Coch, R. A. and Leube, R. E.** (2016). Intermediate Filaments and Polarization in the Intestinal Epithelium. *Cells* **5**, 32.
- Colombié, N., Choemmel-Cadamuro, V., Series, J., Emery, G., Wang, X. and Ramel, D.** (2017). Non-autonomous role of Cdc42 in cell-cell communication during collective migration. *Developmental Biology* **423**, 12–18.
- Cotton, C. U., Hobert, M. E., Ryan, S. and Carlin, C. R.** (2013a). Basolateral EGF Receptor Sorting Regulated by Functionally Distinct Mechanisms in Renal Epithelial Cells. *Traffic* **14**, 337–354.
- Cotton, M., Benhra, N. and Le Borgne, R.** (2013b). Numb Inhibits the Recycling of Sanpodo in Drosophila Sensory Organ Precursor. *Current Biology* **23**, 581–587.
- Cramm-Behrens, C. I., Dienst, M. and Jacob, R.** (2008). Apical Cargo Traverses Endosomal Compartments on the Passage to the Cell Surface. *Traffic* **9**, 2206–2220.
- Crawley, S. W., Shifrin, D. A., Grega-Larson, N. E., McConnell, R. E., Benesh, A. E., Mao, S., Zheng, Y., Zheng, Q. Y., Nam, K. T., Millis, B. A., et al.** (2014a). Intestinal Brush Border Assembly Driven by Protocadherin-Based Intermicrovillar Adhesion. *Cell* **157**, 433–446.
- Crawley, S. W., Mooseker, M. S. and Tyska, M. J.** (2014b). Shaping the intestinal brush border. *Journal of Cell Biology* **207**, 441–451.
- Curto, M., Cole, B. K., Lallemand, D., Liu, C.-H. and McClatchey, A. I.** (2007). Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *Journal of Cell Biology* **177**, 893–903.
- Danielsen, E. M. and Hansen, G. H.** (2008). Lipid raft organization and function in the small intestinal brush border. *J Physiol Biochem* **64**, 377–382.
- Davis, M. A., Ireton, R. C. and Reynolds, A. B.** (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *Journal of Cell Biology* **163**, 525–534.
- de Lau, W., Kujala, P., Schneeberger, K., Middendorp, S., Li, V. S. W., Barker, N., Martens, A., Hofhuis, F., DeKoter, R. P., Peters, P. J., et al.** (2012). Peyer's Patch M Cells Derived from Lgr5+ Stem Cells Require SpiB and Are Induced by RankL in Cultured "Miniguts." *Mol Cell Biol* **32**, 3639–3647.
- Deborde, S., Perret, E., Gravotta, D., Deora, A., Salvatorezza, S., Schreiner, R. and Rodriguez-Boulan, E.** (2008). Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature* **452**, 719–723.
- Degirmenci, B., Valenta, T., Dimitrieva, S., Hausmann, G. and Basler, K.** (2018). GLI1-expressing mesenchymal cells form the essential Wnt-secreting niche for colon stem cells. *Nature* **558**, 449–453.

- Dehapiot, B., Carrière, V., Carroll, J. and Halet, G.** (2013). Polarized Cdc42 activation promotes polar body protrusion and asymmetric division in mouse oocytes. *Developmental Biology* **377**, 202–212.
- Dekkers, J. F., Wiegerinck, C. L., de Jonge, H. R., Bronsveld, I., Janssens, H. M., de Winter-de Groot, K. M., Brandsma, A. M., de Jong, N. W. M., Bijvelds, M. J. C., Scholte, B. J., et al.** (2013). A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med* **19**, 939–945.
- Dempsey, P. J., Meise, K. S., Yoshitake, Y., Nishikawa, K. and Coffey, R. J.** (1997). Apical Enrichment of Human EGF Precursor in Madin-Darby Canine Kidney Cells Involves Preferential Basolateral Ectodomain Cleavage Sensitive to a Metalloprotease Inhibitor. *Journal of Cell Biology* **138**, 747–758.
- Deora, A. A., Gravotta, D., Kreitzer, G., Hu, J., Bok, D. and Rodriguez-Boulan, E.** (2004). The Basolateral Targeting Signal of CD147 (EMMPRIN) Consists of a Single Leucine and Is Not Recognized by Retinal Pigment Epithelium. *MBoC* **15**, 4148–4165.
- Diaz, F., Gravotta, D., Deora, A., Schreiner, R., Schoggins, J., Falck-Pedersen, E. and Rodriguez-Boulan, E.** (2009). Clathrin adaptor AP1B controls adenovirus infectivity of epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 11143–11148.
- Diekmann, D., Brill, S., Garrett, M. D., Totty, N., Hsuan, J., Monfries, C., Hall, C., Lim, L. and Hall, A.** (1991). Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature* **351**, 400–402.
- Dignass, A. U., Baumgart, D. C. and Sturm, A.** (2004). The aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease — immunology and repair mechanisms. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **20**, 9–17.
- Dillon, A. and Lo, D. D.** (2019). M Cells: Intelligent Engineering of Mucosal Immune Surveillance. *Frontiers in Immunology* **10**,.
- Dillon, C., Creer, A., Kerr, K., Kümin, A. and Dickson, C.** (2002). Basolateral Targeting of ERBB2 Is Dependent on a Novel Bipartite Juxtamembrane Sorting Signal but Independent of the C-Terminal ERBIN-Binding Domain. *Mol Cell Biol* **22**, 6553–6563.
- Dobashi, Y., Suzuki, S., Sato, E., Hamada, Y., Yanagawa, T. and Ooi, A.** (2009). EGFR-dependent and independent activation of Akt/mTOR cascade in bone and soft tissue tumors. *Mod Pathol* **22**, 1328–1340.
- Doerflinger, H., Benton, R., Shulman, J. M. and Johnston, D. S.** (2003). The role of PAR-1 in regulating the polarised microtubule cytoskeleton in the *Drosophila* follicular epithelium. *Development* **130**, 3965–3975.
- Dong, W., Lu, J., Zhang, X., Wu, Y., Lettieri, K., Hammond, G. R. and Hong, Y.** (2020). A polybasic domain in aPKC mediates Par6-dependent control of membrane targeting and kinase activity. *J Cell Biol* **219**, e201903031.
- Dotti, I., Mora-Buch, R., Ferrer-Picón, E., Planell, N., Jung, P., Masamunt, M. C., Leal, R. F., Carpi, J. M. de, Llach, J., Ordás, I., et al.** (2017). Alterations in the epithelial stem cell compartment could contribute to permanent changes in the mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* **66**, 2069–2079.

- Duclos, M., Prigent, C., Le Borgne, R. and Guen, V. J.** (2021). Three-Dimensional Imaging of Organoids to Study Primary Ciliogenesis During ex vivo Organogenesis. *J Vis Exp*.
- Duclos, M., Bourdais, A., Nicolle, O., Michaux, G. and Bidaud-Meynard, A.** (2023). The clathrin adaptor AP-1B independently controls proliferation and differentiation in the mammalian intestine. 2023.05.12.540539.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Horikoshi, Y., Hirose, T., Meyer zu Brickwedde, M.-K., Ohno, S. and Vestweber, D.** (2001). The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *EMBO J* **20**, 3738–3748.
- Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Kuhn, A., Kiefer, F., Butz, S., Zander, K., Brickwedde, M.-K. M. zu, Suzuki, A., Imhof, B. A. and Vestweber, D.** (2003). The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *Journal of Cell Science* **116**, 3879–3891.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S. and Vestweber, D.** (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* **117**, 19–29.
- Elbediwy, A., Zihni, C., Terry, S. J., Clark, P., Matter, K. and Balda, M. S.** (2012). Epithelial junction formation requires confinement of Cdc42 activity by a novel SH3BP1 complex. *Journal of Cell Biology* **198**, 677–693.
- Fanning, A. S., Van Itallie, C. M. and Anderson, J. M.** (2012). Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia. *Mol Biol Cell* **23**, 577–590.
- Farin, H. F., Van Es, J. H. and Clevers, H.** (2012). Redundant Sources of Wnt Regulate Intestinal Stem Cells and Promote Formation of Paneth Cells. *Gastroenterology* **143**, 1518-1529.e7.
- Fath, K. R., Mamajiwalla, S. N. and Burgess, D. R.** (1993). The cytoskeleton in development of epithelial cell polarity. *J Cell Sci Suppl* **17**, 65–73.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D. and Huelsken, J.** (2007). Wnt/ β -Catenin Is Essential for Intestinal Homeostasis and Maintenance of Intestinal Stem Cells. *Mol Cell Biol* **27**, 7551–7559.
- Fialka, I., Steinlein, P., Ahorn, H., Böck, G., Burbelo, P. D., Haberfellner, M., Lottspeich, F., Paiha, K., Pasquali, C. and Huber, L. A.** (1999). Identification of Syntenin as a Protein of the Apical Early Endocytic Compartment in Madin-Darby Canine Kidney Cells *. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 26233–26239.
- Fic, W., Bastock, R., Raimondi, F., Los, E., Inoue, Y., Gallop, J. L., Russell, R. B. and St Johnston, D.** (2021). RhoGAP19D inhibits Cdc42 laterally to control epithelial cell shape and prevent invasion. *J Cell Biol* **220**, e202009116.
- Fields, I. C., Shteyn, E., Pypaert, M., Proux-Gillardeaux, V., Kang, R. S., Galli, T. and Fölsch, H.** (2007). v-SNARE cellubrevin is required for basolateral sorting of AP-1B-dependent cargo in polarized epithelial cells. *Journal of Cell Biology* **177**, 477–488.
- Finkbeiner, S. R., Hill, D. R., Altheim, C. H., Dedhia, P. H., Taylor, M. J., Tsai, Y.-H., Chin, A. M., Mahe, M. M., Watson, C. L., Freeman, J. J., et al.** (2015). Transcriptome-wide Analysis Reveals Hallmarks of Human Intestine Development and Maturation In Vitro and In Vivo. *Stem Cell Reports* **4**, 1140–1155.

- Flores, E. M., Nguyen, A. T., Odem, M. A., Eisenhoffer, G. T. and Krachler, A. M.** (2020). The Zebrafish as a Model for Gastrointestinal Tract - Microbe Interactions. *Cell Microbiol* **22**, e13152.
- Fölsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J. S. and Mellman, I.** (1999). A Novel Clathrin Adaptor Complex Mediates Basolateral Targeting in Polarized Epithelial Cells. *Cell* **99**, 189–198.
- Fölsch, H., Pypaert, M., Schu, P. and Mellman, I.** (2001). Distribution and Function of Ap-1 Clathrin Adaptor Complexes in Polarized Epithelial Cells. *J Cell Biol* **152**, 595–606.
- Fölsch, H., Pypaert, M., Maday, S., Pelletier, L. and Mellman, I.** (2003). The AP-1A and AP-1B clathrin adaptor complexes define biochemically and functionally distinct membrane domains. *Journal of Cell Biology* **163**, 351–362.
- Fölsch, H., Mattila, P. E. and Weisz, O. A.** (2009). Taking the Scenic Route: Biosynthetic Traffic to the Plasma Membrane in Polarized Epithelial Cells. *Traffic* **10**, 972–981.
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D. and Artavanis-Tsakonas, S.** (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* **435**, 964–968.
- Freudlsperger, C., Burnett, J. R., Friedman, J. A., Kannabiran, V. R., Chen, Z. and Van Waes, C.** (2011). EGFR-PI3K-AKT-mTOR Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas - Attractive Targets for Molecular-Oriented Therapy. *Expert Opin Ther Targets* **15**, 63–74.
- Fujii, M., Matano, M., Toshimitsu, K., Takano, A., Mikami, Y., Nishikori, S., Sugimoto, S. and Sato, T.** (2018). Human Intestinal Organoids Maintain Self-Renewal Capacity and Cellular Diversity in Niche-Inspired Culture Condition. *Cell Stem Cell* **23**, 787-793.e6.
- Furuse, M.** (2010). Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a002907.
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K. and Tsukita, S.** (1998). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* **143**, 391–401.
- Gálvez-Santisteban, M., Rodríguez-Fraticelli, A. E., Bryant, D. M., Vergarajauregui, S., Yasuda, T., Bañón-Rodríguez, I., Bernascone, I., Datta, A., Spivak, N., Young, K., et al.** (2012). Synaptotagmin-like proteins control the formation of a single apical membrane domain in epithelial cells. *Nat Cell Biol* **14**, 838–849.
- Gan, Y., McGraw, T. E. and Rodriguez-Boulon, E.** (2002). The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane. *Nat Cell Biol* **4**, 605–609.
- Gariano, G., Guarienti, M., Bresciani, R., Borsani, G., Carola, G., Monti, E., Giuliani, R., Rezzani, R., Bonomini, F., Preti, A., et al.** (2014). Analysis of three μ 1-AP1 subunits during zebrafish development. *Developmental Dynamics* **243**, 299–314.
- Gauthier, N. C., Monzo, P., Gonzalez, T., Doye, A., Oldani, A., Gounon, P., Ricci, V., Cormont, M. and Boquet, P.** (2007). Early endosomes associated with dynamic F-actin structures are required for late trafficking of *H. pylori* VacA toxin. *Journal of Cell Biology* **177**, 343–354.

