Le code-barres Rouge-Vert-Bleu (RVB) : Un modèle fluorescent de suivi du lignage cellulaire pour déchiffrer la fonction du récepteur nucléaire de l'hormone thyroïdienne TRα1 dans l'hétérogénéité et la hiérarchisation du cancer colorectal

Léo Claret

▶ **To cite this version:**

Léo Claret. Le code-barres Rouge-Vert-Bleu (RVB) : Un modèle fluorescent de suivi du lignage cellulaire pour déchiffrer la fonction du récepteur nucléaire de l'hormone thyroïdienne TRα1 dans l'hétérogénéité et la hiérarchisation du cancer colorectal. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. hal-03930614

HAL Id: hal-03930614
https://ephe.hal.science/hal-03930614

Submitted on 9 Jan 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.

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté
Par
Léo Claret

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : Le code-barres Rouge-Vert-Bleu (RVB) : Un modèle fluorescent de suivi du lignage cellulaire pour déchiffrer la fonction du récepteur nucléaire de l'hormone thyroïdienne TRα1 dans l'hétérogénéité et la hiérarchisation du cancer colorectal

Soutenu le jeudi 08 décembre 2022 **devant le jury suivant :**

Sophie Thenet **- Président**
Michelina Plateroti **- Tuteur scientifique**
Véronique Frachet **- Tuteur pédagogique**
Adèle De Arcangelis **- Rapporteur**
Jean Noël Freund **- Examinateur**

Mémoire préparé sous la direction de : Michelina Plateroti
Intitulé de la structure d'accueil : Unité Inserm U1113 IRFAC
Directeur U1113 IRFAC : Jean Noël Freund

et de Véronique Frachet
Intitulé de la structure d'accueil EPHE : UMR_S 1209/UMR 5309 Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB) - EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Groupe de Recherche et d'Enseignements Thématiques de l'EPHE : Génomes, Cancers et Thérapies (GCT)

Remerciements

Pour commencer, je remercie Sophie Thenet d'avoir accepté de présider ma soutenance ainsi que Adèle De Arcangelis en tant que rapporteur.

Je remercie également Jean-Noël Freund, en sa qualité de directeur de l'unité de recherche U1113 et d'examinateur de ma soutenance. Merci pour toutes les discussions échangées et conseils donnés au cours de mes deux années passées à l'IRFAC. Merci également au passionné d'Histoire, d'anecdotes et de musique.

Je souhaite remercier vivement Véronique Frachet qui m'a suivi tout au long de mon parcours sinueux, en étant toujours présente pour me conseiller dans mon cursus universitaire et scientifique en faisant toujours preuve d'une grande pédagogie.

Un grand merci à Chloé Maigret, pour ton implication dans mes travaux, ta spontanéité sans oublier tes gâteaux !

Merci aussi à Louise Thévenoux, qui a sacrifié un nombre incalculable de pauses repas pour effectuer un travail énorme dans le projet ainsi que rajouter des kilomètres au compteur de la Thévenoux-Mobile, la Twingo la plus rapide de l'univers, parfaitement adaptée pour se rendre à la plateforme de cytométrie.

Un grand merci au CIENT (Comité Inter-Etage des Non-Titulaires), toujours présent pour sauver une IF, déboucher le cytomètre, et surtout pour déguster des cocktails au basilic.

Je remercie évidemment les membres de l'équipe, Virginia et le SEC, Sergueï, Diana, Gautier, Aimée. Merci tout particulièrement à Dominique Guenot, voisine de bureau, toujours bonne conseillère lors de la conception des Powerpoints, qui m'a ravitaillé en viennoiseries dans les moments d'écriture difficile. Merci aux membres de l'IRFAC et à Ourania, Céline, Elisabeth, Nathalie, Pascal, Isabelle et Isabelle, Claire. Merci pour tout à Véro. Mention spéciale au Dr Eis', pour ta pédagogie et surtout le reste !

Je remercie chaleureusement Michela Plateroti qui a toujours cru en moi, m'a tout de suite accordé sa confiance et m'a soutenu tout au long de ces trois dernières années. Humainement comme scientifiquement, c'est une rencontre des plus enrichissante. Merci pour ta patience, ta franchise et ton soutien. Merci d'avoir pensé ce projet multicolore, conçu pour un technicien qui est pourtant resté jusqu'à présent monocolore !

Je remercie sincèrement ma famille, Yves-Alain et Bénédicte, qui n'ont jamais douté et mes parents que j'ai plusieurs fois « chalengé ».

Un grand merci à mes amis, la Dream Team, présente depuis le début mais aussi Axel, Romain et Christophe ainsi que Juju et Nico.

Pour finir, merci infiniment à Batman et Robin, qui continuent de veiller sur Gotham, et bien plus encore.

Table des matières

Remerciements ***1***

Liste des abréviations ***4***

Table des illustrations et tableaux ***6***

Avant-propos ***9***

Introduction ***10***

I) L'épithélium intestinal **10**

II) Focus sur les voies de signalisation WNT et NOTCH **11**
A) La voie WNT 11
B) La voie NOTCH 12

III) De l'homéostasie vers le cancer **13**

IV) Les hormones thyroïdiennes et leurs récepteurs en physiopathologie intestinale **15**
A) En condition physiologique 15
B) En condition pathologique : le cancer colorectal 19

V) L'hétérogénéité du cancer colorectal et nouvelles méthodes d'études **22**
A) L'hétérogénéité intra-tumorale 22
B) Le suivi du lignage cellulaire pour comprendre le cancer 23
C) Méthodes prospectives et rétrospectives 23

VI) Objectifs du projet **26**

VII) Approches expérimentales **26**

Matériels et méthodes ***28***

I) Culture cellulaire **28**
A) Entretien de lignée cellulaire 28
B) Analyse de la prolifération cellulaire : Incucyte 28
C) Culture tridimensionnelle de lignée d'adénocarcinome colique en sphéroïdes 28
D) Organoïdes coliques tumoraux humains 29

II) Infection aux vecteurs lentiviraux **30**
A) Infection RGB 30
B) Modulation du niveau d'expression de TRα1 31

III) Quantification et contrôle de la modulation d'expression de TRα1 **32**
A) Expression relative d'ARNm : PCR quantitative (qPCR) 32
B) Expression protéique : Western Blot 32

IV) Xénogreffes **32**
A) Implantation sous-cutanée de sphéroïdes entiers. 33
B) Injection sous-cutanée de sphéroïdes dissociés. 33

V) Cytométrie en flux et tri cellulaire : **33**

VI) Prélèvement de tumeurs dans les souris xénogreffées et coupes au cryostat **34**

VII) Immunofluorescence sur coupes congelées **34**

VIII) Coloration hématoxyline-éosine de Harris : **35**

IX) Imagerie **35**
A) Microscope Axiophot 35
B) Microscope à Champ Large 36
C) Microscope Axiovert 36

X) Traitement des images et mise en forme des résultats 36

Résultats 38

I) Mise en place des lignées d'adénocarcinome colique humain Caco-2/TC-7 RVB 38
A) Infection optimale RVB Caco2 38
B) Génération d'une banque de lignées mono-fluorescentes Caco-2/TC-7-RVB 41

II) Analyse des effets de la modulation de TRα1 42
A) Caractérisation des clones *in vitro* en culture monocouche 42
B) Étude *in vitro* de la dynamique clonale au cours du temps à l'aide de sphéroïdes complexes composés de cellules avec des niveaux RVB-TRα1-modulés 45
C) Étude *in vivo* de la dynamique clonale au cours du temps à l'aide de xénogreffes de sphéroïdes complexes composés de cellules avec des niveaux RVB-TRα1-modulés 57

III) Mise en place des organoïdes tumoraux humains RVB 64
A) Définition du titre d'infection : analyse morphologique 64
B) Définition du titre d'infection : approche quantitative par titration en cytométrie en flux 66

Discussion 68

I) Mise en place des lignées d'adénocarcinome colique humain Caco-2/TC-7 RVB 68
A) Infection optimale RGB Caco2 69
B) Banques cellulaires Caco-2/TC-7-RVB 70

II) Études des effets de la modulation de TRα1 sur l'expansion clonale 71
A) Modulation de TRα1 dans les Caco-2/TC-7 71
B) Étude *in vitro* de la dynamique des sphéroïdes RVB-TRα1-modulés au cours du temps 71
C) Effets de la modulation TRα1 dans les xénogreffes de sphéroïdes 75

III) Mise en place des organoïdes tumoraux humains RVB 77

Conclusion 80

Bibliographie 82

Annexes 88
1) Stratégie de gating pour quantifier la répartition des populations RVB en cytométrie en flux. 88
2) Récapitulatif des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les marquages en immunofluorescence. 88
3) Caractéristiques de protéines fluorescentes RVB du système LeGO. 89
4) Carte des vecteurs LeGO codants pour les protéines mCherry, Venus et Cerulean. 89
5) Banques cellulaires Caco-2/TC-7-RVB créées à partir du système LeGO. 92
6) Comparaison de l'expansion des clones Caco-2/TC-7 R45, V41 et B7 par le calcul de l'aire sous chacune des courbes de croissance. 93
7) Analyse par Western Blot des niveaux deTRα1 dans les cellules infectées ou parentales. 93
8) Les sphéroïdes de Caco-2/TC-7 RVB reproduisent la mise en place de l'hétérogénéité intra-tumorale. 94
9) Caractérisation de l'hétérogénéité intra-tumorale après 90 jours de greffe des sphéroïdes RVB Caco-2/TC-7. 95
10) Analyse de la morphologie et du niveau de fluorescence des tumoroïdes RVB infectés à différents titres viraux. 98
11) Mesure des aires des tumoroïdes pendant une semaine dans cadre des infections RVB. 99
12) Titration en cytométrie en flux des tumoroïdes humains RVB. 100
13) Le tri cellulaire permet de générer des cultures RVB de tumoroïdes humains. 104