- Gehart, H., van Es, J. H., Hamer, K., Beumer, J., Kretzschmar, K., Dekkers, J. F., Rios, A. and Clevers, H.** (2019). Identification of Enteroendocrine Regulators by Real-Time Single-Cell Differentiation Mapping. *Cell* **176**, 1158–1173.e16.
- Gephart, J. D., Singh, B., Higginbotham, J. N., Franklin, J. L., Gonzalez, A., Fölsch, H. and Coffey, R. J.** (2011). Identification of a Novel Mono-Leucine Basolateral Sorting Motif Within the Cytoplasmic Domain of Amphiregulin. *Traffic* **12**, 1793–1804.
- Gerbe, F., van Es, J. H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N. F., Bourgaux, J.-F., Pignodel, C., et al.** (2011). Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *Journal of Cell Biology* **192**, 767–780.
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D. J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., et al.** (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* **529**, 226–230.
- Ghaleb, A. M., Aggarwal, G., Bialkowska, A. B., Nandan, M. O. and Yang, V. W.** (2008). Notch Inhibits Expression of the Krüppel-Like Factor 4 Tumor Suppressor in the Intestinal Epithelium. *Mol Cancer Res* **6**, 1920–1927.
- Gillard, G., Shafaq-Zadah, M., Nicolle, O., Damaj, R., Pécréaux, J. and Michaux, G.** (2015). Control of E-cadherin apical localisation and morphogenesis by a SOAP-1/AP-1/clathrin pathway in *C. elegans* epidermal cells. *Development* **142**, 1684–1694.
- Gissen, P. and Arias, I. M.** (2015). Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *J Hepatol* **63**, 1023–1037.
- Godde, N. J., Sheridan, J. M., Smith, L. K., Pearson, H. B., Britt, K. L., Galea, R. C., Yates, L. L., Visvader, J. E. and Humbert, P. O.** (2014). Scribble Modulates the MAPK/Fra1 Pathway to Disrupt Luminal and Ductal Integrity and Suppress Tumour Formation in the Mammary Gland. *PLOS Genetics* **10**, e1004323.
- Gönczy, P.** (2008). Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 355–366.
- Gonneaud, A., Turgeon, N., Jones, C., Couture, C., Lévesque, D., Boisvert, F.-M., Boudreau, F. and Asselin, C.** (2019). HDAC1 and HDAC2 independently regulate common and specific intrinsic responses in murine enteroids. *Sci Rep* **9**, 5363.
- Gonzalez, A. and Rodriguez-Boulan, E.** (2009). Clathrin and AP1B: Key roles in basolateral trafficking through trans-endosomal routes. *FEBS Letters* **583**, 3784–3795.
- Goswami, S., Balasubramanian, I., D’Agostino, L., Bandyopadhyay, S., Patel, R., Avasthi, S., Yu, S., Goldenring, J. R., Bonder, E. M. and Gao, N.** (2021). RAB11A-mediated YAP localization to adherens and tight junctions is essential for colonic epithelial integrity. *Journal of Biological Chemistry* **297**, 100848.
- Goto, N., Fukuda, A., Yamaga, Y., Yoshikawa, T., Maruno, T., Maekawa, H., Inamoto, S., Kawada, K., Sakai, Y., Miyoshi, H., et al.** (2019). Lineage tracing and targeting of IL17RB⁺ tuft cell-like human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 12996–13005.

- Gracz, A. D., Samsa, L. A., Fordham, M. J., Trotier, D. C., Zwarycz, B., Lo, Y.-H., Bao, K., Starmer, J., Raab, J. R., Shroyer, N. F., et al.** (2018). Sox4 Promotes Atoh1-Independent Intestinal Secretory Differentiation Toward Tuft and Enteroendocrine Fates. *Gastroenterology* **155**, 1508-1523.e10.
- Graves, C. L., Harden, S. W., LaPato, M., Nelson, M., Amador, B., Sorenson, H., Frazier, C. J. and Wallet, S. M.** (2014). A method for high purity intestinal epithelial cell culture from adult human and murine tissues for the investigation of innate immune function. *Journal of Immunological Methods* **414**, 20–31.
- Gravotta, D., Deora, A., Perret, E., Oyanadel, C., Soza, A., Schreiner, R., Gonzalez, A. and Rodriguez-Boulan, E.** (2007). AP1B sorts basolateral proteins in recycling and biosynthetic routes of MDCK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 1564–1569.
- Gravotta, D., Carvajal-Gonzalez, J. M., Mattera, R., Deborde, S., Banfelder, J. R., Bonifacio, J. S. and Rodriguez-Boulan, E.** (2012). The Clathrin Adaptor AP-1A Mediates Basolateral Polarity. *Developmental Cell* **22**, 811–823.
- Gravotta, D., Perez Bay, A., Jonker, C. T. H., Zager, P. J., Benedicto, I., Schreiner, R., Caceres, P. S. and Rodriguez-Boulan, E.** (2019). Clathrin and clathrin adaptor AP-1 control apical trafficking of megalin in the biosynthetic and recycling routes. *MBoC* **30**, 1716–1728.
- Graybill, C., Wee, B., Atwood, S. X. and Prehoda, K. E.** (2012). Partitioning-defective Protein 6 (Par-6) Activates Atypical Protein Kinase C (aPKC) by Pseudosubstrate Displacement. *J Biol Chem* **287**, 21003–21011.
- Gregorieff, A., Stange, D. E., Kujala, P., Begthel, H., Born, M. van den, Korving, J., Peters, P. J. and Clevers, H.** (2009). The Ets-Domain Transcription Factor Spdef Promotes Maturation of Goblet and Paneth Cells in the Intestinal Epithelium. *Gastroenterology* **137**, 1333-1345.e3.
- Gregorieff, A., Liu, Y., Inanlou, M. R., Khomchuk, Y. and Wrana, J. L.** (2015). Yap-dependent reprogramming of Lgr5+ stem cells drives intestinal regeneration and cancer. *Nature* **526**, 715–718.
- Greicius, G., Kabiri, Z., Sigmundsson, K., Liang, C., Bunte, R., Singh, M. K. and Virshup, D. M.** (2018). PDGFR α + pericyptal stromal cells are the critical source of Wnts and RSPO3 for murine intestinal stem cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, E3173–E3181.
- Grencis, R. K.** (2015). Immunity to helminths: resistance, regulation, and susceptibility to gastrointestinal nematodes. *Annu Rev Immunol* **33**, 201–225.
- Grimm-Günter, E.-M. S., Revenu, C., Ramos, S., Hurbain, I., Smyth, N., Ferrary, E., Louvard, D., Robine, S. and Rivero, F.** (2009). Plastin 1 Binds to Keratin and Is Required for Terminal Web Assembly in the Intestinal Epithelium. *MBoC* **20**, 2549–2562.
- Grindstaff, K. K., Yeaman, C., Anandasabapathy, N., Hsu, S.-C., Rodriguez-Boulan, E., Scheller, R. H. and Nelson, W. J.** (1998). Sec6/8 Complex Is Recruited to Cell–Cell Contacts and Specifies Transport Vesicle Delivery to the Basal-Lateral Membrane in Epithelial Cells. *Cell* **93**, 731–740.

- Gross, A., Pack, L. A. P., Schacht, G. M., Kant, S., Ungewiss, H., Meir, M., Schlegel, N., Preisinger, C., Boor, P., Guldiken, N., et al.** (2018). Desmoglein 2, but not desmocollin 2, protects intestinal epithelia from injury. *Mucosal Immunol* **11**, 1630–1639.
- Guo, X., Mattera, R., Ren, X., Chen, Y., Retamal, C., González, A. and Bonifacino, J. S.** (2013). The Adaptor Protein-1 μ 1B Subunit Expands the Repertoire of Basolateral Sorting Signal Recognition in Epithelial Cells. *Dev Cell* **27**, 353–366.
- Gut, A., Balda, M. S. and Matter, K.** (1998). The Cytoplasmic Domains of a β 1 Integrin Mediate Polarization in Madin-Darby Canine Kidney Cells by Selective Basolateral Stabilization *. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 29381–29388.
- Hales, C. M., Vaerman, J.-P. and Goldenring, J. R.** (2002). Rab11 Family Interacting Protein 2 Associates with Myosin Vb and Regulates Plasma Membrane Recycling*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 50415–50421.
- Hall, A.** (2012). Rho family GTPases. *Biochemical Society Transactions* **40**, 1378–1382.
- Hao, H.-X., Xie, Y., Zhang, Y., Charlat, O., Oster, E., Avello, M., Lei, H., Mickanin, C., Liu, D., Ruffner, H., et al.** (2012). ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* **485**, 195–200.
- Harris, T. J. C. and Tepass, U.** (2010). Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 502–514.
- Hart, M. J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S. A. and Cerione, R. A.** (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* **354**, 311–314.
- Hase, K., Nakatsu, F., Ohmae, M., Sugihara, K., Shioda, N., Takahashi, D., Obata, Y., Furusawa, Y., Fujimura, Y., Yamashita, T., et al.** (2013). AP-1B-Mediated Protein Sorting Regulates Polarity and Proliferation of Intestinal Epithelial Cells in Mice. *Gastroenterology* **145**, 625–635.
- Hayase, J., Kamakura, S., Iwakiri, Y., Yamaguchi, Y., Izaki, T., Ito, T. and Sumimoto, H.** (2013). The WD40 protein Morg1 facilitates Par6–aPKC binding to Crb3 for apical identity in epithelial cells. *Journal of Cell Biology* **200**, 635–650.
- Heath, J. P.** (1996). Epithelial Cell Migration in the Intestine. *Cell Biology International* **20**, 139–146.
- Hegan, P. S., Giral, H., Levi, M. and Mooseker, M. S.** (2012). Myosin VI is required for maintenance of brush border structure, composition, and membrane trafficking functions in the intestinal epithelial cell. *Cytoskeleton* **69**, 235–251.
- Heintzelman, M. B. and Mooseker, M. S.** (1992). 6 Assembly of the Intestinal Brush Border Cytoskeleton. In *Current Topics in Developmental Biology* (ed. Bearer, E. L.), pp. 93–122. Academic Press.
- Hermiston, M. L. and Gordon, J. I.** (1995). In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* **129**, 489–506.
- Herring, C. A., Banerjee, A., McKinley, E. T., Simmons, A. J., Ping, J., Roland, J. T., Franklin, J. L., Liu, Q., Gerdes, M. J., Coffey, R. J., et al.** (2018). Unsupervised Trajectory Analysis of Single-Cell

- RNA-Seq and Imaging Data Reveals Alternative Tuft Cell Origins in the Gut. *Cell Systems* **6**, 37-51.e9.
- Herrmann, J. R. and Turner, J. R.** (2016). Beyond Ussing's chambers: contemporary thoughts on integration of transepithelial transport. *Am J Physiol Cell Physiol* **310**, C423-431.
- Heuberger, J., Kosel, F., Qi, J., Grossmann, K. S., Rajewsky, K. and Birchmeier, W.** (2014). Shp2/MAPK signaling controls goblet/paneth cell fate decisions in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 3472–3477.
- Hirokawa, N., Tilney, L. G., Fujiwara, K. and Heuser, J. E.** (1982). Organization of actin, myosin, and intermediate filaments in the brush border of intestinal epithelial cells. *Journal of Cell Biology* **94**, 425–443.
- Hirose, T., Karasawa, M., Sugitani, Y., Fujisawa, M., Akimoto, K., Ohno, S. and Noda, T.** (2006). PAR3 is essential for cyst-mediated epicardial development by establishing apical cortical domains. *Development* **133**, 1389–1398.
- Hirsch, D. S., Shen, Y. and Wu, W. J.** (2006). Growth and Motility Inhibition of Breast Cancer Cells by Epidermal Growth Factor Receptor Degradation Is Correlated with Inactivation of Cdc42. *Cancer Research* **66**, 3523–3530.
- Hirst, J., Irving, C. and Borner, G. H. H.** (2013). Adaptor Protein Complexes AP-4 and AP-5: New Players in Endosomal Trafficking and Progressive Spastic Paraplegia. *Traffic* **14**, 153–164.
- Hogan, C., Serpente, N., Cogram, P., Hosking, C. R., Bialucha, C. U., Feller, S. M., Braga, V. M. M., Birchmeier, W. and Fujita, Y.** (2004). Rap1 Regulates the Formation of E-Cadherin-Based Cell-Cell Contacts. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 6690–6700.
- Holloway, E. M., Czerwinski, M., Tsai, Y.-H., Wu, J. H., Wu, A., Childs, C. J., Walton, K. D., Sweet, C. W., Yu, Q., Glass, I., et al.** (2021). Mapping Development of the Human Intestinal Niche at Single-Cell Resolution. *Cell Stem Cell* **28**, 568-580.e4.
- Holthöfer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S. and Leube, R. E.** (2007). Structure and function of desmosomes. *Int Rev Cytol* **264**, 65–163.
- Horikoshi, Y., Suzuki, A., Yamanaka, T., Sasaki, K., Mizuno, K., Sawada, H., Yonemura, S. and Ohno, S.** (2009). Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells. *J Cell Sci* **122**, 1595–1606.
- Howitt, M. R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A. M., Tran, S. V., Weinstock, J. V., Gallini, C. A., Redding, K., Margolskee, R. F., Osborne, L. C., et al.** (2016). Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science* **351**, 1329–1333.
- Huber, L. A., Pimplikar, S., Parton, R. G., Virta, H., Zerial, M. and Simons, K.** (1993). Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *Journal of Cell Biology* **123**, 35–45.
- Hunziker, W. and Peters, P. J.** (1998). Rab17 Localizes to Recycling Endosomes and Regulates Receptor-mediated Transcytosis in Epithelial Cells*. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 15734–15741.

- Hutagalung, A. H. and Novick, P. J.** (2011). Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiological Reviews* **91**, 119–149.
- Hutterer, A., Betschinger, J., Petronczki, M. and Knoblich, J. A.** (2004). Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Cell* **6**, 845–854.
- Iden, S., Misselwitz, S., Peddibhotla, S. S. D., Tuncay, H., Rehder, D., Gerke, V., Robenek, H., Suzuki, A. and Ebnet, K.** (2012). aPKC phosphorylates JAM-A at Ser285 to promote cell contact maturation and tight junction formation. *Journal of Cell Biology* **196**, 623–639.
- Imajo, M., Ebisuya, M. and Nishida, E.** (2015). Dual role of YAP and TAZ in renewal of the intestinal epithelium. **17**, 23.
- Inaba, A., Arinaga, A., Tanaka, K., Endo, T., Hayatsu, N., Okazaki, Y., Yamane, T., Oishi, Y., Imai, H. and Iwatsuki, K.** (2021). Interleukin-4 Promotes Tuft Cell Differentiation and Acetylcholine Production in Intestinal Organoids of Non-Human Primate. *Int J Mol Sci* **22**, 7921.
- Inatomi, O., Andoh, A., Yagi, Y., Bamba, S., Tsujikawa, T. and Fujiyama, Y.** (2006). Regulation of amphiregulin and epiregulin expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine* **18**, 497–503.
- Indra, I., Hong, S., Troyanovsky, R., Kormos, B. and Troyanovsky, S.** (2013). The Adherens Junction: A Mosaic of Cadherin and Nectin Clusters Bundled by Actin Filaments. *J Invest Dermatol* **133**, 2546–2554.
- Ireland, H., Houghton, C., Howard, L. and Winton, D. J.** (2005). Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine Paneth cell longevity in the murine small intestine. *Dev Dyn* **233**, 1332–1336.
- Ishiuchi, T. and Takeichi, M.** (2011). Willin and Par3 cooperatively regulate epithelial apical constriction through aPKC-mediated ROCK phosphorylation. *Nat Cell Biol* **13**, 860–866.
- Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S. and Tsukita, S.** (1997). Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol* **138**, 181–192.
- Ivanov, A. I., Young, C., Beste, K. D., Capaldo, C. T., Humbert, P. O., Brennwald, P., Parkos, C. A. and Nusrat, A.** (2010). Tumor Suppressor Scribble Regulates Assembly of Tight Junctions in the Intestinal Epithelium. *The American Journal of Pathology* **176**, 134–145.
- Jacob, R., Heine, M., Alfalah, M. and Naim, H. Y.** (2003). Distinct Cytoskeletal Tracks Direct Individual Vesicle Populations to the Apical Membrane of Epithelial Cells. *Current Biology* **13**, 607–612.
- Jaffe, A. B., Kaji, N., Durgan, J. and Hall, A.** (2008). Cdc42 controls spindle orientation to position the apical surface during epithelial morphogenesis. *Journal of Cell Biology* **183**, 625–633.
- Jain, S., Suzuki, T., Seth, A., Samak, G. and Rao, R.** (2011). Protein kinase C ζ phosphorylates occludin and promotes assembly of epithelial tight junctions. *Biochem J* **437**, 289–299.
- Jardé, T., Chan, W. H., Rossello, F. J., Kaur Kahlon, T., Theocharous, M., Kurian Arackal, T., Flores, T., Giraud, M., Richards, E., Chan, E., et al.** (2020). Mesenchymal Niche-Derived Neuregulin-1

- Drives Intestinal Stem Cell Proliferation and Regeneration of Damaged Epithelium. *Cell Stem Cell* **27**, 646-662.e7.
- Jarry, A., Malard, F., Bou-Hanna, C., Meurette, G., Mohty, M., Mosnier, J.-F., Laboisse, C. L. and Bossard, C.** (2016). Interferon-Alpha Promotes Th1 Response and Epithelial Apoptosis via Inflammasome Activation in Human Intestinal Mucosa. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **3**, 72–81.
- Jaulin, F., Xue, X., Rodriguez-Boulan, E. and Kreitzer, G.** (2007). Polarization-Dependent Selective Transport to the Apical Membrane by KIF5B in MDCK Cells. *Developmental Cell* **13**, 511–522.
- Jenny, M., Uhl, C., Roche, C., Duluc, I., Guillermin, V., Guillemot, F., Jensen, J., Kedinger, M. and Gradwohl, G.** (2002). Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *The EMBO Journal* **21**, 6338–6347.
- Jensen, J., Pedersen, E. E., Galante, P., Hald, J., Heller, R. S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P. and Madsen, O. D.** (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* **24**, 36–44.
- Jiang, H. and Edgar, B. A.** (2012). Intestinal stem cell function in Drosophila and Mice. *Curr Opin Genet Dev* **22**, 354–360.
- Jimenez, J. A., Uwiera, T. C., Douglas Inglis, G. and Uwiera, R. R. E.** (2015). Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals. *Gut Pathogens* **7**, 29.
- Jin, D., Durgan, J. and Hall, A.** (2015). Functional cross-talk between Cdc42 and two downstream targets, Par6B and PAK4. *Biochemical Journal* **467**, 293–302.
- Johnson, D. I. and Pringle, J. R.** (1990). Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *Journal of Cell Biology* **111**, 143–152.
- Kamal, M., Wakelin, D., Ouellette, A. J., Smith, A., Podolsky, D. K. and Mahida, Y. R.** (2001). Mucosal T cells regulate Paneth and intermediate cell numbers in the small intestine of *T. spiralis*-infected mice. *Clinical and Experimental Immunology* **126**, 117–125.
- Kanaya, T., Hase, K., Takahashi, D., Fukuda, S., Hoshino, K., Sasaki, I., Hemmi, H., Knoop, K. A., Kumar, N., Sato, M., et al.** (2012). The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat Immunol* **13**, 729–736.
- Kang, R. S. and Fölsch, H.** (2011). ARH cooperates with AP-1B in the exocytosis of LDLR in polarized epithelial cells. *Journal of Cell Biology* **193**, 51–60.
- Kasendra, M., Tovaglieri, A., Sontheimer-Phelps, A., Jalili-Firoozinezhad, S., Bein, A., Chalkiadaki, A., Scholl, W., Zhang, C., Rickner, H., Richmond, C. A., et al.** (2018). Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids. *Sci Rep* **8**, 2871.
- Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Noda, T., et al.** (2008). Deficiency of Zonula Occludens-1 Causes Embryonic Lethal Phenotype Associated with Defected Yolk Sac Angiogenesis and Apoptosis of Embryonic Cells. *Mol Biol Cell* **19**, 2465–2475.

- Katz, J. P., Perreault, N., Goldstein, B. G., Lee, C. S., Labosky, P. A., Yang, V. W. and Kaestner, K. H.** (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* **129**, 2619–2628.
- Kazanjian, A., Noah, T., Brown, D., Burkart, J. and Shroyer, N. F.** (2010). Atonal homolog 1 is required for growth and differentiation effects of notch/gamma-secretase inhibitors on normal and cancerous intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **139**, 918–928, 928.e1–6.
- Keiser, M., Alfalah, M., Pröpsting, M. J., Castelletti, D. and Naim, H. Y.** (2006). Altered Folding, Turnover, and Polarized Sorting Act in Concert to Define a Novel Pathomechanism of Congenital Sucrase-Isomaltase Deficiency *. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 14393–14399.
- Kell, M. J., Ang, S. F., Pigati, L., Halpern, A. and Fölsch, H.** (2020). Novel function for AP-1B during cell migration. *MBoC* **31**, 2475–2493.
- Kim, T.-H. and Shivdasani, R. A.** (2011). Genetic Evidence That Intestinal Notch Functions Vary Regionally and Operate through a Common Mechanism of Math1 Repression*. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 11427–11433.
- Kim, T.-H., Li, F., Ferreiro-Neira, I., Ho, L.-L., Luyten, A., Nalapareddy, K., Long, H., Verzi, M. and Shivdasani, R. A.** (2014). Broadly permissive intestinal chromatin underlies lateral inhibition and cell plasticity. *Nature* **506**, 511–515.
- Kim, H. J., Li, H., Collins, J. J. and Ingber, D. E.** (2016a). 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* **113**, E7–E15.
- Kim, T.-H., Saadatpour, A., Guo, G., Saxena, M., Cavazza, A., Desai, N., Jadhav, U., Jiang, L., Rivera, M. N., Orkin, S. H., et al.** (2016b). Single-Cell Transcript Profiles Reveal Multilineage Priming in Early Progenitors Derived from Lgr5+ Intestinal Stem Cells. *Cell Reports* **16**, 2053–2060.
- Kim, Y., Lee, S., Kim, S., Kim, T.-Y., Lee, S.-H., Chang, J.-H. and Kweon, M.-N.** (2022). LKB1 in Intestinal Epithelial Cells Regulates Bile Acid Metabolism by Modulating FGF15/19 Production. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* **13**, 1121–1139.
- King, S. L., Mohiuddin, J. J. and Dekaney, C. M.** (2013). Paneth cells expand from newly created and preexisting cells during repair after doxorubicin-induced damage. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **305**, G151–G162.
- Klee, K. M. C., Janecke, A. R., Civan, H. A., Rosipal, Š., Heinz-Erian, P., Huber, L. A., Müller, T. and Vogel, G. F.** (2020). AP1S1 missense mutations cause a congenital enteropathy via an epithelial barrier defect. *Hum Genet* **139**, 1247–1259.
- Klein, R.** (2012). Eph/ephrin signalling during development. *Development* **139**, 4105–4109.
- Klinkert, K., Rocancourt, M., Houdusse, A. and Echard, A.** (2016). Rab35 GTPase couples cell division with initiation of epithelial apico-basal polarity and lumen opening. *Nat Commun* **7**, 11166.
- Knoop, K. A., Kumar, N., Butler, B. R., Sakthivel, S. K., Taylor, R. T., Nochi, T., Akiba, H., Yagita, H., Kiyono, H. and Williams, I. R.** (2009). RANKL Is Necessary and Sufficient to Initiate Development of Antigen-Sampling M Cells in the Intestinal Epithelium1. *The Journal of Immunology* **183**, 5738–5747.

- Kondo, A. and Kaestner, K. H.** (2019). Emerging diverse roles of telocytes. *Development* **146**, dev175018.
- Koo, B.-K., Spit, M., Jordens, I., Low, T. Y., Stange, D. E., van de Wetering, M., van Es, J. H., Mohammed, S., Heck, A. J. R., Maurice, M. M., et al.** (2012). Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* **488**, 665–669.
- Korinek, V., Barker, N., Willert, K., Molenaar, M., Roose, J., Wagenaar, G., Markman, M., Lamers, W., Destree, O. and Clevers, H.** (1998). Two Members of the Tcf Family Implicated in Wnt/ β -Catenin Signaling during Embryogenesis in the Mouse. *Mol Cell Biol* **18**, 1248–1256.
- Kosinski, C., Li, V. S. W., Chan, A. S. Y., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W. Y., Chan, T. L., Mifflin, R. C., Powell, D. W., Yuen, S. T., et al.** (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 15418–15423.
- Kowalczyk, A. P. and Green, K. J.** (2013). Structure, Function and Regulation of Desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci* **116**, 95–118.
- Kreitzer, G., Schmoranzner, J., Low, S. H., Li, X., Gan, Y., Weimbs, T., Simon, S. M. and Rodriguez-Boulan, E.** (2003). Three-dimensional analysis of post-Golgi carrier exocytosis in epithelial cells. *Nat Cell Biol* **5**, 126–136.
- Krentz, N. A. J., van Hoof, D., Li, Z., Watanabe, A., Tang, M., Nian, C., German, M. S. and Lynn, F. C.** (2017). Phosphorylation of NEUROG3 Links Endocrine Differentiation to the Cell Cycle in Pancreatic Progenitors. *Developmental Cell* **41**, 129-142.e6.
- Krndija, D., El Marjou, F., Guirao, B., Richon, S., Leroy, O., Bellaiche, Y., Hannezo, E. and Matic Vignjevic, D.** (2019). Active cell migration is critical for steady-state epithelial turnover in the gut. *Science* **365**, 705–710.
- Kuhnert, F., Davis, C. R., Wang, H.-T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R. and Kuo, C. J.** (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 266–271.
- Kuno, R., Ito, G., Kawamoto, A., Hiraguri, Y., Sugihara, H. Y., Takeoka, S., Nagata, S., Takahashi, J., Tsuchiya, M., Anzai, S., et al.** (2021). Notch and TNF- α signaling promote cytoplasmic accumulation of OLFM4 in intestinal epithelium cells and exhibit a cell protective role in the inflamed mucosa of IBD patients. *Biochemistry and Biophysics Reports* **25**, 100906.
- Lafont, F., Burkhardt, J. K. and Simons, K.** (1994). Involvement of microtubule motors in basolateral and apical transport in kidney cells. *Nature* **372**, 801–803.
- Lai, N. Y., Musser, M. A., Pinho-Ribeiro, F. A., Baral, P., Jacobson, A., Ma, P., Potts, D. E., Chen, Z., Paik, D., Soualhi, S., et al.** (2020). Gut-Innervating Nociceptor Neurons Regulate Peyer's Patch Microfold Cells and SFB Levels to Mediate Salmonella Host Defense. *Cell* **180**, 33-49.e22.
- Lakkaraju, A. and Rodriguez-Boulan, E.** (2008). Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends in Cell Biology* **18**, 199–209.