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNg : ADN génomique
ALDH : Aldéhydes déshydrogénases
BMP : Bone Morphogenic Protein
BSA : Bovine serum albumin
CCR : Cancer colorectal
Cellules CBC : Cellules de la base de la colonne de la crypte
CFP : Cyan Fluorescent Protein
CIMP : Instabilité épigénétique
CIN : Instabilité chromosomique
CIT : Cellules initiatrices de tumeur
CK : cytokératine
CMS : Consensus Molecular System
CS : Cellules souches
CSC : Cellules souches cancéreuses
CSI : Cellules souches intestinales
CSL : CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1
Cy3 : Cyanine 3
Cy5 : Cyanine 5
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
DKK : Dickkopf
DLL : delta-like
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
EEC : Cellule entéro-endocrine
EGF : Epidermal Growth Factor
EGF : Eptihelial Growth Factor
EphB2 : Éphrine B2
FACS : Fluorescence activated cell sorting
HES : Hairy/ Enhancer of Split
HT : Hormones thyroïdiennes
Jag : Jagged
kDa : kilo Dalton
kpb : kilo paire de bases
LEF : Lymphoid Enhancer Factor
LeGO : Lentiviral gene ontology
LGR : Leucine-rich repeat-containing G protein- coupled Receptor 5
LM PCR : Ligation mediated polymerase chain reaction
LRP : Lipoprotein Receptor-Related Protein
MATH1 : Mouse Atoh1 homolog 1
MMB : Matrice membranaire basale
MSI : Micro-satellite instability
Msi1 : Musashi1
NICD : NOTCH Intracellular Domain
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBS : Phosphate buffer saline (Tampon phosphate salin)
Pen/Strep : Pénicilline/Streptomycine
PFA : Paraformaldéhyde
RSPO : R-spondine
SFRPs : Secreted Frizzled-related Proteins
SPA : Séquence précurseur adaptatrice
SVF : Sérum de veau fœtal
TA : Température ambiante
TAE : Tris, Acétate, EDTA
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
TR : Thyroid hormone receptor (Récepteur aux hormones thyroïdiennes)
TRH : thyrotropin-realising hormone
TripLE : Enzyme stable de remplacement de la trypsine
TSH : Thyroid Stimulating Hormone
WIF : WNT Inhibitor Factor
YFP : Yellow Fluorescent Protein

Table des illustrations et tableaux

Figure 1 : Les voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie intestinale et leurs gradients d'expression le long de l'axe vertical. 11
Figure 2 : La voie WNT canonique. 12
Figure 3 : La voie NOTCH. 13
Figure 4 : La progression du cancer colorectal. 15
Figure 5 : Le rétrocontrôle de production des hormones thyroïdiennes. 16
Figure 6 : Schématisation du récepteur des hormones thyroïdiennes. 16
Figure 7 : L'évolution du taux circulant de HT joue un rôle dans le développement du tractus intestinal des amphibiens et des mammifères. 17
Figure 8 : La modulation d'expression de TRα1 ou un traitement à la T3 a un impact sur la structure des cryptes murines. 18
Figure 9 : Proposition de la régulation croisée entre la voie WNT et TRα1. 19
Figure 10 : L'expression de THRA dans des cohortes de patients et sa corrélation avec l'activité de la voie WNT. 20
Figure 11 : Proposition de la régulation croisée entre la voie WNT et TRα1 dans un contexte tumoral. 21
Figure 12 : L'expression de TRα1 est hétérogène dans les CCR de différents stades. 22
Figure 13 : Les approches "prospective" et "rétrospective" du suivi du lignage cellulaire (lineage tracing). 23
Figure 14 : Le modèle de suivi de lignage LeGO. 24
Figure 15 : La modulation de recombinaison du vecteur Brainbow. 25
Figure 16 : Principe du modèle de code-barres RVB avec le système LeGO. 27
Figure 17 : Formation et maintien de sphéroïdes de la lignée d'adénocarcinome colique humain Caco-2/TC-7 pendant 9 jours. 29
Figure 18 : Stratégie de « gating » et d'analyse des populations cellulaires RVB après infection avec le système LeGO. 34
Figure 19 : Détermination de l'efficacité des particules lentivirales codant pour le système LeGO lors de l'infection des cellules Caco-2/TC-7. 39
Figure 20 : Gamme de dilution restreinte des particules lentivirales codant pour le système LeGO pour infecter les lignées Caco-2/TC-7. 39
Figure 21 : L'infection des cellules Caco-2/TC-7 avec la gamme de titration restreinte permet de déterminer le titre d'infection optimal pour induire l'expression des protéines RVB dans les cellules. 40
Figure 22 : La triple infection (RVB) des cellules Caco-2/TC-7 induit la génération de plusieurs populations fluorescentes. 41
Figure 23 : Les mono-infections des Caco-2/TC-7 aux titres optimaux avec le système LeGO permettent de générer des clones R/V/B. 41
Figure 24 : L'expansion clonale des clones Caco-2/TC-7 R/V/B révèle des phénotypes différents. 42
Figure 25 : Les clones Caco-2/TC-7 R45, V41 et B7 ont une vitesse de prolifération proche. 43
Figure 26 : Modulation de TRα1 au niveau ARNm et protéique. 44
Figure 27 : La modulation du niveau de TRα1 dans les clones R45 et B7 modifie leur vitesse de prolifération. 44
Figure 28 : Les sphéroïdes de Caco-2/TC-7 reproduisent la hiérarchisation de l'axe vertical crypte-villosité/épithélium de surface. 46
Figure 29 : La protéine membranaire EpCAM est exprimée à la membrane des cellules Caco-2/TC-7 RVB-TRα1 modulés qui composent les sphéroïdes. 47
Figure 30 : Le statut non différencié évolue au cours du temps dans les cultures en sphéroïdes de Caco-2/TC-7 TRα1 modulés. 49
Figure 31 : Les cellules en bordure externe des sphéroïdes Caco-2/TC-7 RVB-TRα1 modulés prolifèrent. 51
Figure 32 : Les sphéroïdes RVB-TRα1 modulés abritent des cellules souches cancéreuses. 53
Figure 33 : Les cellules Caco-2/TC-7 RVB-TRα1-modulées se différencient au cours du temps dans les cultures en sphéroïdes. 55
Figure 34 : Les populations RVB et les marqueurs étudiés sont dynamiques au cours du temps dans les sphéroïdes de Caco-2/TC-7 TRα1 modulés. 57
Figure 35 : Contrôle de la viabilité des cellules ou des sphéroïdes implantés en sous-cutané dans le flanc des souris NOD-scid. 58
Figure 36 : L'implantation sous-cutanée des sphéroïdes dissociés de Caco-2/TC-7-RVB-TRα1 modulés montre le développement de tumeurs. 58

Figure 37 : La greffe des sphéroïdes dissociés ou entiers conduit au développement de structures de morphologies différentes. 59
Figure 38 : La protéine EpCAM, marqueur spécifique des cellules épithéliales, est présente dans les cellules tumorales RVB des xénogreffes. 60
Figure 39 : Mise en évidence de la propriété non différenciée de certaines populations cellulaires des tumeurs issues de sphéroïdes xénogreffés. 61
Figure 40 : Étude du marqueur mitotique phospho-Histone H3 pour caractériser les tumeurs de Caco-2/TC-7-RVB. 62
Figure 41 : Mise en évidence de la propriété souche de certaines populations cellulaires des xénogreffes. 63
Figure 42 : Mise en évidence de la présence de cellules différenciées dans les xénogreffes. 64
Figure 43 : Infection optimisée des organoïdes tumoraux humains. 65
Figure 45 : L'efficacité d'infection et la répartition des différents clones cellulaires est similaire entre les trois titres d'infection RVB des tumoroïdes humains. 67
Figure 46 : Les sphéroïdes de Caco-2/TC-7 reproduisent la hiérarchie de l'épithélium intestinal avec l'expression d'un gradient de prolifération et de différenciation. 74
Figure 47 : Exemple de modélisation spatiotemporelle de l'expansion clonale dans une tumeur. 75

Tableau 1 : Caractérisation des sous-types de CCR selon la classification CMS. 14
Tableau 2 : Caractérisation morphologique et moléculaire de la tumeur à l'origine de la mise en culture des tumoroïdes humains. 30
Tableau 3 : Dilutions des vecteurs lentiviraux LeGO pour déterminer le titre optimal lors des infections dans la lignée Caco-2/TC-7. 31
Tableau 4 : Dilutions des vecteurs lentiviraux LeGO pour déterminer le titre optimal lors des infections des tumoroïdes coliques humains. 31
Tableau 5 : Dilutions des vecteurs lentiviraux pour moduler le niveau d'expression de TRα1 dans les lignées Caco-2/TC-7. 31
Tableau 6 : Liste des oligonucléotides utilisés pour la qPCR. 32
Tableau 7 : Conditions de coupe au cryostat des inclusions en OCT. 34
Tableau 8 : Gamme de dilution optimisée de chaque virion pour l'infection lentivirale RVB des tumoroïdes humains. 65

Avant-propos

Le cancer colorectal est une pathologie fréquente, souvent létale, dont la réponse aux thérapies peut être affectée par son hétérogénéité [1], conduisant aux chimiorésistances et finalement aux rechutes. Il est aujourd'hui connu que le CCR est dû à un dysfonctionnement des cellules souches (CS) qui se transforment en CS cancéreuses (CSC) [2], [3]. Pour ces raisons, la compréhension de la biologie des CS et CSC à l'origine des CCR, ainsi que l'étude des phénomènes biologiques impliqués dans la résistance aux traitements, est un enjeu majeur de santé publique.

Les travaux précédents de notre équipe ont pu mettre en avant le rôle de la voie de signalisation des hormones thyroïdiennes (HT) *via* leur récepteur nucléaire TRα1 dans le développement et l'homéostasie intestinale ainsi que dans l'induction tumorale [4], [5]. Plus particulièrement, les travaux ont démontré que les HT constituent un exemple de facteurs extrinsèques capables de contrôler la biologie des CS des cryptes intestinales, la prolifération épithéliale et la tumorigenèse intestinale *via* un réseau complexe de voies signalétiques, incluant WNT et NOTCH [6], [7]. Il est important de noter que l'activité de ces voies corrèle avec l'expression de TRα1 à la fois dans le colon normal et les CCR, où TRα1 est fréquemment surexprimé [8]. De plus, il a été montré que TRα1 présente un profil d'expression très variable et hétérogène dans les CCR [4], [8]. Cette hétérogénéité existe entre les tumeurs, mais aussi à l'échelle intra-tumorale et pourrait être corrélée à la présence de plusieurs sous-types cellulaires, de phénotypes différents [1], [9], [10]. Ces différents phénotypes seraient impliqués dans les diverses étapes de l'initiation du CCR, mais aussi de la progression et la rechute des patients après traitement [11].