- Langlands, A. J., Almet, A. A., Appleton, P. L., Newton, I. P., Osborne, J. M. and Näthke, I. S.** (2016). Paneth Cell-Rich Regions Separated by a Cluster of Lgr5+ Cells Initiate Crypt Fission in the Intestinal Stem Cell Niche. *PLoS Biology* **14**, e1002491.
- Laprise, P., Beronja, S., Silva-Gagliardi, N. F., Pellikka, M., Jensen, A. M., McGlade, C. J. and Tepass, U.** (2006). The FERM protein Yurt is a negative regulatory component of the Crumbs complex that controls epithelial polarity and apical membrane size. *Dev Cell* **11**, 363–374.
- Laukoetter, M. G., Nava, P., Lee, W. Y., Severson, E. A., Capaldo, C. T., Babbitt, B. A., Williams, I. R., Koval, M., Peatman, E., Campbell, J. A., et al.** (2007). JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* **204**, 3067–3076.
- Lee, J. C., Smith, S. B., Watada, H., Lin, J., Scheel, D., Wang, J., Mirmira, R. G. and German, M. S.** (2001). Regulation of the Pancreatic Pro-Endocrine Gene Neurogenin3. *Diabetes* **50**, 928–936.
- Leung, S.-M., Ruiz, W. G. and Apodaca, G.** (2000). Sorting of Membrane and Fluid at the Apical Pole of Polarized Madin-Darby Canine Kidney Cells. *MBoC* **11**, 2131–2150.
- Li, C., Hao, M., Cao, Z., Ding, W., Graves-Deal, R., Hu, J., Piston, D. W. and Coffey, R. J.** (2007). Naked2 Acts as a Cargo Recognition and Targeting Protein to Ensure Proper Delivery and Fusion of TGF- α -containing Exocytic Vesicles at the Lower Lateral Membrane of Polarized MDCK Cells. *MBoC* **18**, 3081–3093.
- Li, W., Puertollano, R., Bonifacino, J. S., Overbeek, P. A. and Everett, E. T.** (2010). Disruption of the Murine Ap2 β 1 Gene Causes Nonsyndromic Cleft Palate. *The Cleft Palate Craniofacial Journal* **47**, 566–573.
- Li, D., Mangan, A., Cicchini, L., Margolis, B. and Prekeris, R.** (2014). FIP5 phosphorylation during mitosis regulates apical trafficking and lumenogenesis. *EMBO reports* **15**, 428–437.
- Li, Q., Zhou, Z., Sun, Y., Sun, C., Klappe, K. and van IJzendoorn, S. C. D.** (2022). A Functional Relationship Between UNC45A and MYO5B Connects Two Rare Diseases With Shared Enteropathy. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* **14**, 295–310.
- Liang, N., Zhang, C., Dill, P., Panasyuk, G., Pion, D., Koka, V., Gallazzini, M., Olson, E. N., Lam, H., Henske, E. P., et al.** (2014). Regulation of YAP by mTOR and autophagy reveals a therapeutic target of tuberous sclerosis complex. *J Exp Med* **211**, 2249–2263.
- Liévin-Le Moal, V. and Servin, A. L.** (2013). Pathogenesis of Human Enterovirulent Bacteria: Lessons from Cultured, Fully Differentiated Human Colon Cancer Cell Lines. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**, 380–439.
- Lindeboom, R. G., van Voorthuijsen, L., Oost, K. C., Rodríguez-Colman, M. J., Luna-Velez, M. V., Furlan, C., Baraille, F., Jansen, P. W., Ribeiro, A., Burgering, B. M., et al.** (2018). Integrative multi-omics analysis of intestinal organoid differentiation. *Molecular Systems Biology* **14**, e8227.
- Lisanti, M. P., Caras, I. W., Davitz, M. A. and Rodriguez-Boulton, E.** (1989). A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *Journal of Cell Biology* **109**, 2145–2156.

- Liu, W. and Rodgers, G. P.** (2022). Olfactomedin 4 Is Not a Precise Marker for Human Intestinal Stem Cells, But Is Involved in Intestinal Carcinogenesis. *Gastroenterology* **162**, 1001–1004.
- Lobert, V. H., Mouradov, D. and Heath, J. K.** (2016). Focusing the Spotlight on the Zebrafish Intestine to Illuminate Mechanisms of Colorectal Cancer. *Adv Exp Med Biol* **916**, 411–437.
- Lock, J. G. and Stow, J. L.** (2005). Rab11 in Recycling Endosomes Regulates the Sorting and Basolateral Transport of E-Cadherin. *MBoC* **16**, 1744–1755.
- López-Díaz, L., Jain, R. N., Keeley, T. M., VanDussen, K. L., Brunkan, C. S., Gumucio, D. L. and Samuelson, L. C.** (2007). Intestinal Neurogenin 3 directs differentiation of a bipotential secretory progenitor to endocrine cell rather than goblet cell fate. *Developmental Biology* **309**, 298–305.
- Lopez-Garcia, C., Klein, A. M., Simons, B. D. and Winton, D. J.** (2010). Intestinal Stem Cell Replacement Follows a Pattern of Neutral Drift. *Science* **330**, 822–825.
- Lozoya-Agullo, I., Araújo, F., González-Álvarez, I., Merino-Sanjuán, M., González-Álvarez, M., Bermejo, M. and Sarmiento, B.** (2017). Usefulness of Caco-2/HT29-MTX and Caco-2/HT29-MTX/Raji B Coculture Models To Predict Intestinal and Colonic Permeability Compared to Caco-2 Monoculture. *Mol Pharm* **14**, 1264–1270.
- Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R. and Mahajan, A.** (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* **6**, 666–677.
- Madison, B. B., Braunstein, K., Kuizon, E., Portman, K., Qiao, X. T. and Gumucio, D. L.** (2005). Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* **132**, 279–289.
- Maimets, M., Pedersen, M. T., Guiu, J., Dreier, J., Thodberg, M., Antoku, Y., Schweiger, P. J., Rib, L., Bressan, R. B., Miao, Y., et al.** (2022). Mesenchymal-epithelial crosstalk shapes intestinal regionalisation via Wnt and Shh signalling. *Nat Commun* **13**, 715.
- Mangan, A. J., Sietsema, D. V., Li, D., Moore, J. K., Citi, S. and Prekeris, R.** (2016). Cingulin and actin mediate midbody-dependent apical lumen formation during polarization of epithelial cells. *Nat Commun* **7**, 12426.
- Mangeol, P., Massey-Harroche, D., Richard, F., Concordet, J.-P., Lenne, P.-F. and Le Bivic, A.** (2022). Super-resolution imaging uncovers the nanoscopic segregation of polarity proteins in epithelia. *eLife* **11**, e62087.
- Maroux, S., Coudrier, E., Feracci, H., Gorvel, J.-P. and Louvard, D.** (1988). Molecular organization of the intestinal brush border. *Biochimie* **70**, 1297–1306.
- Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., Yu, W., Rescher, U., Gerke, V. and Mostov, K.** (2007). PTEN-Mediated Apical Segregation of Phosphoinositides Controls Epithelial Morphogenesis through Cdc42. *Cell* **128**, 383–397.
- Matsuzawa, K., Ohga, H., Shigetomi, K., Shiiya, T., Hirashima, M. and Ikenouchi, J.** (2021). MAGIs regulate aPKC to enable balanced distribution of intercellular tension for epithelial sheet homeostasis. *Commun Biol* **4**, 1–11.

- Mazerik, J. N. and Tyska, M. J.** (2012). Myosin-1A Targets to Microvilli Using Multiple Membrane Binding Motifs in the Tail Homology 1 (TH1) Domain *. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 13104–13115.
- Melendez, J.** (2013). Cdc42 Coordinates Proliferation, Polarity, Migration, and Differentiation of Small Intestinal Epithelial Cells in Mice. **145**, 12.
- Meng, W., Mushika, Y., Ichii, T. and Takeichi, M.** (2008). Anchorage of Microtubule Minus Ends to Adherens Junctions Regulates Epithelial Cell-Cell Contacts. *Cell* **135**, 948–959.
- Menzel, N., Melzer, J., Waschke, J., Lenz, C., Wecklein, H., Lochnit, G., Drenckhahn, D. and Raabe, T.** (2008). The Drosophila p21-activated kinase Mbt modulates DE-cadherin-mediated cell adhesion by phosphorylation of Armadillo. *Biochemical Journal* **416**, 231–241.
- Merlos-Suárez, A., Barriga, F. M., Jung, P., Iglesias, M., Céspedes, M. V., Rossell, D., Sevillano, M., Hernando-Momblona, X., da Silva-Diz, V., Muñoz, P., et al.** (2011). The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse. *Cell Stem Cell* **8**, 511–524.
- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E.-L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K. and Schu, P.** (2000). μ 1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *The EMBO Journal* **19**, 2193–2203.
- Miller, H. R. and Nawa, Y.** (1979). Immune regulation of intestinal goblet cell differentiation. Specific induction of nonspecific protection against helminths? *Nouv Rev Fr Hematol (1978)* **21**, 31–45.
- Mimura, M., Masuda, A., Nishiumi, S., Kawakami, K., Fujishima, Y., Yoshie, T., Mizuno, S., Miki, I., Ohno, H., Hase, K., et al.** (2012). AP1B plays an important role in intestinal tumorigenesis with the truncating mutation of an APC gene. *Int. J. Cancer* **130**, 1011–1020.
- Mishra, R., Grzybek, M., Niki, T., Hirashima, M. and Simons, K.** (2010). Galectin-9 trafficking regulates apical-basal polarity in Madin–Darby canine kidney epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 17633–17638.
- Mitsushima, M., Toyoshima, F. and Nishida, E.** (2009). Dual Role of Cdc42 in Spindle Orientation Control of Adherent Cells. *Molecular and Cellular Biology* **29**, 2816–2827.
- Monlauzeur, L., Breuza, L. and Le Bivic, A.** (1998). Putative O-Glycosylation Sites and a Membrane Anchor Are Necessary for Apical Delivery of the Human Neurotrophin Receptor in Caco-2 Cells*. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 30263–30270.
- Montcouquiol, M., Rachel, R. A., Lanford, P. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Kelley, M. W.** (2003). Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* **423**, 173–177.
- Monteiro, A. C., Sumagin, R., Rankin, C. R., Leoni, G., Mina, M. J., Reiter, D. M., Stehle, T., Dermody, T. S., Schaefer, S. A., Hall, R. A., et al.** (2013). JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c and regulate epithelial barrier function. *Mol Biol Cell* **24**, 2849–2860.

- Montero, C. and Erlandsen, S. L.** (1978). Immunocytochemical and histochemical studies on intestinal epithelial cells producing both lysozyme and mucosubstance. *The Anatomical Record* **190**, 127–141.
- Montpetit, A., Côté, S., Brustein, E., Drouin, C. A., Lapointe, L., Boudreau, M., Meloche, C., Drouin, R., Hudson, T. J., Drapeau, P., et al.** (2008). Disruption of AP1S1, Causing a Novel Neurocutaneous Syndrome, Perturbs Development of the Skin and Spinal Cord. *PLOS Genetics* **4**, e1000296.
- Moor, A. E., Harnik, Y., Ben-Moshe, S., Massasa, E. E., Rozenberg, M., Eilam, R., Bahar Halpern, K. and Itzkovitz, S.** (2018). Spatial Reconstruction of Single Enterocytes Uncovers Broad Zonation along the Intestinal Villus Axis. *Cell* **175**, 1156-1167.e15.
- Mooseker, M. S. and Tilney, L. G.** (1975). Organization of an actin filament-membrane complex. Filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* **67**, 725–743.
- Mora-Buch, R., Dotti, I., Planell, N., Calderón-Gómez, E., Jung, P., Masamunt, M. C., Llach, J., Ricart, E., Batlle, E., Panés, J., et al.** (2016). Epithelial IL-1R2 acts as a homeostatic regulator during remission of ulcerative colitis. *Mucosal Immunology* **9**, 950–959.
- Moreno, M. R., Boswell, K., Casbolt, H. L. and Bulgakova, N. A.** (2022). Multifaceted control of E-cadherin dynamics by Adaptor Protein Complex 1 during epithelial morphogenesis. *MBoC* **33**, ar80.
- Mori-Akiyama, Y., Born, M. van den, Es, J. H. van, Hamilton, S. R., Adams, H. P., Zhang, J., Clevers, H. and Crombrughe, B. de** (2007). SOX9 Is Required for the Differentiation of Paneth Cells in the Intestinal Epithelium. *Gastroenterology* **133**, 539–546.
- Mosa, M. H., Nicolle, O., Maschalidi, S., Sepulveda, F. E., Bidaud-Meynard, A., Menche, C., Michels, B. E., Michaux, G., de Saint Basile, G. and Farin, H. F.** (2018). Dynamic Formation of Microvillus Inclusions During Enterocyte Differentiation in Munc18-2–Deficient Intestinal Organoids. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* **6**, 477-493.e1.
- Mrozowska, P. S. and Fukuda, M.** (2016). Regulation of podocalyxin trafficking by Rab small GTPases in 2D and 3D epithelial cell cultures. *Journal of Cell Biology* **213**, 355–369.
- Mukherjee, T. and Staehelin, L.** (1971). The fine-structural organization of the brush border of intestinal epithelial cells. *Journal of cell science*.
- Müller, H. A. and Wieschaus, E.** (1996). armadillo, bazooka, and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology* **134**, 149–163.
- Müller, S. L., Portwich, M., Schmidt, A., Utepbergenov, D. I., Huber, O., Blasig, I. E. and Krause, G.** (2005). The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *J Biol Chem* **280**, 3747–3756.
- Müller, T., Hess, M. W., Schiefermeier, N., Pfaller, K., Ebner, H. L., Heinz-Erian, P., Ponstingl, H., Partsch, J., Röllinghoff, B., Köhler, H., et al.** (2008). MYO5B mutations cause microvillus inclusion disease and disrupt epithelial cell polarity. *Nat Genet* **40**, 1163–1165.

- Muñoz, J., Stange, D. E., Schepers, A. G., van de Wetering, M., Koo, B.-K., Itzkovitz, S., Volckmann, R., Kung, K. S., Koster, J., Radulescu, S., et al.** (2012). The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent '+4' cell markers. *The EMBO Journal* **31**, 3079–3091.
- Murdoch, J. N., Henderson, D. J., Doudney, K., Gaston-Massuet, C., Phillips, H. M., Paternotte, C., Arkell, R., Stanier, P. and Copp, A. J.** (2003). Disruption of scribble (Scrb1) causes severe neural tube defects in the circletail mouse. *Human Molecular Genetics* **12**, 87–98.
- Müsch, A.** (2014). The unique polarity phenotype of hepatocytes. *Experimental Cell Research* **328**, 276–283.
- Müsch, A., Cohen, D. and Rodriguez-Boulan, E.** (1997). Myosin II Is Involved in the Production of Constitutive Transport Vesicles from the TGN. *Journal of Cell Biology* **138**, 291–306.
- Nagai-Tamai, Y., Mizuno, K., Hirose, T., Suzuki, A. and Ohno, S.** (2002). Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes Cells* **7**, 1161–1171.
- Nakatsu, F. and Ohno, H.** (2003). Adaptor Protein Complexes as the Key Regulators of Protein Sorting in the Post-Golgi Network. *Cell Structure and Function* **28**, 419–429.
- Nakatsu, F., Hase, K. and Ohno, H.** (2014). The Role of the Clathrin Adaptor AP-1: Polarized Sorting and Beyond. *Membranes* **4**, 747–763.
- Nalapareddy, K., Hassan, A., Sampson, L. L., Zheng, Y. and Geiger, H.** (2021). Suppression of elevated Cdc42 activity promotes the regenerative potential of aged intestinal stem cells. *iScience* **24**, 102362.
- Nava, P., Capaldo, C. T., Koch, S., Kolegraff, K., Rankin, C. R., Farkas, A. E., Feasel, M. E., Li, L., Addis, C., Parkos, C. A., et al.** (2011). JAM-A regulates epithelial proliferation through Akt/ β -catenin signalling. *EMBO Rep* **12**, 314–320.
- Nekrasova, T. and Minden, A.** (2012). Role for p21-activated kinase PAK4 in development of the mammalian heart. *Transgenic Res* **21**, 797–811.
- Nishimura, N., Plutner, H., Hahn, K. and Balch, W. E.** (2002). The δ subunit of AP-3 is required for efficient transport of VSV-G from the trans-Golgi network to the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 6755–6760.
- Noah, T. K., Kazanjian, A., Whitsett, J. and Shroyer, N. F.** (2010). SAM pointed domain ETS factor (SPDEF) regulates terminal differentiation and maturation of intestinal goblet cells. *Experimental Cell Research* **316**, 452–465.
- Noben, M., Verstockt, B., Bruyn, M. de, Hendriks, N., Assche, G. V., Vermeire, S., Verfaillie, C. and Ferrante, M.** (2017). Epithelial organoid cultures from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease: a truly long-term model to study the molecular basis for inflammatory bowel disease? *Gut* **66**, 2193–2195.
- Nobes, C. D. and Hall, A.** (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53–62.

- Noda, Y., Okada, Y., Saito, N., Setou, M., Xu, Y., Zhang, Z. and Hirokawa, N.** (2001). KIFC3, a microtubule minus end-directed motor for the apical transport of annexin XIIIb-associated Triton-insoluble membranes. *Journal of Cell Biology* **155**, 77–88.
- Nozaki, K., Mochizuki, W., Matsumoto, Y., Matsumoto, T., Fukuda, M., Mizutani, T., Watanabe, M. and Nakamura, T.** (2016). Co-culture with intestinal epithelial organoids allows efficient expansion and motility analysis of intraepithelial lymphocytes. *J Gastroenterol* **51**, 206–213.
- Nunes de Almeida, F., Walther, R. F., Pressé, M. T., Vlassaks, E. and Pichaud, F.** (2019). Cdc42 defines apical identity and regulates epithelial morphogenesis by promoting apical recruitment of Par6-aPKC and Crumbs. *Development* **146**, dev175497.
- O'Connor-Giles, K. M. and Skeath, J. B.** (2003). Numb Inhibits Membrane Localization of Sanpodo, a Four-Pass Transmembrane Protein, to Promote Asymmetric Divisions in Drosophila. *Developmental Cell* **5**, 231–243.
- Odorizzi, G. and Trowbridge, I. S.** (1997). Structural Requirements for Basolateral Sorting of the Human Transferrin Receptor in the Biosynthetic and Endocytic Pathways of Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J Cell Biol* **137**, 1255–1264.
- Ohno, H., Tomemori, T., Nakatsu, F., Okazaki, Y., Aguilar, R. C., Foelsch, H., Mellman, I., Saito, T., Shirasawa, T. and Bonifacio, J. S.** (1999). μ 1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells 1. *FEBS Letters* **449**, 215–220.
- Ooshio, T., Fujita, N., Yamada, A., Sato, T., Kitagawa, Y., Okamoto, R., Nakata, S., Miki, A., Irie, K. and Takai, Y.** (2007). Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions. *Journal of Cell Science* **120**, 2352–2365.
- Orzech, E., Cohen, S., Weiss, A. and Aroeti, B.** (2000). Interactions between the Exocytic and Endocytic Pathways in Polarized Madin-Darby Canine Kidney Cells*. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 15207–15219.
- Otani, T., Ichii, T., Aono, S. and Takeichi, M.** (2006). Cdc42 GEF Tuba regulates the junctional configuration of simple epithelial cells. *Journal of Cell Biology* **175**, 135–146.
- Oztan, A., Silvis, M., Weisz, O. A., Bradbury, N. A., Hsu, S.-C., Goldenring, J. R., Yeaman, C. and Apodaca, G.** (2007). Exocyst Requirement for Endocytic Traffic Directed Toward the Apical and Basolateral Poles of Polarized MDCK Cells. *MBoC* **18**, 3978–3992.
- Paladino, S., Sarnataro, D., Pillich, R., Tivodar, S., Nitsch, L. and Zurzolo, C.** (2004). Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *Journal of Cell Biology* **167**, 699–709.
- Palmieri, D., Bouadis, A., Ronchetti, R., Merino, M. J. and Steeg, P. S.** (2006). Rab11a differentially modulates epidermal growth factor-induced proliferation and motility in immortal breast cells. *Breast Cancer Res Treat* **100**, 127–137.
- Park, J., Kotani, T., Konno, T., Setiawan, J., Kitamura, Y., Imada, S., Usui, Y., Hatano, N., Shinohara, M., Saito, Y., et al.** (2016). Promotion of Intestinal Epithelial Cell Turnover by Commensal Bacteria: Role of Short-Chain Fatty Acids. *PLoS One* **11**, e0156334.
- Pedersen, G., Saermark, T., Giese, B., Hansen, A., Drag, B. and Brynskov, J.** (2000). A simple method to establish short-term cultures of normal human colonic epithelial cells from endoscopic

- biopsy specimens. Comparison of isolation methods, assessment of viability and metabolic activity. *Scand J Gastroenterol* **35**, 772–780.
- Pellegrinet, L., Rodilla, V., Liu, Z., Chen, S., Koch, U., Espinosa, L., Kaestner, K. H., Kopan, R., Lewis, J. and Radtke, F.** (2011). Dll1- and Dll4-Mediated Notch Signaling Are Required for Homeostasis of Intestinal Stem Cells. *Gastroenterology* **140**, 1230-1240.e7.
- Peng, X., Cuff, L. E., Lawton, C. D. and DeMali, K. A.** (2010). Vinculin regulates cell-surface E-cadherin expression by binding to beta-catenin. *J Cell Sci* **123**, 567–577.
- Perez Bay, A. E., Schreiner, R., Mazzoni, F., Carvajal-Gonzalez, J. M., Gravotta, D., Perret, E., Lehmann Mantaras, G., Zhu, Y.-S. and Rodriguez-Boulan, E. J.** (2013). The kinesin KIF16B mediates apical transcytosis of transferrin receptor in AP-1B-deficient epithelia. *The EMBO Journal* **32**, 2125–2139.
- Perez Bay, A. E., Schreiner, R. and Rodriguez-Boulan, E.** (2015). Chapter 17 - Structural and functional analysis of endosomal compartments in epithelial cells. In *Methods in Cell Biology* (ed. Guo, W.), pp. 271–288. Academic Press.
- Perreault, N. and Beaulieu, J.-F.** (1998). Primary Cultures of Fully Differentiated and Pure Human Intestinal Epithelial Cells. *Experimental Cell Research* **245**, 34–42.
- Pfister, A. B., Wood, R. C., Salas, P. J. I., Zea, D. L. and Ramsauer, V. P.** (2010). Early Response to ErbB2 Over-Expression in Polarized Caco-2 Cells Involves Partial Segregation From ErbB3 by Relocalization to the Apical Surface and Initiation of Survival Signaling. *J Cell Biochem* **111**, 643–652.
- Pichaud, F., Walther, R. F. and Nunes de Almeida, F.** (2019). Regulation of Cdc42 and its effectors in epithelial morphogenesis. *Journal of Cell Science* **132**, jcs217869.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H. and Clevers, H.** (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* **17**, 1709–1713.
- Pirraglia, C., Walters, J. and Myat, M. M.** (2010). Pak1 control of E-cadherin endocytosis regulates salivary gland lumen size and shape. *Development* **137**, 4177–4189.
- Playford, R. J., Hanby, A. M., Gschmeissner, S., Peiffer, L. P., Wright, N. A. and McGarrity, T.** (1996). The epidermal growth factor receptor (EGF-R) is present on the basolateral, but not the apical, surface of enterocytes in the human gastrointestinal tract. *Gut* **39**, 262–266.
- Polishchuk, R., Pentima, A. D. and Lippincott-Schwartz, J.** (2004). Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway. *Nat Cell Biol* **6**, 297–307.
- Powell, S. K., Cunningham, B. A., Edelman, G. M. and Rodriguez-Boulan, E.** (1991). Targeting of transmembrane and GPI-anchored forms of N-CAM to opposite domains of a polarized epithelial cell. *Nature* **353**, 76–77.
- Puertollano, R., Martín-Belmonte, F., Millán, J., del Carmen de Marco, M., Albar, J. P., Kremer, L. and Alonso, M. A.** (1999). The MAL Proteolipid Is Necessary for Normal Apical Transport and Accurate Sorting of the Influenza Virus Hemagglutinin in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Journal of Cell Biology* **145**, 141–151.

- Qi, Z., Li, Y., Zhao, B., Xu, C., Liu, Y., Li, H., Zhang, B., Wang, X., Yang, X., Xie, W., et al.** (2017). BMP restricts stemness of intestinal Lgr5+ stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nat Commun* **8**, 13824.
- Qin, Y., Capaldo, C., Gumbiner, B. M. and Macara, I. G.** (2005). The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. *J Cell Biol* **171**, 1061–1071.
- Qin, Y., Meisen, W. H., Hao, Y. and Macara, I. G.** (2010). Tuba, a Cdc42 GEF, is required for polarized spindle orientation during epithelial cyst formation. *Journal of Cell Biology* **189**, 661–669.
- Ramsauer, V. P., Salas, P. J., Carraway, C. C. and Carraway, K. L.** (2006). ErbB2 re-localization to the apical surface of CACO-2 cells by Muc4 initiates a survival signaling pathway via MAPK p38 that is dependent on cell polarity. *Cancer Research* **66**, 543.
- Reales, E., Sharma, N., Low, S. H., Fölsch, H. and Weimbs, T.** (2011). Basolateral Sorting of Syntaxin 4 Is Dependent on Its N-terminal Domain and the AP1B Clathrin Adaptor, and Required for the Epithelial Cell Polarity. *PLOS ONE* **6**, e21181.
- Revenu, C., Ubelmann, F., Hurbain, I., El-Marjou, F., Dingli, F., Loew, D., Delacour, D., Gilet, J., Brot-Laroche, E., Rivero, F., et al.** (2012). A new role for the architecture of microvillar actin bundles in apical retention of membrane proteins. *MBoC* **23**, 324–336.
- Riccio, O., van Gijn, M. E., Bezdek, A. C., Pellegrinet, L., van Es, J. H., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L. J., Honjo, T., Clevers, H. and Radtke, F.** (2008). Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO reports* **9**, 377–383.
- Richardson, A., Schwerdtfeger, L. A., Eaton, D., Mclean, I., Henry, C. S. and Tobet, S. A.** (2020). A microfluidic organotypic device for culture of mammalian intestines ex vivo. *Anal. Methods* **12**, 297–303.
- Ridley, A. J. and Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389–399.
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401–410.
- Rindler, M. J., Ivanov, I. E., Plesken, H., Rodriguez-Boulan, E. and Sabatini, D. D.** (1984). Viral glycoproteins destined for apical or basolateral plasma membrane domains traverse the same Golgi apparatus during their intracellular transport in doubly infected Madin-Darby canine kidney cells. *Journal of Cell Biology* **98**, 1304–1319.
- Ritsma, L., Ellenbroek, S. I. J., Zomer, A., Snippert, H. J., de Sauvage, F. J., Simons, B. D., Clevers, H. and van Rheenen, J.** (2014). Intestinal crypt homeostasis revealed at single stem cell level by in vivo live-imaging. *Nature* **507**, 362–365.
- Robinson, M. S.** (1997). Coats and vesicle budding. *Trends in Cell Biology* **7**, 99–102.
- Robinson, M. S.** (2004). Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends in Cell Biology* **14**, 167–174.
- Robinson, M. S. and Bonifacino, J. S.** (2001). Adaptor-related proteins. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 444–453.