Le projet auquel j'ai contribué a pour but de mieux définir ces différentes étapes et de caractériser les populations cellulaires impliquées. Afin d'étudier les propriétés des populations cellulaires exprimant différents niveaux de TRα1, pour récapituler l'hétérogénéité intra-tumorale de son expression, nous avons développé une approche de code-barres génétiques et fluorescents permettant de suivre et étudier le lignage des populations tumorales.

« L'existence de cellules cancéreuses souches distinctes de cellules cancéreuses différenciées fait apparaître deux façons strictement différentes d'être cancéreuse pour la cellule. En effet, on pourrait distinguer une classe de cellules cancéreuses cancérigènes (les CSC) et une classe de cellules cancéreuses cancérées (les autres). »

LAPLANE L., (2009). Cellule souche cancéreuse : réflexions épistémologiques. *Sociétés*, 105(3), 45-55.

Introduction

I) L'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est une monocouche cellulaire [13] qui présente une surface interne moyenne de 30m^2 [14] avec un rôle protecteur, absorptif et sécrétoire [2]. Fonctionnellement compartimenté, il se renouvelle de manière rapide et continue (4-5 jours selon les régions). Il est caractérisé par une organisation verticale composée, de bas en haut, des cryptes intestinales, de la zone d'amplification transitoire puis des villosités dans l'intestin grêle et de l'épithélium de surface dans le colon [2] (Figure 1).

Au fond des cryptes se trouvent les cellules souches (CS). En proliférant, elles vont servir au maintien du compartiment souche ou se différencier en cellules progénitrices [13], [15]. Celles-ci se différencient en lignages absorbants et sécrétoires pour devenir des cellules matures dans les villosités et l'épithélium de surface [2]. Ces dernières assurent les fonctions physiologiques (absorptives et sécrétoires) de l'intestin, avant de mourir par apoptose et d'être exfoliées dans la lumière intestinale (Figure 1) [15], [16].

La capacité de renouvellement et de maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal dépend des CS à caractère prolifératif, caractérisées par l'expression du marqueur Lgr5 (Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled Receptor 5) [17]. Ces CS prolifératives sont qualifiées en tant que cellules souches actives. En parallèle, les CS « passives » adoptent un statut de dormance, non prolifératif, et ne s'activent qu'en cas de perte des CS actives, par exemple suite à une blessure de l'épithélium [2].

Cependant, une grande plasticité a été décrite dans les cryptes intestinales et des cellules déjà engagées dans la différenciation peuvent également se dédifférencier pour réacquérir un phénotype CS-like en cas de perte de CS actives [18]–[20].

La physiologie des CS est régulée par des interactions complexes avec les différents types cellulaires qui constituent leur niche *via* la sécrétion/réception/intégration/réponse à des signaux spécifiques dont WNT, NOTCH, BMP (Bone morphogenic protein) et EGF (Epithelial Growth Factor) [2], [15].

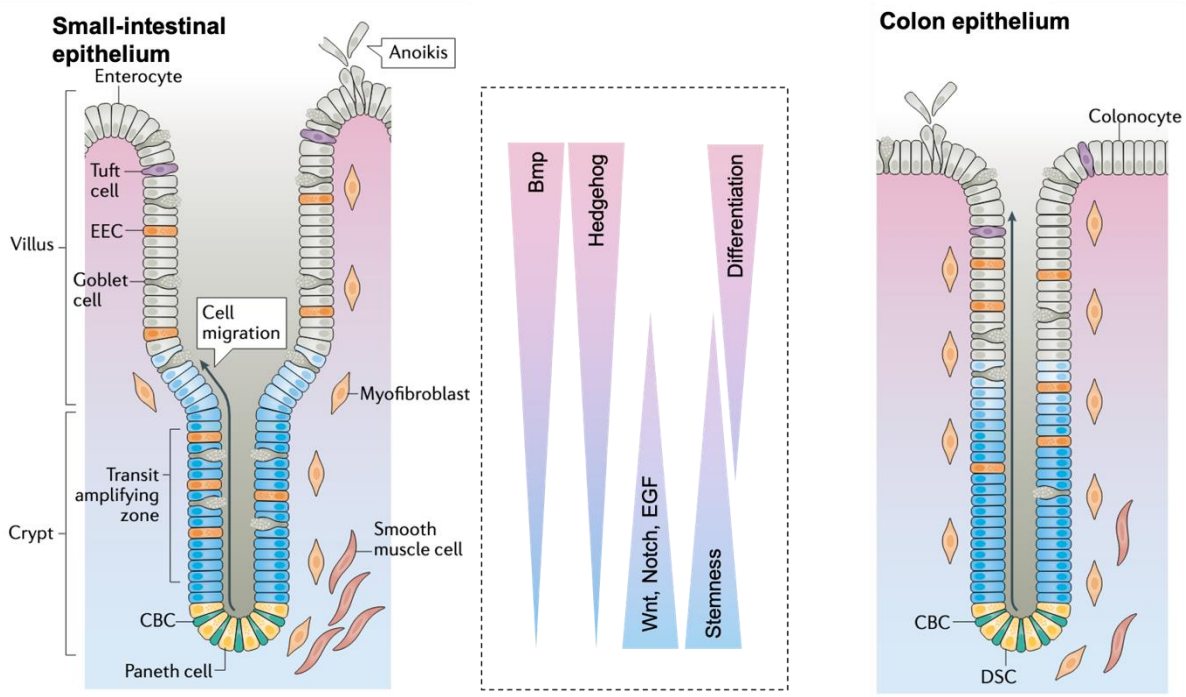


Figure 1 : Les voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie intestinale et leurs gradients d'expression le long de l'axe vertical.
L'axe crypte-villosité de l'épithélium de l'intestin grêle (small intestine) est composé, à sa base, de cryptes, accueillant les CS (CBC sur ce schéma) intercalées avec des cellules de Paneth. La partie supérieure des cryptes est la zone d'amplification transitoire (transit-amplifying zone) constituée de cellules progénitrices en cours de différenciation. Enfin, les villosités, hébergent les cellules différenciées : entérocytes, cellules à touffe (Tuft cells), entéro-endocrines (EEC), ou cellules à mucus (goblet). Dans l'épithélium colique, le fond de la crypte est également constitué de CS, les cellules de Paneth sont remplacées par des cellules dites profondes sécrétrices (deep secretory cells, DSC). L'axe de différenciation suit la longueur cryptique jusqu'à atteindre le haut de la crypte et l'épithélium de surface qui arbore les cellules différenciées décrites pour l'intestin grêle (dans le colon les cellules absorbantes sont appelées colonocytes). Dans l'intestin grêle comme le colon, les gradients d'expression des voies de signalisations WNT, NOTCH et EGF suivent le gradient du statut souche (stemness) tandis que les voies BMP et Hedgehog vont dans le même sens que le gradient de différenciation. Plusieurs types cellulaires sont localisés dans le microenvironnement de l'épithélium : les fibroblastes, les myofibroblastes et les cellules du muscle lisse (smooth muscle cell). Adapté à partir de [21], [22].

Il est important de noter que les gradients d'expression des voies WNT, NOTCH et EGF sont corrélés avec le caractère souche des cellules cryptiques tandis qu'à l'inverse, les voies Hedgehog et Bmp vont dans le sens du gradient de différenciation, croissant vers le haut de l'axe vertical. Nous verrons par la suite que WNT et NOTCH sont en fait responsables de l'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation des CS.

II) Focus sur les voies de signalisation WNT et NOTCH

A) La voie WNT

La voie de signalisation WNT est l'un des acteurs du développement embryonnaire ainsi que du maintien et de l'auto-renouvellement des CS de l'épithélium intestinal adulte [23]. Elle a la propriété de maintenir l'équilibre entre prolifération et différenciation de l'épithélium intestinal [2].

La fixation de la protéine WNT à la protéine membranaire LRP (Lipoprotéine receptor-related) ainsi qu'à la protéine G Frizzled (Fz) active la signalisation cellulaire de la voie canonique WNT [23], [24] (Figure 2). Il s'en suit la translocation de la β-caténine du cytoplasme vers le noyau, qui va former un complexe avec le facteur de transcription TCF4, particulièrement exprimé dans les cryptes intestinales [23], [25]. Ce complexe TCF4/β-caténine se fixe sur l'ADN, au

niveau de l'élément de réponse à la voie WNT (WRE : WNT response element) et active la transcription des gènes cibles de la voie. En l'absence de ligand WNT, la β-caténine est prise en charge par le complexe cytoplasmique de dégradation formé des protéines APC, GSK3β et Axine. Ce complexe va phosphoryler la β-caténine est induire sa destruction [23], [24].

La voie peut être régulée par les protéines antagonistes des ligands WNT : SFRPs (Secreted Frizzled-related Proteins), DKK1 (Dickkopf 1) et WIF1 (WNT Inhibitor Factor 1), des inhibiteurs capables d'empêcher la fixation de WNT à LRP et FZ [23], [24]. Il existe aussi des protéines agonistes de WNT, comme la R-spondine (RSPO) ou LGR5 qui stabilisent le complexe sur WNT/FZ/LRP et stimulent davantage la voie [24].