- Rodriguez-Boulan, E., Kreitzer, G. and Müsch, A.** (2005). Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 233–247.
- Rodriguez-Boulan, E., Perez-Bay, A., Schreiner, R. and Gravotta, D.** (2013). Response: The “Tail” of the Twin Adaptors. *Dev Cell* **27**, 247–248.
- Rodriguez-Fraticelli, A. E., Vargarajauregui, S., Eastburn, D. J., Datta, A., Alonso, M. A., Mostov, K. and Martín-Belmonte, F.** (2010). The Cdc42 GEF Intersectin 2 controls mitotic spindle orientation to form the lumen during epithelial morphogenesis. *Journal of Cell Biology* **189**, 725–738.
- Roland, J. T., Bryant, D. M., Datta, A., Itzen, A., Mostov, K. E. and Goldenring, J. R.** (2011). Rab GTPase–Myo5B complexes control membrane recycling and epithelial polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 2789–2794.
- Röper, K.** (2012). Anisotropy of Crumbs and aPKC Drives Myosin Cable Assembly during Tube Formation. *Developmental Cell* **23**, 939–953.
- Roth, S., Franken, P., Sacchetti, A., Kremer, A., Anderson, K., Sansom, O. and Fodde, R.** (2012). Paneth Cells in Intestinal Homeostasis and Tissue Injury. *PLOS ONE* **7**, e38965.
- Russ, A., Louderbough, J. M. V., Zarnescu, D. and Schroeder, J. A.** (2012). Hugel1 and Hugel2 in Mammary Epithelial Cells: Polarity, Proliferation, and Differentiation. *PLOS ONE* **7**, e47734.
- Ryan, S., Verghese, S., Cianciola, N. L., Cotton, C. U. and Carlin, C. R.** (2010). Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease Epithelial Cell Model Reveals Multiple Basolateral Epidermal Growth Factor Receptor Sorting Pathways. *MBoC* **21**, 2732–2745.
- Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S.** (1998). Occludin-deficient Embryonic Stem Cells Can Differentiate into Polarized Epithelial Cells Bearing Tight Junctions. *J Cell Biol* **141**, 397–408.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S.** (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* **11**, 4131–4142.
- Sakamori, R., Das, S., Yu, S., Feng, S., Stypulkowski, E., Guan, Y., Douard, V., Tang, W., Ferraris, R. P., Harada, A., et al.** (2012). Cdc42 and Rab8a are critical for intestinal stem cell division, survival, and differentiation in mice. *J Clin Invest* **122**, 1052–1065.
- Salvarezza, S. B., Deborde, S., Schreiner, R., Campagne, F., Kessels, M. M., Qualmann, B., Caceres, A., Kreitzer, G. and Rodriguez-Boulan, E.** (2009). LIM Kinase 1 and Cofilin Regulate Actin Filament Population Required for Dynamin-dependent Apical Carrier Fission from the Trans-Golgi Network. *MBoC* **20**, 438–451.
- San Roman, A. K., Jayewickreme, C. D., Murtaugh, L. C. and Shivdasani, R. A.** (2014). Wnt Secretion from Epithelial Cells and Subepithelial Myofibroblasts Is Not Required in the Mouse Intestinal Stem Cell Niche In Vivo. *Stem Cell Reports* **2**, 127–134.
- Sansom, O. J., Reed, K. R., Hayes, A. J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I. P., Batlle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I. S., et al.** (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* **18**, 1385–1390.

- Saotome, I., Curto, M. and McClatchey, A. I.** (2004). Ezrin Is Essential for Epithelial Organization and Villus Morphogenesis in the Developing Intestine. *Developmental Cell* **6**, 855–864.
- Sapone, A., Lammers, K. M., Casolaro, V., Cammarota, M., Giuliano, M. T., De Rosa, M., Stefanile, R., Mazzeo, G., Tolone, C., Russo, M. I., et al.** (2011). Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med* **9**, 23.
- Sato, T.** (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *459*, 5.
- Sato, T., Mushiake, S., Kato, Y., Sato, K., Sato, M., Takeda, N., Ozono, K., Miki, K., Kubo, Y., Tsuji, A., et al.** (2007). The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature* **448**, 366–369.
- Sato, M., Yoshimura, S., Hirai, R., Goto, A., Kunii, M., Atik, N., Sato, T., Sato, K., Harada, R., Shimada, J., et al.** (2011a). The Role of VAMP7/TI-VAMP in Cell Polarity and Lysosomal Exocytosis in vivo. *Traffic* **12**, 1383–1393.
- Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N. F., van de Wetering, M. and Clevers, H.** (2011b). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**, 415–418.
- Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G. J., van Es, J. H., van den Brink, S., van Houdt, W. J., Pronk, A., van Gorp, J., Siersema, P. D., et al.** (2011c). Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett’s Epithelium. *Gastroenterology* **141**, 1762–1772.
- Sauvanet, C., Wayt, J., Pelaseyed, T. and Bretscher, A.** (2015). Structure, regulation, and functional diversity of microvilli on the apical domain of epithelial cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **31**, 593–621.
- Sawada, M., Takahashi, K., Sawada, S. and Midorikawa, O.** (1991). Selective killing of Paneth cells by intravenous administration of dithizone in rats. *Int J Exp Pathol* **72**, 407–421.
- Sawada, M., Nishikawa, M., Adachi, T., Midorikawa, O. and Hiai, H.** (1993). A Paneth cell specific zinc-binding protein in the rat. Purification and immunohistochemical localization. *Lab Invest* **68**, 338–344.
- Scharaw, S., Sola-Carvajal, A., Belevich, I., Webb, A. T., Das, S., Andersson, S., Pentimikko, N., Villablanca, E. J., Goldenring, J. R., Jokitalo, E., et al.** (2023). Golgi organization is a determinant of stem cell function in the small intestine. 2023.03.23.533814.
- Scheiffele, P., Peränen, J. and Simons, K.** (1995). N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* **378**, 96–98.
- Scheiffele, P., Roth, M. G. and Simons, K.** (1997). Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid–cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *The EMBO Journal* **16**, 5501–5508.
- Schlüter, M. A., Pfarr, C. S., Pieczynski, J., Whiteman, E. L., Hurd, T. W., Fan, S., Liu, C.-J. and Margolis, B.** (2009). Trafficking of Crumbs3 during Cytokinesis Is Crucial for Lumen Formation. *MBoC* **20**, 4652–4663.

- Schneeberger, K., Roth, S., Nieuwenhuis, E. E. S. and Middendorp, S.** (2018). Intestinal epithelial cell polarity defects in disease: lessons from microvillus inclusion disease. *Disease Models & Mechanisms* **11**, dmm031088.
- Schneider, M. R., Dahlhoff, M., Horst, D. and Hirschi, B.** (2010). A Key Role for E-cadherin in Intestinal Homeostasis and Paneth Cell Maturation. *PLoS ONE* **5**, 13.
- Schonhoff, S. E., Giel-Moloney, M. and Leiter, A. B.** (2004). Minireview: Development and Differentiation of Gut Endocrine Cells. *Endocrinology* **145**, 2639–2644.
- Schreiner, R., Frindt, G., Diaz, F., Carvajal-Gonzalez, J. M., Bay, A. E. P., Palmer, L. G., Marshansky, V., Brown, D., Philp, N. J. and Rodriguez-Boulan, E.** (2010). The absence of a clathrin adapter confers unique polarity essential to proximal tubule function. *Kidney International* **78**, 382–388.
- Schuck, S. and Simons, K.** (2004). Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *Journal of Cell Science* **117**, 5955–5964.
- Schuck, S., Gerl, M. J., Ang, A., Manninen, A., Keller, P., Mellman, I. and Simons, K.** (2007). Rab10 is Involved in Basolateral Transport in Polarized Madin–Darby Canine Kidney Cells. *Traffic* **8**, 47–60.
- Scott, A., Rouch, J. D., Jabaji, Z., Khalil, H. A., Solorzano, S., Lewis, M., Martín, M. G., Stelzner, M. G. and Dunn, J. C. Y.** (2016). Long-term renewable human intestinal epithelial stem cells as monolayers: A potential for clinical use. *Journal of Pediatric Surgery* **51**, 995–1000.
- Selamat, W., Tay, P.-L. F., Baskaran, Y. and Manser, E.** (2015). The Cdc42 Effector Kinase PAK4 Localizes to Cell-Cell Junctions and Contributes to Establishing Cell Polarity. *PLOS ONE* **10**, e0129634.
- Serra, D., Mayr, U., Boni, A., Lukonin, I., Rempfler, M., Challet Meylan, L., Stadler, M. B., Strnad, P., Papasaikas, P., Vischi, D., et al.** (2019). Self-organization and symmetry breaking in intestinal organoid development. *Nature* **569**, 66–72.
- Setta-Kaffetzi, N., Simpson, M. A., Navarini, A. A., Patel, V. M., Lu, H.-C., Allen, M. H., Duckworth, M., Bachelez, H., Burden, A. D., Choon, S.-E., et al.** (2014). AP1S3 Mutations Are Associated with Pustular Psoriasis and Impaired Toll-like Receptor 3 Trafficking. *The American Journal of Human Genetics* **94**, 790–797.
- Shafaq-Zadah, M., Brocard, L., Solari, F. and Michaux, G.** (2012). AP-1 is required for the maintenance of apico-basal polarity in the *C. elegans* intestine. *Development* **139**, 2061–2070.
- Shao, J. and Sheng, H.** (2010). Amphiregulin Promotes Intestinal Epithelial Regeneration: Roles of Intestinal Subepithelial Myofibroblasts. *Endocrinology* **151**, 3728–3737.
- Shapiro, L. and Weis, W. I.** (2009). Structure and Biochemistry of Cadherins and Catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a003053.
- Sharma, N., Low, S. H., Misra, S., Pallavi, B. and Weimbs, T.** (2006). Apical targeting of syntaxin 3 is essential for epithelial cell polarity. *Journal of Cell Biology* **173**, 937–948.

- Shaya, O., Binshtok, U., Hersch, M., Rivkin, D., Weinreb, S., Amir-Zilberstein, L., Khamaisi, B., Oppenheim, O., Desai, R. A., Goodyear, R. J., et al.** (2017). Cell-cell contact area affects Notch signaling and Notch-dependent patterning. *Dev Cell* **40**, 505-511.e6.
- Sheff, D. R., Daro, E. A., Hull, M. and Mellman, I.** (1999). The Receptor Recycling Pathway Contains Two Distinct Populations of Early Endosomes with Different Sorting Functions. *Journal of Cell Biology* **145**, 123–139.
- Sheff, D. R., Kroschewski, R. and Mellman, I.** (2002). Actin Dependence of Polarized Receptor Recycling in Madin-Darby Canine Kidney Cell Endosomes. *MBoC* **13**, 262–275.
- Shen, L. and Turner, J. R.** (2006). Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G577-582.
- Shifrin, J., David A. and Tyska, M. J.** (2012). Ready...aim...fire into the lumen. *Gut Microbes* **3**, 460–462.
- Shim, J., Sternberg, P. W. and Lee, J.** (2000). Distinct and Redundant Functions of μ 1 Medium Chains of the AP-1 Clathrin-Associated Protein Complex in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *MBoC* **11**, 2743–2756.
- Shin, W. and Kim, H. J.** (2022). 3D in vitro morphogenesis of human intestinal epithelium in a gut-on-a-chip or a hybrid chip with a cell culture insert. *Nat Protoc* **17**, 910–939.
- Shin, W., Ambrosini, Y. M., Shin, Y. C., Wu, A., Min, S., Koh, D., Park, S., Kim, S., Koh, H. and Kim, H. J.** (2020). Robust Formation of an Epithelial Layer of Human Intestinal Organoids in a Polydimethylsiloxane-Based Gut-on-a-Chip Microdevice. *Frontiers in Medical Technology* **2**,.
- Shorning, B. Y., Zabkiewicz, J., McCarthy, A., Pearson, H. B., Winton, D. J., Sansom, O. J., Ashworth, A. and Clarke, A. R.** (2009). Lkb1 Deficiency Alters Goblet and Paneth Cell Differentiation in the Small Intestine. *PLoS ONE* **4**, e4264.
- Shoshkes-Carmel, M., Wang, Y. J., Wangenstein, K. J., Tóth, B., Kondo, A., Massasa, E. E., Itzkovitz, S. and Kaestner, K. H.** (2018). Subepithelial telocytes are an important source of Wnts that supports intestinal crypts. *Nature* **557**, 242–246.
- Shroyer, N. F., Wallis, D., Venken, K. J. T., Bellen, H. J. and Zoghbi, H. Y.** (2005). Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev* **19**, 2412–2417.
- Simmen, T., Höning, S., Icking, A., Tikkanen, R. and Hunziker, W.** (2002). AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol* **4**, 154–159.
- Simons, K. and Gerl, M. J.** (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 688–699.
- Simons, K. and Ikonen, E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572.
- Singh, B. and Coffey, R. J.** (2014). Trafficking of Epidermal Growth Factor Receptor Ligands in Polarized Epithelial Cells. *Annu Rev Physiol* **76**, 275–300.

- Singh, B., Bogatcheva, G., Washington, M. K. and Coffey, R. J.** (2013). Transformation of polarized epithelial cells by apical mistrafficking of epiregulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 8960–8965.
- Singh, B., Bogatcheva, G., Starchenko, A., Sinnaeve, J., Lapierre, L. A., Williams, J. A., Goldenring, J. R. and Coffey, R. J.** (2015). Induction of lateral lumens through disruption of a monoleucine-based basolateral-sorting motif in betacellulin. *Journal of Cell Science* **128**, 3444–3455.
- Singh, B., Bogatcheva, G., Krystofiak, E., McKinley, E. T., Hill, S., Rose, K. L., Higginbotham, J. N. and Coffey, R. J.** (2021). Induction of apically mistrafficked epiregulin disrupts epithelial polarity via aberrant EGFR signaling. *Journal of Cell Science* **134**, jcs255927.
- Snippert, H. J., Flier, L. G. van der, Sato, T., Es, J. H. van, Born, M. van den, Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A. M., Rheenen, J. van, Simons, B. D., et al.** (2010). Intestinal Crypt Homeostasis Results from Neutral Competition between Symmetrically Dividing Lgr5 Stem Cells. *Cell* **143**, 134–144.
- Snippert, H. J., Schepers, A. G., van Es, J. H., Simons, B. D. and Clevers, H.** (2014). Biased competition between Lgr5 intestinal stem cells driven by oncogenic mutation induces clonal expansion. *EMBO reports* **15**, 62–69.
- Sottocornola, R., Royer, C., Vives, V., Tordella, L., Zhong, S., Wang, Y., Ratnayaka, I., Shipman, M., Cheung, A., Gaston-Massuet, C., et al.** (2010). ASPP2 binds Par-3 and controls the polarity and proliferation of neural progenitors during CNS development. *Dev Cell* **19**, 126–137.
- Spana, E. P. and Doe, C. Q.** (1996). Numb Antagonizes Notch Signaling to Specify Sibling Neuron Cell Fates. *Neuron* **17**, 21–26.
- Spence, J. R., Mayhew, C. N., Rankin, S. A., Kuhar, M. F., Vallance, J. E., Tolle, K., Hoskins, E. E., Kalinichenko, V. V., Wells, S. I., Zorn, A. M., et al.** (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* **470**, 105–109.
- Spinks, C. B., Zidan, A. S., Khan, M. A., Habib, M. J. and Faustino, P. J.** (2017). Pharmaceutical characterization of novel tenofovir liposomal formulations for enhanced oral drug delivery: in vitro pharmaceuticals and Caco-2 permeability investigations. *CPAA* **9**, 29–38.
- Spits, H. and Cupedo, T.** (2012). Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol* **30**, 647–675.
- Sripathy, S., Lee, M. and Vasioukhin, V.** (2011). Mammalian Lgl2 is necessary for proper branching morphogenesis during placental development. *Mol Cell Biol* **31**, 2920–2933.
- Stechly, L., Morelle, W., Dessein, A.-F., André, S., Grard, G., Trinel, D., Dejonghe, M.-J., Leteurtre, E., Drobecq, H., Trugnan, G., et al.** (2009). Galectin-4-Regulated Delivery of Glycoproteins to the Brush Border Membrane of Enterocyte-Like Cells. *Traffic* **10**, 438–450.
- Stephens, R., Lim, K., Portela, M., Kvensakul, M., Humbert, P. O. and Richardson, H. E.** (2018). The Scribble Cell Polarity Module in the Regulation of Cell Signaling in Tissue Development and Tumorigenesis. *Journal of Molecular Biology* **430**, 3585–3612.
- Stevens, P. D., Wen, Y.-A., Xiong, X., Zaytseva, Y. Y., Li, A. T., Wang, C., Stevens, A. T., Farmer, T. N., Gan, T., Weiss, H. L., et al.** (2018). Erbin Suppresses KSR1-Mediated RAS/RAF Signaling and Tumorigenesis in Colorectal Cancer. *Cancer Research* **78**, 4839–4852.

- Stutzmann, J., Bellissent-Waydelich, A., Fontao, L., Launay, J.-F. and Simon-Assmann, P.** (2000). Adhesion complexes implicated in intestinal epithelial cell-matrix interactions. *Microscopy Research and Technique* **51**, 179–190.
- Stzpourginski, I., Nigro, G., Jacob, J.-M., Dulauroy, S., Sansonetti, P. J., Eberl, G. and Peduto, L.** (2017). CD34+ mesenchymal cells are a major component of the intestinal stem cells niche at homeostasis and after injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E506–E513.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. and Thomson, J. N.** (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **100**, 64–119.
- Surviladze, Z., Waller, A., Strouse, J. J., Bologa, C., Ursu, O., Salas, V., Parkinson, J. F., Phillips, G. K., Romero, E., Wandinger-Ness, A., et al.** (2010). A Potent and Selective Inhibitor of Cdc42 GTPase. In *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*, p. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
- Suzuki, A., Ishiyama, C., Hashiba, K., Shimizu, M., Ebnet, K. and Ohno, S.** (2002). aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization. *Journal of Cell Science* **115**, 3565–3573.
- Suzuki, A., Hirata, M., Kamimura, K., Maniwa, R., Yamanaka, T., Mizuno, K., Kishikawa, M., Hirose, H., Amano, Y., Izumi, N., et al.** (2004). aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. *Curr Biol* **14**, 1425–1435.
- Suzuki, K., Fukui, H., Kayahara, T., Sawada, M., Seno, H., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H. and Chiba, T.** (2005). Hes1-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **328**, 348–352.
- Tai, A. W., Chuang, J.-Z., Bode, C., Wolfrum, U. and Sung, C.-H.** (1999). Rhodopsin's Carboxy-Terminal Cytoplasmic Tail Acts as a Membrane Receptor for Cytoplasmic Dynein by Binding to the Dynein Light Chain Tctex-1. *Cell* **97**, 877–887.
- Takai, Y., Ikeda, W., Ogita, H. and Rikitake, Y.** (2008). The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**, 309–342.
- Takeda, T., Yamazaki, H. and Farquhar, M. G.** (2003). Identification of an apical sorting determinant in the cytoplasmic tail of megalin. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **284**, C1105–C1113.
- Takeichi, M.** (2014). Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 397–410.
- Takekuni, K., Ikeda, W., Fujito, T., Morimoto, K., Takeuchi, M., Monden, M. and Takai, Y.** (2003). Direct Binding of Cell Polarity Protein PAR-3 to Cell-Cell Adhesion Molecule Nectin at Neuroepithelial Cells of Developing Mouse *. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 5497–5500.
- Tang, V. W. and Briehar, W. M.** (2013). FSGS3/CD2AP is a barbed-end capping protein that stabilizes actin and strengthens adherens junctions. *Journal of Cell Biology* **203**, 815–833.
- Tarpey, P. S., Stevens, C., Teague, J., Edkins, S., O'Meara, S., Avis, T., Barthorpe, S., Buck, G., Butler, A., Cole, J., et al.** (2006). Mutations in the Gene Encoding the Sigma 2 Subunit of the Adaptor Protein 1 Complex, AP1S2, Cause X-Linked Mental Retardation. *The American Journal of Human Genetics* **79**, 1119–1124.

- Tay, H. G., Ng, Y. W. and Manser, E.** (2010). A Vertebrate-Specific Chp-PAK-PIX Pathway Maintains E-Cadherin at Adherens Junctions during Zebrafish Epiboly. *PLOS ONE* **5**, e10125.
- Thompson, A., Nessler, R., Wisco, D., Anderson, E., Winckler, B. and Sheff, D.** (2007). Recycling endosomes of polarized epithelial cells actively sort apical and basolateral cargos into separate subdomains. *Mol Biol Cell* **18**, 2687–2697.
- Thottacherry, J. J., Chen, J. and Johnston, D. S.** (2023). Apical-basal polarity in the gut. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.
- Thuenauer, R., Hsu, Y.-C., Carvajal-Gonzalez, J. M., Deborde, S., Chuang, J.-Z., Römer, W., Sonnleitner, A., Rodriguez-Boulan, E. and Sung, C.-H.** (2014). Four-dimensional live imaging of apical biosynthetic trafficking reveals a post-Golgi sorting role of apical endosomal intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 4127–4132.
- Tocchetti, A., Soppo, C. B. E., Zani, F., Bianchi, F., Gagliani, M. C., Pozzi, B., Rozman, J., Elvert, R., Ehrhardt, N., Rathkolb, B., et al.** (2010). Loss of the Actin Remodeler Eps8 Causes Intestinal Defects and Improved Metabolic Status in Mice. *PLOS ONE* **5**, e9468.
- Totaro, A., Panciera, T. and Piccolo, S.** (2018). YAP/TAZ upstream signals and downstream responses. *Nat Cell Biol* **20**, 888–899.
- Troughton, W. D. and Trier, J. S.** (1969). PANETH AND GOBLET CELL RENEWAL IN MOUSE DUODENAL CRYPTS. *Journal of Cell Biology* **41**, 251–268.
- Tsai, Y.-H., Wu, A., Wu, J. H., Capeling, M. M., Holloway, E. M., Huang, S., Czerwinski, M., Glass, I., Higgins, P. D. R. and Spence, J. R.** (2022). Acquisition of NOTCH dependence is a hallmark of human intestinal stem cell maturation. *Stem Cell Reports* **17**, 1138–1153.
- Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G. and Rescigno, M.** (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut* **61**, 1007–1015.
- Tuma, P. L. and Hubbard, A. L.** (2003). Transcytosis: Crossing Cellular Barriers. *Physiological Reviews* **83**, 871–932.
- Tyska, M. J., Mackey, A. T., Huang, J.-D., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Mooseker, M. S.** (2005). Myosin-1a Is Critical for Normal Brush Border Structure and Composition. *MBoC* **16**, 2443–2457.
- Uemura, T., Suzuki, T., Dohmae, N. and Waguri, S.** (2021). Clathrin adapters AP-1 and GGA2 support expression of epidermal growth factor receptor for cell growth. *Oncogenesis* **10**, 80.
- Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M. and Tsukita, S.** (2004). Establishment and Characterization of Cultured Epithelial Cells Lacking Expression of ZO-1*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 44785–44794.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.-P., et al.** (2002). The β -Catenin/TCF-4 Complex Imposes a Crypt Progenitor Phenotype on Colorectal Cancer Cells. *Cell* **111**, 241–250.

- van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F., et al. (2005). Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**, 959–963.
- van Es, J. H., Haegerbarth, A., Kujala, P., Itzkovitz, S., Koo, B.-K., Boj, S. F., Korving, J., van den Born, M., van Oudenaarden, A., Robine, S., et al. (2012a). A Critical Role for the Wnt Effector Tcf4 in Adult Intestinal Homeostatic Self-Renewal. *Mol Cell Biol* **32**, 1918–1927.
- van Es, J. H., Sato, T., van de Wetering, M., Lyubimova, A., Yee Nee, A. N., Gregorieff, A., Sasaki, N., Zeinstra, L., van den Born, M., Korving, J., et al. (2012b). Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat Cell Biol* **14**, 1099–1104.
- van Es, J. H., Wiebrands, K., López-Iglesias, C., van de Wetering, M., Zeinstra, L., van den Born, M., Korving, J., Sasaki, N., Peters, P. J., van Oudenaarden, A., et al. (2019). Enteroendocrine and tuft cells support Lgr5 stem cells on Paneth cell depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 26599–26605.
- Van Itallie, C. M. and Anderson, J. M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* **68**, 403–429.
- Van Itallie, C. M. and Anderson, J. M. (2014). Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **36**, 157–165.
- Van Itallie, C. M., Fanning, A. S., Bridges, A. and Anderson, J. M. (2009). ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **20**, 3930–3940.
- VanDussen, K. L., Carulli, A. J., Keeley, T. M., Patel, S. R., Puthoff, B. J., Magness, S. T., Tran, I. T., Maillard, I., Siebel, C., Kolterud, Å., et al. (2012). Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development* **139**, 488–497.
- von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.-E. and Locksley, R. M. (2016). Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. *Nature* **529**, 221–225.
- Waijers, S., Ramalho, J. J., Koorman, T., Kruse, E. and Boxem, M. (2015). The *C. elegans* Crumbs family contains a CRB3 homolog and is not essential for viability. *Biol Open* **4**, 276–284.
- Wallace, S. W., Durgan, J., Jin, D. and Hall, A. (2010). Cdc42 Regulates Apical Junction Formation in Human Bronchial Epithelial Cells through PAK4 and Par6B. *MBoC* **21**, 2996–3006.
- Walther, R. F., Almeida, F. N. de, Vlassaks, E., Burden, J. J. and Pichaud, F. (2016). Pak4 Is Required during Epithelial Polarity Remodeling through Regulating AJ Stability and Bazooka Retention at the ZA. *Cell Reports* **15**, 45–53.
- Walther, R. F., Burki, M., Pinal, N., Rogerson, C. and Pichaud, F. (2018). Rap1, Canoe and Mbt cooperate with Bazooka to promote zonula adherens assembly in the fly photoreceptor. *Journal of Cell Science* **131**, jcs207779.
- Wang, Y., Giel-Moloney, M., Rindi, G. and Leiter, A. B. (2007). Enteroendocrine precursors differentiate independently of Wnt and form serotonin expressing adenomas in response to active β -catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 11328–11333.