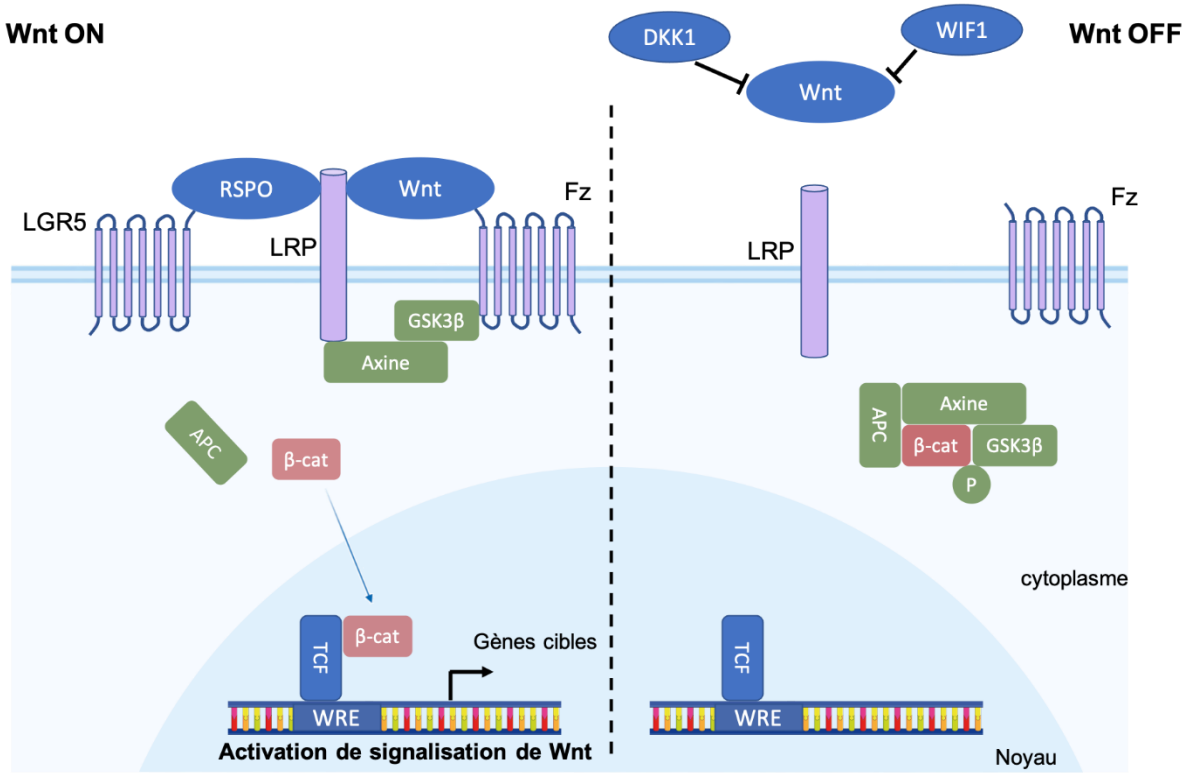


Figure 2 : La voie WNT canonique.
Lors de son activation (WNT ON, à gauche), WNT/LRP/Fz s'associent et capturent l'Axine couplée à GSK3β. La β-caténine, non phosphorylée, reste libre dans le cytoplasme et se transloque dans le noyau pour se fixer à TCF4, activant la transcription des gènes cibles de WNT. LGR5 et la R-spondine (RSPO) sont des agonistes de WNT qui stimule la voie. Dans le cas de la voie inactive (WNT OFF, à droite), LRP et Frizzled (FZ) ne sont pas liées à WNT : La β-caténine interagit avec APC et AXINE, conduisant à sa phosphorylation par GSK3β puis à sa dégradation. Les protéines DKK1 et WIF1 sont des antagonistes de WNT qui inhibent l'activation de la voie.

B) La voie NOTCH

La voie de signalisation NOTCH est impliquée, comme la voie WNT, dans le développement embryonnaire ainsi que dans le maintien des CS intestinales. Elle régule le ratio de différenciation entre le lignage sécrétoire et absorptif en bloquant la différentiation des CS en progéniteurs du lignage sécrétoire [2].

La voie est active lors d'un contact membranaire entre deux cellules (Figure 3) (activation de façon juxtacrine) : une cellule exprime les récepteurs NOTCH (NOTCH1-3) tandis que l'autre exprime les ligands de type Serrate/Jagged (Jag1-2) et de type delta (DLL1-4). Les ligands et récepteurs de NOTCH sont des protéines transmembranaires [2]. Lorsqu'ils forment un

complexe, le domaine intracellulaire de NOTCH (NOTCH Intracellular Domain : NICD) est désolidarisé de la membrane par la γ-sécrétase puis transloqué jusqu'au noyau. Le NICD se fixe alors au facteur de transcription CSL, résultant en l'activation du facteur de transcription HES1 [2], [26]. L'activation de HES1 inhibe MATH1, un régulateur de la différenciation en lignage sécrétoire [27].

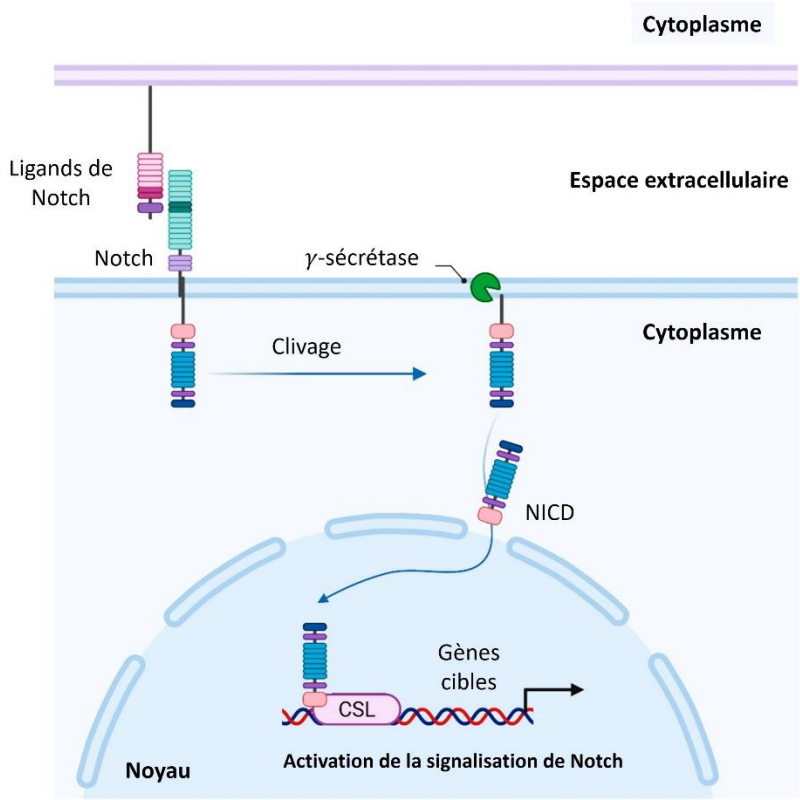


Figure 3 : La voie NOTCH.
La voie NOTCH est activée par l'interaction de ses ligands et récepteurs, exprimés à la membrane de deux cellules voisines. La γ-sécrétase vient alors couper le domaine intracellulaire de la protéine NOTCH NICD, qui, transloqué dans le noyau, se fixe sur le facteur de transcription CSL et active la transcription des gènes cibles. Adapté à partir de [28].

Les voies WNT et NOTCH sont fondamentales au maintien de l'homéostasie intestinale. Leur activité est importante au fond des cryptes et diminue en remontant l'axe vertical, en parallèle avec le gradient du statut « souche ». En conséquence, une dérégulation du niveau d'activité de ces voies de signalisation peut conduire au développement de pathologies telles que le cancer.

III) De l'homéostasie vers le cancer

Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus diagnostiqué au monde (1,93 millions de cas dans le monde en 2020) avec la seconde mortalité la plus élevée (935 000 dans le monde en 2020) [29]. La stratégie principale pour traiter cette pathologie consiste en une résection chirurgicale de la tumeur. L'opération peut être précédée par une radiothérapie pour réduire la masse tumorale. Il existe également des traitements par chimiothérapies (*e.g.* 5-fluoro-uracile, oxaliplatine, irinotécan) et par thérapies ciblées (*e.g.* bévacizumab, cetuximab) [30]. La résistance aux traitements et le risque de rechute des patients rendent le CCR difficile à traiter, ce qui explique un développement important des stratégies de détection précoce par dépistage. Ce cancer représente donc une problématique majeure en santé

publique et dans ce contexte, il est aujourd'hui crucial d'accroître notre compréhension des mécanismes du développement et de l'évolution de ce cancer pour le cibler plus efficacement.

Des avancées ont pu être faites grâce à des analyses visant à caractériser les CCR du point de vue moléculaire. Celles-ci ont montré que les CCR sont très hétérogènes et certaines altérations ont été décrites :

(i) L'instabilité chromosomique (CIN), caractérisée par des pertes récurrentes sur certains bras chromosomiques, conduisant à des pertes d'hétérozygotie, dont certaines sont associées à des mutations conduisant à la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *TP53* et *APC* [31], [32].
(ii) L'instabilité des microsatellites (MSI), caractérisée par l'inactivation de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (système mismatch repair) [32], [33].
(iii) L'instabilité épigénétique (CIMP), à l'origine d'hyper-méthylations des îlots CpG, situés dans la zone promotrice des gènes sont responsables de la perte d'expression de gènes [32], [33].

Plus récemment, les données moléculaires disponibles dans des larges bases de données (*i.e.* la cohorte TCGA) ont permis de différencier quatre sous-types de CCR, avec des caractéristiques moléculaires et des expressions géniques significativement différentes. Il s'agit de la classification « Consensus Molecular Subtypes » (CMS) [1] résumée dans le Tableau 1.

(i) Le CMS1 est caractérisé par la présence d'infiltrats immunitaires et de MSI. Il constitue 14% des CCR.
(ii) Le CMS2, d'origine épithéliale, présente une expression aberrante de WNT et MYC. Il est appelé CMS canonique, c'est le plus fréquent des CCR (37%).
(iii) Le CMS3, dit métabolique, représente 13% des CCR. Il est typique d'une faible CIN et d'un fort taux de CIMP. Il est aussi porteur de mutations de KRAS.
(iv) Enfin, le CMS4, qualifié de mésenchymateux, arbore une forte activation de TGFβ avec de l'invasion stromale et de l'angiogenèse. Il montre de nombreuses altérations du nombre de copie somatique (SCNA) et est souvent à l'origine de formation de métastases. Il constitue 23% des CCR.

On note cependant que 13% des CCR ne montrent pas de signature unique, à cause d'hétérogénéité intra-tumorale ou de transition d'un sous-type moléculaire à l'autre et ne rentrent donc dans aucune des catégories définies selon la classification CMS.