- Wang, R. N., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., Zhang, Q., Ye, J., Yan, Z., Denduluri, S., et al.** (2014). Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes & Diseases* **1**, 87–105.
- Wang, S., Lin, C.-W., Carleton, A. E., Cortez, C. L., Johnson, C., Taniguchi, L. E., Sekulovski, N., Townshend, R. F., Basrur, V., Nesvizhskii, A. I., et al.** (2021). Spatially resolved cell polarity proteomics of a human epiblast model. *Science Advances* **7**, eabd8407.
- Wang, J., Lau, P. K., Li, C. W. and Guo, Y.** (2023). The clathrin adaptor complex-1 and Rab12 regulate post-golgi trafficking of WT epidermal growth factor receptor (EGFR). *Journal of Biological Chemistry* **299**,.
- Watson, C. L., Mahe, M. M., Múnera, J., Howell, J. C., Sundaram, N., Poling, H. M., Schweitzer, J. I., Vallance, J. E., Mayhew, C. N., Sun, Y., et al.** (2014). An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat Med* **20**, 1310–1314.
- Weck, M. L., Crawley, S. W., Stone, C. R. and Tyska, M. J.** (2016). Myosin-7b Promotes Distal Tip Localization of the Intermicrovillar Adhesion Complex. *Current Biology* **26**, 2717–2728.
- Weisz, O. A. and Rodriguez-Boulan, E.** (2009). Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *Journal of Cell Science* **122**, 4253–4266.
- Welling, P. A. and Weisz, O. A.** (2010). Sorting It Out in Endosomes: An Emerging Concept in Renal Epithelial Cell Transport Regulation. *Physiology* **25**, 280–292.
- Wells, C. D., Fawcett, J. P., Traweger, A., Yamanaka, Y., Goudreault, M., Elder, K., Kulkarni, S., Gish, G., Virag, C., Lim, C., et al.** (2006). A Rich1/Amot Complex Regulates the Cdc42 GTPase and Apical-Polarity Proteins in Epithelial Cells. *Cell* **125**, 535–548.
- Whitney, D. S., Peterson, F. C., Kittell, A. W., Egner, J. M., Prehoda, K. E. and Volkman, B. F.** (2016). Binding of Crumbs to the Par-6 CRIB-PDZ Module Is Regulated by Cdc42. *Biochemistry* **55**, 1455–1461.
- Wiegerinck, C. L., Janecke, A. R., Schneeberger, K., Vogel, G. F., Haaften-Visser, D. Y. van, Escher, J. C., Adam, R., Thöni, C. E., Pfaller, K., Jordan, A. J., et al.** (2014). Loss of Syntaxin 3 Causes Variant Microvillus Inclusion Disease. *Gastroenterology* **147**, 65-68.e10.
- Willenborg, C., Jing, J., Wu, C., Matern, H., Schaack, J., Burden, J. and Prekeris, R.** (2011). Interaction between FIP5 and SNX18 regulates epithelial lumen formation. *Journal of Cell Biology* **195**, 71–86.
- Wilson, P. D.** (2011). Apico-basal polarity in polycystic kidney disease epithelia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1812**, 1239–1248.
- Winton, D. J., Blount, M. A. and Ponder, B. a. J.** (1988). A clonal marker induced by mutation in mouse intestinal epithelium. *Nature* **333**, 463–466.
- Workman, M. J., Mahe, M. M., Trisno, S., Poling, H. M., Watson, C. L., Sundaram, N., Chang, C.-F., Schiesser, J., Aubert, P., Stanley, E. G., et al.** (2017). Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nat Med* **23**, 49–59.

- Wozniak, M. and Limbird, L. E.** (1996). The Three $\alpha 2$ -Adrenergic Receptor Subtypes Achieve Basolateral Localization in Madin-Darby Canine Kidney II Cells via Different Targeting Mechanisms (*). *Journal of Biological Chemistry* **271**, 5017–5024.
- Wu, W. J., Tu, S. and Cerione, R. A.** (2003). Activated Cdc42 Sequesters c-Cbl and Prevents EGF Receptor Degradation. *Cell* **114**, 715–725.
- Xie, Y., Zamponi, R., Charlat, O., Ramones, M., Swalley, S., Jiang, X., Rivera, D., Tschantz, W., Lu, B., Quinn, L., et al.** (2013). Interaction with both ZNRF3 and LGR4 is required for the signalling activity of R-spondin. *EMBO Rep* **14**, 1120–1126.
- Xu, J., Kausalya, P. J., Phua, D. C. Y., Ali, S. M., Hossain, Z. and Hunziker, W.** (2008). Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Mol Cell Biol* **28**, 1669–1678.
- Xue, X., Jaulin, F., Espenel, C. and Kreitzer, G.** (2010). PH-domain-dependent selective transport of p75 by kinesin-3 family motors in non-polarized MDCK cells. *Journal of Cell Science* **123**, 1732–1741.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A. and Ohno, S.** (2003). Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol* **13**, 734–743.
- Yan, K. S., Janda, C. Y., Chang, J., Zheng, G. X. Y., Larkin, K. A., Luca, V. C., Chia, L. A., Mah, A. T., Han, A., Terry, J. M., et al.** (2017). Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5+ intestinal stem-cell self-renewal. *Nature* **545**, 238–242.
- Yang, Q., Bermingham, N. A., Finegold, M. J. and Zoghbi, H. Y.** (2001). Requirement of Math1 for Secretory Cell Lineage Commitment in the Mouse Intestine. *Science* **294**, 2155–2158.
- Yates, L. L., Schnatwinkel, C., Hazelwood, L., Chessum, L., Paudyal, A., Hilton, H., Romero, M. R., Wilde, J., Bogani, D., Sanderson, J., et al.** (2013). Scribble is required for normal epithelial cell–cell contacts and lumen morphogenesis in the mammalian lung. *Developmental Biology* **373**, 267–280.
- Yeaman, C., Gall, A. H. L., Baldwin, A. N., Monlauzeur, L., Bivic, A. L. and Rodriguez-Boulan, E.** (1997). The O-glycosylated Stalk Domain Is Required for Apical Sorting of Neurotrophin Receptors in Polarized MDCK Cells. *Journal of Cell Biology* **139**, 929–940.
- Yeaman, C., Ayala, M. I., Wright, J. R., Bard, F., Bossard, C., Ang, A., Maeda, Y., Seufferlein, T., Mellman, I., Nelson, W. J., et al.** (2004). Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* **6**, 106–112.
- Yin, F., Yu, J., Zheng, Y., Chen, Q., Zhang, N. and Pan, D.** (2013). Spatial Organization of Hippo Signaling at the Plasma Membrane Mediated by the Tumor Suppressor Merlin/NF2. *Cell* **154**, 1342–1355.
- Yin, X., Farin, H. F., van Es, J. H., Clevers, H., Langer, R. and Karp, J. M.** (2014). Niche-independent high-purity cultures of Lgr5+ intestinal stem cells and their progeny. *Nat Methods* **11**, 106–112.

- Yu, Q., Kilik, U., Holloway, E. M., Tsai, Y.-H., Harmel, C., Wu, A., Wu, J. H., Czerwinski, M., Childs, C. J., He, Z., et al. (2021). Charting human development using a multi-endodermal organ atlas and organoid models. *Cell* **184**, 3281-3298.e22.
- Zamfirescu, A.-M., Yatsenko, A. S. and Shcherbata, H. R. (2022). Notch signaling sculpts the stem cell niche. *Front Cell Dev Biol* **10**, 1027222.
- Zeigerer, A., Gilleron, J., Bogorad, R. L., Marsico, G., Nonaka, H., Seifert, S., Epstein-Barash, H., Kuchimanchi, S., Peng, C. G., Ruda, V. M., et al. (2012). Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature* **485**, 465–470.
- Zhang, H., Kim, A., Abraham, N., Khan, L. A., Hall, D. H., Fleming, J. T. and Gobel, V. (2012). Clathrin and AP-1 regulate apical polarity and lumen formation during *C. elegans* tubulogenesis. *Development* **139**, 2071–2083.
- Zhang, X., Bandyopadhyay, S., Araujo, L. P., Tong, K., Flores, J., Laubitz, D., Zhao, Y., Yap, G., Wang, J., Zou, Q., et al. (2020). Elevating EGFR-MAPK program by a nonconventional Cdc42 enhances intestinal epithelial survival and regeneration. *JCI Insight* **5**,.
- Zhang, Z., Zhang, F., Davis, A. K., Xin, M., Walz, G., Tian, W. and Zheng, Y. (2022). CDC42 controlled apical-basal polarity regulates intestinal stem cell to transit amplifying cell fate transition via YAP-EGF-mTOR signaling. *Cell Reports* **38**, 110009.
- Zhou, D., Zhang, Y., Wu, H., Barry, E., Yin, Y., Lawrence, E., Dawson, D., Willis, J. E., Markowitz, S. D., Camargo, F. D., et al. (2011). Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, E1312–E1320.
- Zihni, C., Munro, P. M. G., Elbediwy, A., Keep, N. H., Terry, S. J., Harris, J., Balda, M. S. and Matter, K. (2013). Dbl3 drives Cdc42 signaling at the apical margin to regulate junction position and apical differentiation. *Journal of Cell Biology* **204**, 111–127.
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K. and Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 564–580.
- Zihni, C., Vlassaks, E., Terry, S., Carlton, J., Leung, T. K. C., Olson, M., Pichaud, F., Balda, M. S. and Matter, K. (2017). An apical MRCK-driven morphogenetic pathway controls epithelial polarity. *Nat Cell Biol* **19**, 1049–1060.
- Zizioli, D., Meyer, C., Guhde, G., Saftig, P., Figura, K. von and Schu, P. (1999). Early Embryonic Death of Mice Deficient in γ -Adaptin *. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 5385–5390.
- Zizioli, D., Forlanelli, E., Guarienti, M., Nicoli, S., Fanzani, A., Bresciani, R., Borsani, G., Preti, A., Cotelli, F. and Schu, P. (2010). Characterization of the AP-1 μ 1A and μ 1B adaptins in zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental Dynamics* **239**, 2404–2412.
- Zupancic, T., Stojan, J., Lane, E. B., Komel, R., Bedina-Zavec, A. and Liovic, M. (2014). Intestinal cell barrier function in vitro is severely compromised by keratin 8 and 18 mutations identified in patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One* **9**, e99398.

Titre : Contrôle de la prolifération par le trafic intracellulaire dans un modèle d'organoïde intestinal murin

Mots clés : organoïde, intestin, AP-1B, trafic, prolifération

Résumé : Le trafic intracellulaire contrôle la polarité cellulaire intestinale, dont la mise en place et le maintien sont essentiels à la fonction de cet organe. De façon surprenante, la déplétion de la sous-unité μ 1B de l'adaptateur de clathrine AP-1B (*Ap1m2*), impliquée dans le tri polarisé, entraîne des défauts de polarité et une hyperplasie des cryptes dans l'intestin de souris, révélant un nouveau rôle du trafic polarisé dans le contrôle de la prolifération intestinale. Nous avons confirmé les défauts de polarité et l'hyper-prolifération dans un modèle murin d'organoïde intestinal muté pour *Ap1m2*. L'hyper-prolifération observée est dépendante des voies de signalisation EGFR et mTOR. L'analyse phénotypique révèle également des défauts de différenciation du lignage sécrétoire et une expansion de la zone des cellules souches/progénitrices.

De plus, nous avons montré que la localisation du déterminant de polarité apicale, CDC42, est altérée dans les organoïdes mutés pour *Ap1m2*. La déplétion intestinale de CDC42 induisant des phénotypes similaires à ceux que nous observons, nous émettons l'hypothèse qu'AP-1B régule la prolifération à travers le contrôle de la localisation de CDC42. Nous avons donc montré qu'AP-1B joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de la couche épithéliale en contrôlant la polarité cellulaire, mais aussi la prolifération et la différenciation intestinale. Des travaux complémentaires permettront de caractériser les mécanismes par lesquels AP-1B contrôle la localisation de CDC42 et l'activation des voies de signalisation EGFR et mTOR.

Title : Control of cell proliferation by apical trafficking in mouse intestinal organoids

Keywords : organoid, intestine, AP-1B, traffic, proliferation

Abstract : Vesicular trafficking has a role in the control intestinal cells polarity, whose establishment and maintenance are essential to proper intestinal function. Interestingly, removal of the μ 1B subunit of the clathrin adaptor AP-1 (*Ap1m2*), involved in polarised sorting, has been shown to lead not only to polarity defects but also to crypt hyperplasia in a mouse model, which enlightens a new role of vesicular trafficking in cell proliferation in the intestine. We confirmed both polarity defects and hyperproliferation using an inducible *Ap1m2* knockout strategy in mouse intestinal organoids. The hyperproliferation observed is EGFR and mTOR signaling pathways dependant. Further phenotypic analyses also unveiled a differentiation

impairment of the secretory lineage and an expansion of the stem cell zone. Furthermore, we showed that *Ap1m2* mutation affects the localization of the apical polarity determinant CDC42, whose depletion induces similar intestinal polarity, differentiation, and proliferation defects. We thus hypothesize that AP-1 regulates cell proliferation by controlling the localisation of CDC42. In conclusion, we showed that AP-1B plays a major role in the maintenance of the intestinal surface integrity by controlling both the polarity of the enterocytes and the proliferation/differentiation balance in the intestine. Future work will allow us to characterize the mechanisms by which AP-1B controls CDC42 localization and EGFR and mTOR pathways activation.