CMS 1 MSI Immun	CMS 2 Canonique	CMS 3 Métabolique	CMS 4 Mésenchymateux
14 %	37 %	13 %	23 %
MSI, CIMP +, hypermutation	SCNA +	MSI, SCNA - , CIMP -	SCNA +
Mutations *BRAF*		Mutations *KRAS*	
Activation et infiltration immunitaire	Activation de WNT et MYC	Dérégulation métabolique	Infiltration stromale, Activation de TGFβ, angiogenèse

Tableau 1 : Caractérisation des sous-types de CCR selon la classification CMS.

Cette taxonomie, proposée par Guinney et al., différencie quatre sous-types moléculaires de CCR : (i) MSI immun, (ii) canonique, (iii) métabolique, (iv) mésenchymateux. Table adaptée à partir de [1].

L'altération par mutations (*i.e.* activation d'oncogènes ou inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs) de l'activité des différentes voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules des cryptes [2], [15] contribue à l'initiation et/ou à la progression tumorale [34] (Figure 4). Plus particulièrement, une activation aberrante de la voie WNT dans les CS exprimant le marqueur Lgr5 est suffisante pour promouvoir leur conversion en CS cancéreuses (CSC) [35]. Cependant, la progression tumorale à partir de CSC nécessite l'accumulation de diverses mutations dans des oncogènes (*K-RAS*, *TGF-β*) et/ou des gènes suppresseurs de tumeurs (*TP53*, *APC*) [31].

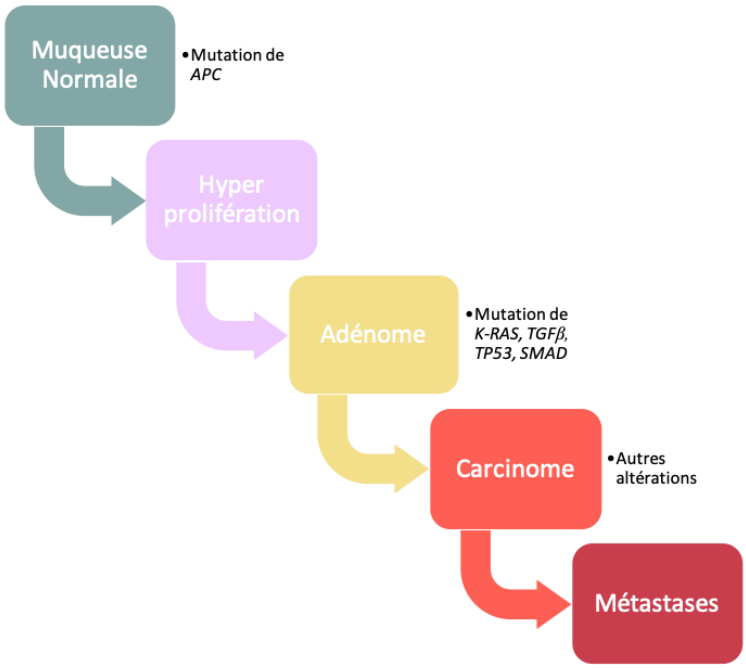


Figure 4 : La progression du cancer colorectal.
La perte de fonction du gène suppresseur de tumeurs APC est à l'origine de l'hyper prolifération des cryptes. Par la suite, il peut se former un adénome qui deviendra un carcinome, par exemple en cas de mutation de K-RAS, TGFβ, TP53 ou SMAD. Dans le cas d'apparition de nouvelles altérations encore non définies, le carcinome sera à l'origine de la dissémination métastatique. Adapté à partir de [31], [36].

En plus de ces voies classiquement définies, d'autres signaux jouent un rôle important dans la physiopathologie intestinale. Notre équipe étudie depuis plusieurs années la signalisation par les hormones thyroïdiennes (HT) et leur récepteur nucléaire TRα1 dans le développement, l'homéostasie et la tumorigenèse intestinale (*pour revue, voir* [4], [36]).

IV) Les hormones thyroïdiennes et leurs récepteurs en physiopathologie intestinale

A) En condition physiologique

La synthèse des hormones thyroïdiennes (HT) est régulée par l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde et repose sur un principe de boucles de rétrocontrôle [36]. L'hypothalamus sécrète de la Thyrotropin-Realising Hormone (TRH) dans le système hypothalamo-hypophysaire qui stimule l'expression et la sécrétion de la Thyroid Stimulating Hormone (TSH) par l'hypophyse [37]. La TSH est ensuite sécrétée dans le sang et va se fixer sur ses récepteurs au niveau de la glande thyroïde [37], entrainant la production et sécrétion des HT [38] (Figure 5).

La forme majoritaire circulante des HT est la L-thyroxine (T4), qui est ensuite convertie dans sa forme active 3,5,3'-L-triiodothyronine (T3) grâce aux enzymes déiodinases présentes dans les organes périphériques tels que le foie, les muscles et les reins [36]. L'augmentation de T4 et T3 dans le sang inhibe l'expression de TRH et de TSH, ce qui engendre une renormalisation du taux de HT [37].

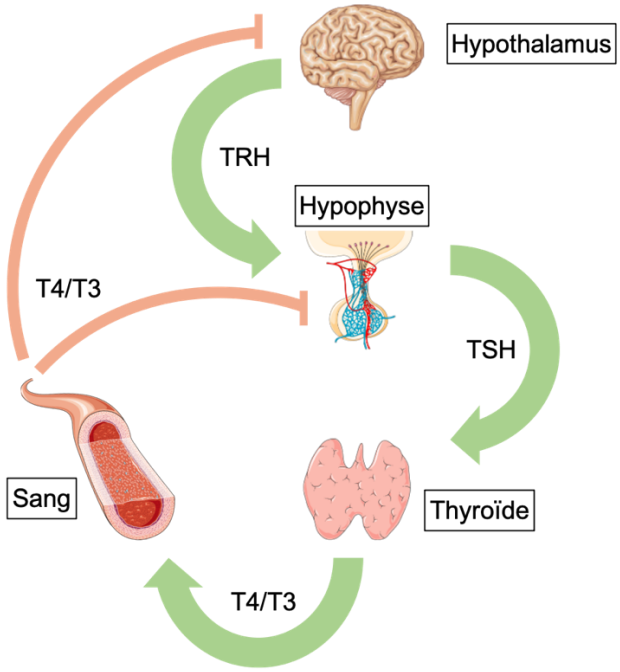


Figure 5 : Le rétrocontrôle de production des hormones thyroïdiennes.
L'hypothalamus produit la Thyrotropin-Realising Hormone (TRH) qui va stimuler l'hypophyse. Celle-ci sécrète alors de la Thyroid Stimulating Hormone (TSH) qui cible la glande thyroïdienne. Les hormones thyroïdiennes T4 et T3 sont alors relarguées en systémique. Par la circulation sanguine, T4/T3 inhibent la stimulation de l'hypothalamus et de l'hypophyse. Adapté à partir de [36], créé avec des images libres de droit issues de Smart.servier.com.

Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR) sont des facteurs de transcription qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires d'hormones [39] et sont constitués de (i) un domaine de fixation à l'ADN (DBD), (ii) un domaine de fixation de l'hormone T3 (LBD) (Figure 6) [36], [40]. Il existe deux gènes codant pour les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, *THRA*/*Thra* et *THRB*/*Thrb,* chacun produisant différentes isoformes protéiques (*i.e.* TRα1, TRα2, TRΔα1, TRΔα2 et TRβ1, TRβ2) [41] par utilisation de divers promoteurs et/ou par épissage alternatif [42].

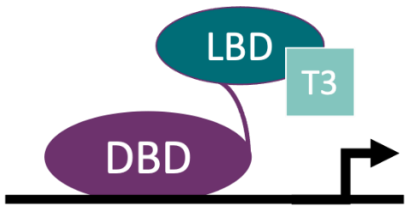


Figure 6 : Schématisation du récepteur des hormones thyroïdiennes.
Composé d'un domaine de liaison à la T3 (LBD) et d'un domaine de liaison à l'ADN (DBD), pour un gène positivement régulé par la T3, la fixation du ligand active la transcription.

TRα est exprimé dans le cœur, le système nerveux central, les muscles lisses, les os et les intestins tandis que TRβ est exprimé dans les reins et le foie [43]. Des travaux d'inactivation

des gènes *Thra* et *Thrb* chez la souris, ont permis d'étudier leurs rôles respectifs. *Thra* est majoritairement impliqué dans la régulation du développement et du maintien de l'homéostasie des organes où il est exprimé [43]. *Thrb*, quant à lui, participe à la régulation de la production des HT *via* la boucle de rétrocontrôle du système hypothalamo-hypophysaire [44].

Les hormones thyroïdiennes, particulièrement la T3, jouent un rôle essentiel dans le métabolisme et la physiologie des organes [45]. Plus précisément, l'importance de la T3 a été montrée lors de la formation du tractus intestinal au cours du développement post-natal. Ces études, menées d'abord chez l'amphibien [45], [46], ont été mises en corrélation avec le développement des mammifères, notamment chez la souris [5], [36], [45]. Il apparait qu'un pic du niveau de T3 circulante au cours du développement est associé à un important remodelage de l'épithélium intestinal (Figure 7). Ce remodelage coïncide avec le changement d'alimentation chez l'amphibien, qui passe d'herbivore à carnivore, et chez le mammifère, qui subit le sevrage en fin de période d'allaitement et entame une alimentation solide.

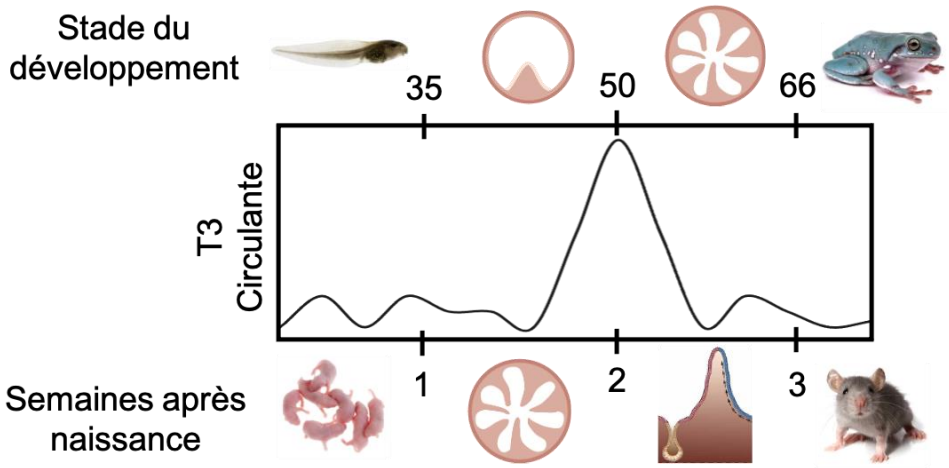


Figure 7 : L'évolution du taux circulant de HT joue un rôle dans le développement du tractus intestinal des amphibiens et des mammifères.
Chez l'amphibien comme le mammifère, le tractus intestinal connait un important remodelage au cours du développement postnatal. Cette restructuration est synchronisée avec une forte augmentation de la quantité de HT dans le sang. Adapté à partir de [36], créé avec des images libres de droit issues de Smart.servier.com et Shutterstock.com.

Ce rôle dans le remodelage de l'épithélium serait corrélé avec l'implication des HT et des TR dans la biologie des cellules souches. En effet, cela a été démontré depuis plusieurs années chez l'amphibien [47] et plus récemment chez la souris [6]. L'injection en intrapéritonéale de T3 dans des souris C57BL/6 induit une stimulation de la prolifération épithéliale en plus de l'augmentation du nombre de CS (Figure 8). En parallèle, le gain de fonction de TRα1 chez le modèle murin *vil*-TRα1 (caractérisé par l'expression de TRα1 tout au long de l'axe crypte-villosité et crypte-épithélium de surface) montre des résultats similaires, avec une hyper-prolifération cryptique induite par un niveau plus élevé de TRα1 et un nombre plus important de CS (Figure 8). A l'inverse, la perte de l'expression de TRα1 dans les souris TR$\alpha^{0/0}$ est associée à un nombre réduit de CS et de cellules en prolifération (Figure 8).

De manière plus générale, il a aussi été montré que le gradient d'expression de TRα1 suit les gradients du statut souche et d'activité des voies WNT et NOTCH [7], [8] (Figure 8). Il est alors

clair que la T3 *via* TRα1 a non seulement un impact sur le développement de l'épithélium intestinal mais aussi dans le maintien de son homéostasie chez l'adulte.

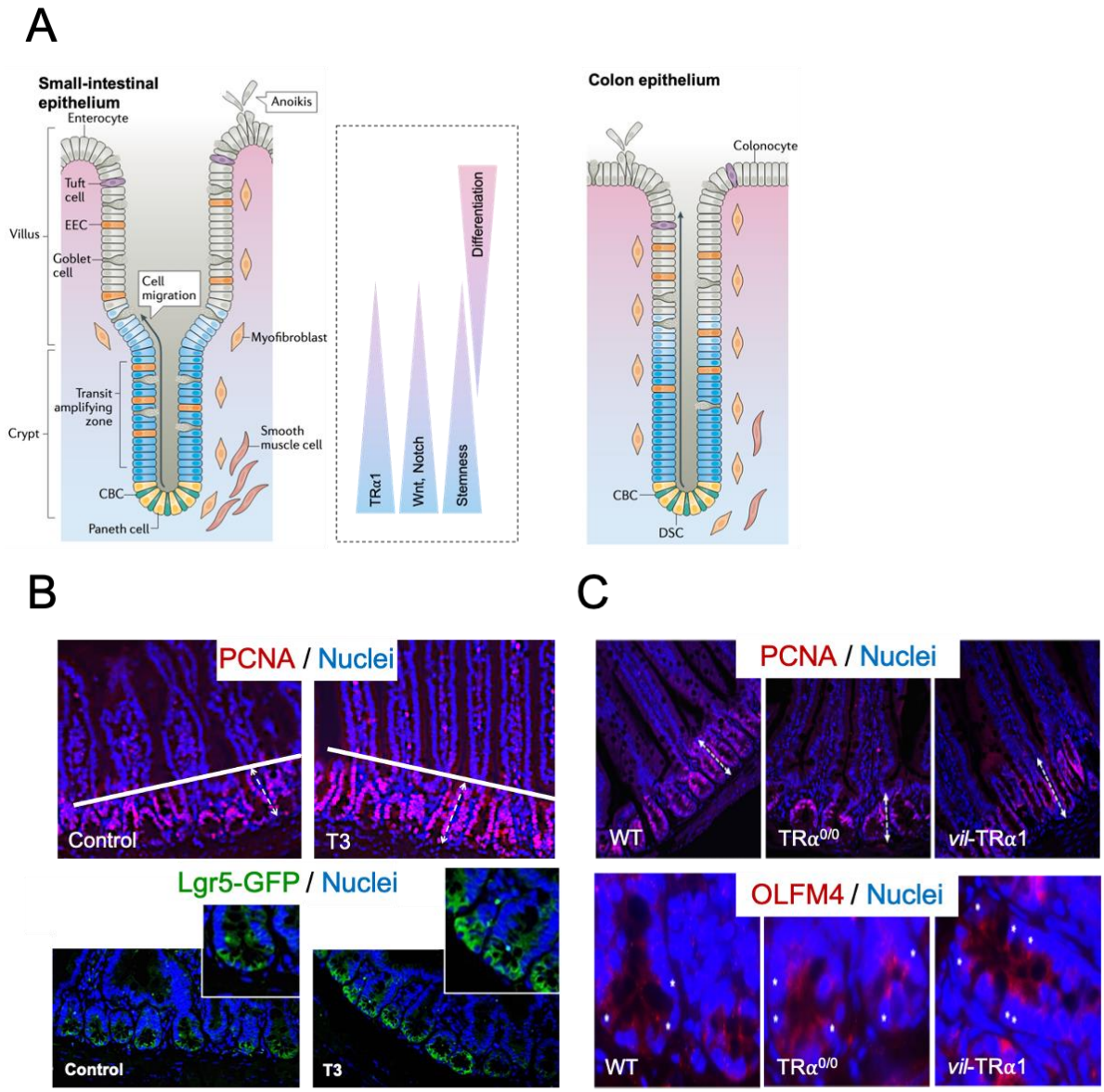


Figure 8 : La modulation d'expression de TRα1 ou un traitement à la T3 a un impact sur la structure des cryptes murines. (A) Dans l'intestin grêle comme le colon, le niveau d'expression de TRα1 suit les gradients d'activité des voies WNT et NOTCH ainsi que le potentiel souche. Ils sont inversés par rapport au gradient de différenciation. (B) Un traitement par injection de T3 conduit à l'augmentation de la longueur des cryptes et de la quantité de cellules proliférantes (PCNA en magenta) ainsi que du nombre de CS exprimant Lgr5 (en vert, souris Lgr5-GFP). (C) En parallèle, la surexpression de TRα1 dans les cellules épithéliales intestinales (souris vil-TRα1) conduit à une hyper prolifération des cellules dans les cryptes (marqueurs de prolifération PCNA en magenta, noyaux en bleu) et une augmentation du nombre de cellules exprimant le marqueur de CS OLFM4 (en rouge) et à l'inverse de la perte d'expression de ce marqueur lors de l'inactivation de TRα1 (souris TRα$^{0/0}$). Adapté à partir de [6].

En résumant :

(i) La modulation de la voie NOTCH, impliquée dans le maintien des CS et dans la régulation du lignage cellulaire, a été directement corrélée de manière positive aux HT *via* la régulation directe de la transcription de *Jag1* par TRα1 [7]. Indirectement, les HT par TRα1 régulent l'expression de *NOTCH1*, *Dll1* et *Dll4*.

(ii) TRα1 module l'expression des gènes de la voie WNT contrôlant la prolifération [48], [49]. Parmi les gènes régulés directement par TRα1 on peut mentionner

Ctnnb1, codant pour la β-caténine, et *Sfrp2*, codant pour un modulateur de la voie WNT [48], [49].

(iii) La stimulation des activité des voies WNT et NOTCH par les HT *via* TRα1 contrôle le nombre et l'activité des CS [6] ;

(iv) De manière intéressante, les animaux surexprimant TRα1 dans l'épithélium intestinal (modèle murin *vil*-TRα1) ont une prolifération augmentée et une voie WNT activée [50]. Cela est dû à l'augmentation de l'expression et de la stabilisation de β-caténine provoquant l'hyper prolifération des cellules des cryptes (Figure 9).

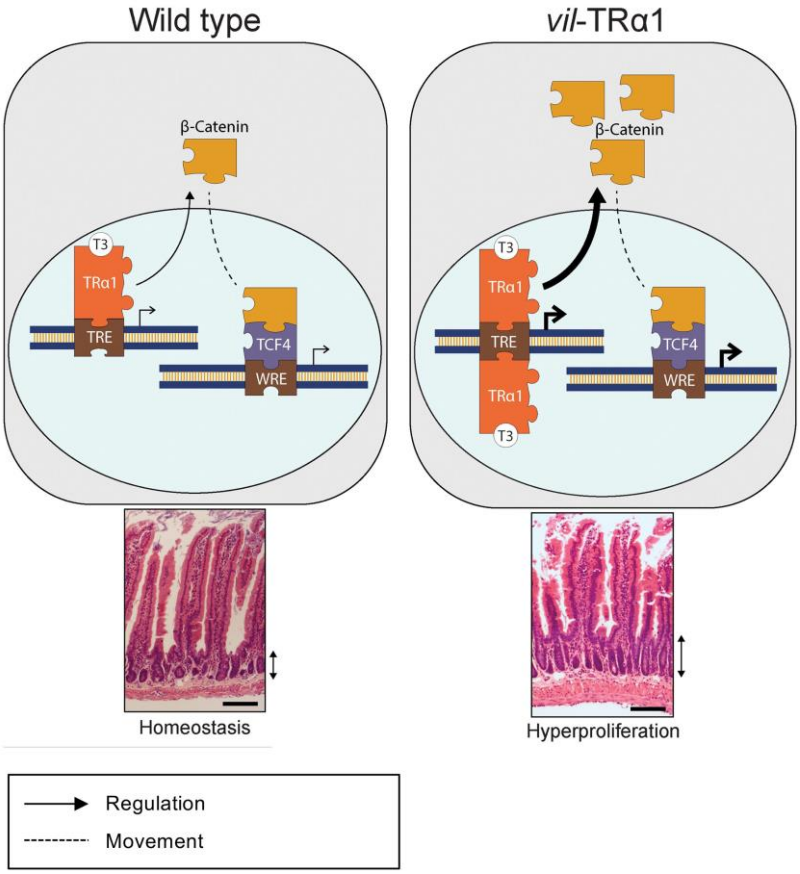


Figure 9 : Proposition de la régulation croisée entre la voie WNT et TRα1.
En condition d'homéostasie (wild type, à gauche), le complexe TRα1/T3 se fixe sur l'élément de réponse TRE, induisant la transcription de la ß-caténine et l'augmentation de son expression. Elle est ensuite accumulée dans le cytoplasme puis transloquée dans le noyau, formant un complexe avec le TCF4 sur le site de réponse à WNT (WRE). Par conséquent, le complexe active la transcription des gènes cibles de WNT. Dans le contexte d'une surexpression de TRα1 (modèle murin vil-TRα1, à droite), une plus grande quantité de complexe TRα1/T3 se fixe sur le TRE ; la production de ß-caténine est alors augmentée par rapport à la situation physiologique. En conséquence, la stimulation du WRE est plus forte et donc la transcription des gènes cibles de WNT plus conséquente : une hyperplasie des cryptes se développe. Adapté à partir de [51].

Ces différents résultats ont amené tout logiquement à étudier l'impact de la surexpression de TRα1 dans un contexte tumoral. En effet, la stimulation de la prolifération et l'altération des voies WNT et NOTCH est un évènement précoce du développement tumoral [52], [53]. Cette problématique a donc été également abordée (Figure 9) [50], comme décrit dans la prochaine section.

B) En condition pathologique : le cancer colorectal

Pour approfondir nos connaissances sur la progression du CCR et considérant que TRα1 et les voies WNT et NOTCH sont fonctionnellement liées, des études sur le modèle murin ont été

mises en œuvre. Elles ont permis de prouver que la surexpression de TRα1 (modèle murin *vil*-TRα1) a un effet synergique sur la tumorigenèse intestinale initiée par la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *Apc* (souris *vil*-TRα1/*Apc* [50]). A l'inverse, l'inhibition de l'expression de TRα1 dans ce même contexte de mutation du gène *Apc* (souris TR$\alpha^{0/0}$/*Apc*) [8] montre l'effet opposé, en réduisant la prolifération des cellules des cryptes et la tumorigénèse. L'origine de cette coopération entre l'augmentation du niveau d'expression de TRα1 et la perte de fonction d'*Apc* repose également, du moins en partie, sur l'interaction fonctionnelle entre TRα1 et les co-facteurs de la voie WNT (β-caténine/TCF4) [51] (Figure 9), eux-mêmes impliqués dans la régulation directe de la transcription de TRα1 [4].

Finalement, l'analyse de cohortes de patients a permis de prouver que le gène *THRA* est généralement surexprimé dans les CCR (cohorte TCGA) et ce en corrélation avec l'augmentation de l'activité de la voie WNT [8] (Figure 10).

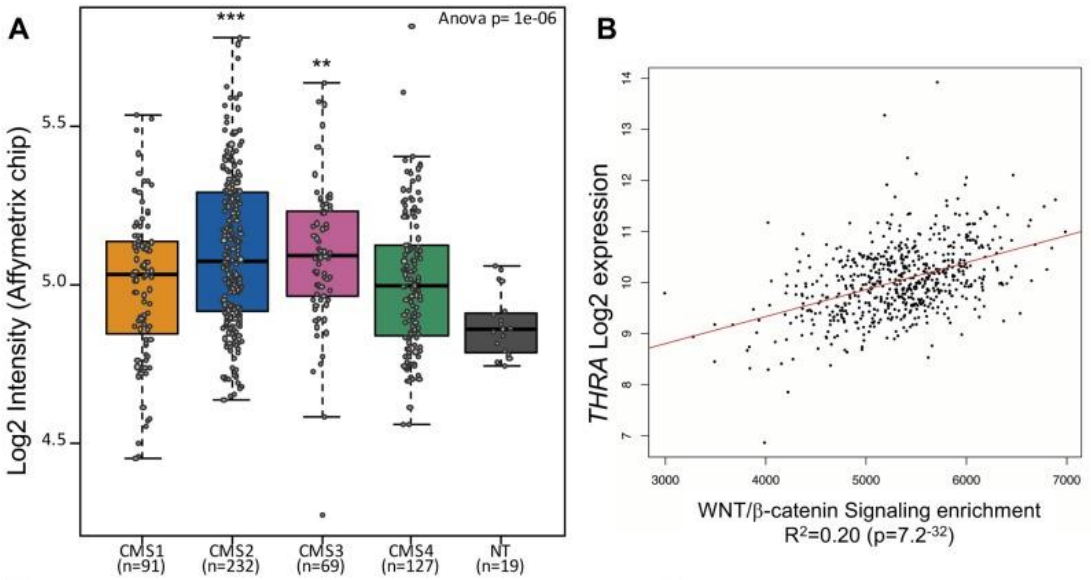


Figure 10 : L'expression de THRA dans des cohortes de patients et sa corrélation avec l'activité de la voie WNT.
(A) Par rapport aux parties saines (normal tissue, NT), le niveau d'expression de THRA est plus élevé dans les CCR. De plus, ce niveau est variable d'un sous-type moléculaire (CMS : Consensus Molecular System) à un autre. Le niveau d'expression de THRA est significativement plus important dans les CMS2 et CMS3 correspondant respectivement aux sous-types canonique et métabolique de CCR. (B) Il existe une corrélation significative entre l'augmentation du niveau d'expression de THRA et l'augmentation de l'activité de la voie WNT/β-caténine. Adapté à partir de [8].

L'analyse détaillée des mécanismes responsables de l'accélération du processus oncogénique induit par TRα1 et l'évaluation des répercussions chez les patients montrent que la signature moléculaire des tumeurs murines surexprimant TRα1 incluent des gènes des voies WNT, NOTCH et des marqueurs des CS [8].

Pour mieux définir la corrélation, très significative, entre TRα1 et l'activité WNT, le modèle tumoral murin *vil*-TRα1/Apc (caractérisé par l'expression de TRα1 dans tout l'axe crypte-villosité/épithélium de surface avec perte de fonction du gène *Apc*) a été utilisé. Chez ces animaux, la surexpression de TRα1 induit une forte accumulation et la stabilisation de la β-caténine dans le cytoplasme. Une quantité de β-caténine, plus importante qu'en condition normale, est ainsi transloquée dans le noyau. En conséquence, un nombre élevé de complexes β-caténine/TCF4 viennent se fixer sur le WRE (élément de réponse à WNT) et activer la transcription des gènes cibles de la voie WNT [51]. De plus, comme montré pour d'autres

récepteurs nucléaires d'hormones appartenant à la même famille protéique des TR [54], [55], TRα1 stabiliserait le complexe TCF4/β-caténine, accentuant davantage l'activité de la voie WNT (Figure 11) [51].

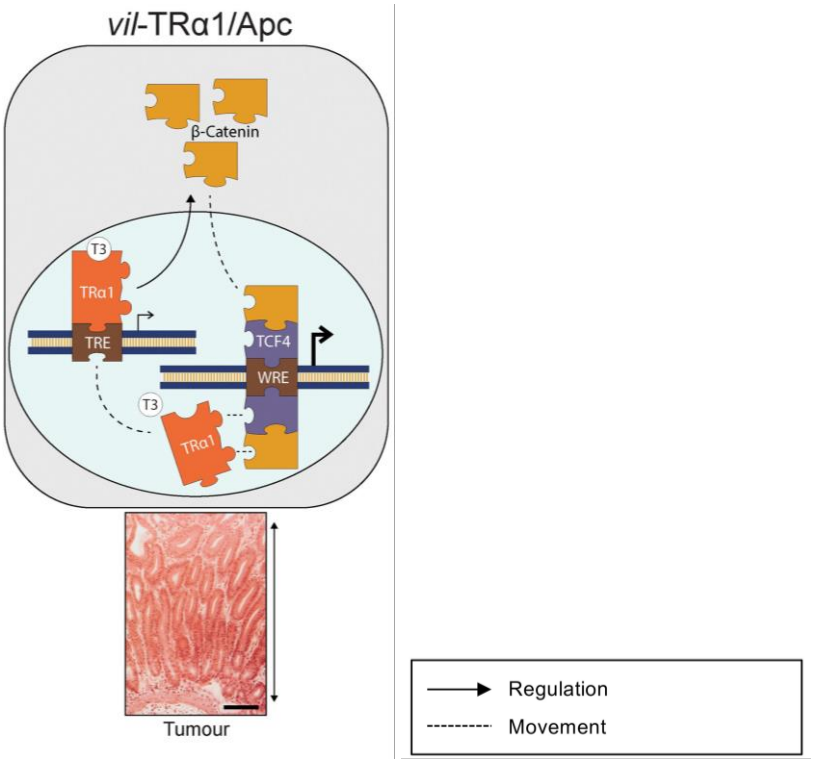
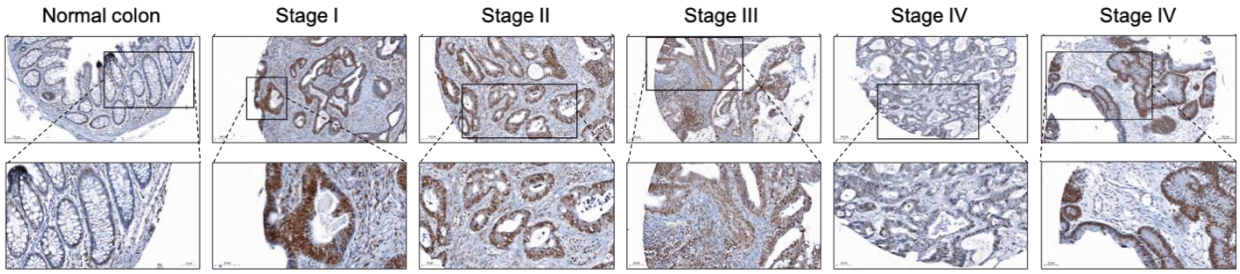


Figure 11 : Proposition de la régulation croisée entre la voie WNT et TRα1 dans un contexte tumoral.
Dans le cas d'une surexpression de TRα1 couplée à une perte d'expression du gène suppresseur de tumeur Apc (modèle murin vil-TRα1/Apc), le complexe TRα1/T3 se fixe sur l'élément de réponse TRE, induisant la production de β-caténine qui forme un complexe avec le TCF4 et active et la transcription des gènes cibles de WNT. De plus TRα1 serait déplacé des sites TRE et formerait des complexes avec TCF4/β-caténine en les stabilisant. Cette interaction fonctionnelle et les régulations croisées qui en résultent induisent l'accélération du processus tumoral stimulé par TRα1. Adapté à partir de [51].

Comme montré précédemment, l'initiation et la progression du CCR sont causées par différents mécanismes moléculaires [1], [31] (Figure 4, Tableau 1). Les travaux de notre équipe ont montré que la surexpression de TRα1 dans des souris mutantes *Apc* (*vil*-TRα1/*Apc*), constitue un facteur facilitant le développement et la progression tumorale. Dans ce cadre, TRα1 participerait aux évènements moléculaires conduisant à la transition d'un épithélium normal en adénome et d'adénome en carcinome, dont les mécanismes sont activement étudiés dans notre équipe (Figure 4). Toutefois, il a également été mis en avant que, bien que le niveau d'expression de TRα1 dans les tumeurs de patients soit plus élevé que celui dans les parties saines, ce niveau reste hétérogène d'un CMS à l'autre. De plus, une grande hétérogénéité intra- et inter-tumorale a aussi été montrée récemment dans des CCR de différents stades [4] (Figure 12).



Tumor		++	++	++	+	++
Normal	+/-					
Stroma	+/-	++	++	+	+	++
Immune				++		

Figure 12 : L'expression de TRα1 est hétérogène dans les CCR de différents stades.
L'analyse en immuno-histologie (Tissue macro-array) a permis d'analyser la localisation et le niveau d'expression de TRα1 (en marron) dans le colon normal ou les CCR. A noter une expression forte mais hétérogène de TRa1 dans les CCR de divers stades au niveau de la tumeur et dans le stroma (stade I, II, III, IV, ou dans de l'infiltrat immunitaire stade III). La localisation et le niveau d'expression sont résumés pour chaque condition dans le tableau en dessous de chaque champ optique (noyaux en bleu). Adapté à partir de [4].

V) L'hétérogénéité du cancer colorectal et nouvelles méthodes d'études

A) L'hétérogénéité intra-tumorale

Il est généralement admis que le CCR est initié par un dysfonctionnement des CS, provoquant leur transformation en CSC ou en cellules initiatrices de tumeurs (CIT) [2], [3]. Non seulement les CSC représentent le contingent cellulaire responsable du maintien tumoral et de la progression métastatique, mais elles sont également à l'origine des résistances aux traitements et donc des rechutes [3], [56], [57].

De plus, des processus de dédifférenciation et/ou transdifférenciation ont été décrits. Ceux-ci permettraient à des cellules engagées ou différenciées de retrouver un phénotype CS et CSC, stimulant ainsi la plasticité et la diversité intra-tumorale [10], [58]–[60]. Cette notion de plasticité cellulaire doit donc être intégrée dans le scenario complexe de la biologie des tumeurs et des CIT. En effet, ces observations soutiennent l'idée que les mutations au niveau des CS et des CS-like, ainsi que le dérèglement des interactions entre l'épithélium intestinal et son microenvironnement, sont à la base de la séquence pathologique responsable du développement tumoral.

Des travaux de suivi de lignages cellulaires dans les tumeurs ont également montré la présence de plusieurs types cellulaires, très hétérogènes, avec plusieurs profils prolifératifs, persistants et résistants aux traitements [11]. De manière surprenante, dans des modèles de xénogreffes de tumoroïdes humains dans des souris, les différents phénotypes cellulaires observés ne présentent pas d'hétérogénéité génétique [9], [11]. Leur origine serait donc commune et leur apparition due à une modification phénotypique plutôt qu'à des mutations dans le génome. Les différents profils observés peuvent être résumés selon la classification suivante : (i) statut d'auto-renouvèlement et maintien à long terme, (ii) amplification transitoire de la tumeur, (iii) contribution tardive après un traitement [9], [11]. Cette répartition sous-entend différents potentiels « souche » de chaque sous-type cellulaire, avec possiblement des statuts CS actives, facultatives, CIT, progéniteurs ou dédifférenciés. Ce sont ces différents sous-types qui permettraient le maintien et la progression tumorale, justifiant également les échecs fréquents des traitements de la pathologie cancéreuse, notamment les CCR.

Dans ce contexte, comme déjà évoqué précédemment, des études récentes à grande échelle sur des cohortes de patients ont montré que le terme CCR couvre en réalité différents sous-types de cancers caractérisés par des différences dans la nature des altérations cellulaires et moléculaires, dans la réponse aux thérapies et dans la survie globale des patients [1]. Cette complexité indiquerait l'existence de multiples « cellules d'origine » du cancer avec des propriétés différentes (expression génique, sensibilité aux stimuli, *etc.*.) responsables de l'hétérogénéité à la fois intra-tumorale et entre les sous-types de CCR.

De ces nouvelles notions, il en découle qu'il est essentiel d'étudier en détail les différentes CSC et CIT et leurs lignages dans le but de mieux définir les caractéristiques cellulaires et moléculaires de l'hétérogénéité intra- inter-tumorale.

B) Le suivi du lignage cellulaire pour comprendre le cancer

Pour étudier des phénomènes tels que le développement embryonnaire, l'homéostasie des tissus et les pathologies pouvant la rompre, la compréhension des dynamiques de la division cellulaire, du lignage et de l'organisation spatiale est centrale. Les premières études du lignage cellulaire remonte aux années 1990 où beaucoup de travaux ont été effectués en embryologie [61]. A cette époque, les approches étaient essentiellement visuelles par macroscopie et microscopie à basse résolution, dans des organismes adaptés à ces techniques (suffisamment grands et transparents) tel que *C. elegans* [62].

Par la suite, le développement de nouvelles technologies a rendu l'observation plus résolutive, à l'échelle d'un groupe de cellules, voire à une cellule unique. Par exemple, des marquages radioactifs, enzymatiques ou fluorescents directement injectés dans les cellules d'intérêt ont pu être mis en œuvre [61]. Ces techniques représentent les prémices de la cartographie du lignage (fate-mapping) à une résolution unicellulaire. Malheureusement, en plus des contraintes techniques (utilisation de radioactivité, difficulté de précision d'injection dans une seule cellule), ces marquages ne sont pas durables dans le temps et à chaque division cellulaire, l'intensité du signal est diminué par deux [61], [62]. Les avancées technologiques permettent aujourd'hui de contourner ces problématiques ainsi que d'augmenter davantage le pouvoir résolutif.

C) Méthodes prospectives et rétrospectives

A ce jour, deux approches sont applicables à l'étude du suivi du lignage cellulaire. L'une dite « prospective », consiste à suivre un seul marqueur au cours du temps. La stratégie « rétrospective » vise à caractériser plusieurs gènes ou mutations spécifiques qui permettent de déterminer quelles ont été les étapes clés de la diversification des lignages [61], [62].

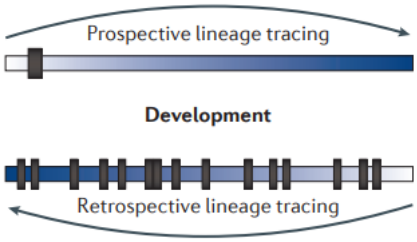


Figure 13 : Les approches "prospective" et "rétrospective" du suivi du lignage cellulaire (lineage tracing).

Dans le cadre de l'approche prospective, un paramètre est suivi au cours du temps, par exemple l'expression d'une protéine fluorescente dans les populations cellulaires. A l'inverse, dans une approche rétrospective, tous les phénomènes moléculaires importants qui ont conduit à l'identité de la cellule d'intérêt sont caractérisés les uns après les autres, en remontant du plus récent vers le plus précoce. Adapté à partir de [61].

D) Méthodes prospectives

Une des techniques de l'approche prospective repose sur la transfection d'un plasmide exprimant un transgène rapporteur. Cette transfection peut être réalisée par lipofection ou électroporation. Le but est de perméabiliser la membrane cellulaire afin de laisser pénétrer le plasmide, sans détruire la cellule hôte [61]. Généralement, l'ADN recombinant utilisé code pour des protéines fluorescentes (Green Fluorescent Protein ou GFP) ou des enzymes (*e.g.* β-galactosidase) [61]. Cette méthode induit un marquage transitoire qui diminue à chaque division cellulaire. Toutefois, il peut être rendu constitutif grâce à la transfection d'un deuxième plasmide porteur d'un système de transposon de l'ADN (Sleeping Beauty, piggyBac) [61]–[64]. Le système transposon fonctionne grâce à une enzyme, la transposase, qui détache la séquence du gène d'intérêt de son plasmide pour l'insérer aléatoirement dans le génome de la cellule hôte. Cependant, l'expression de la transposase n'étant pas constitutive, son efficacité peut diminuer d'une division cellulaire à l'autre.

Le marquage *via* des vecteurs viraux est une autre méthode utilisée pour mettre en place l'étude des lignages cellulaires [61], [62]. Grâce à l'utilisation d'un virus, un ADN recombinant est intégré aléatoirement et constitutivement dans le génome d'une cellule hôte [65]. Par son aspect intégratif constitutif, l'ADN exogène est hérité par tous les descendants d'un hôte infecté. Cette méthode est utilisée pour intégrer des marqueurs fluorescents (GFP, *etc.*) ou enzymatique (β-galactosidase, *etc.*). L'intégration peut être multiple, à différents sites d'insertion, ou répétée dans le même site d'insertion.
Il est possible de réaliser des multiples infections sur la même population cellulaire, conduisant par exemple à l'expression de plusieurs protéines fluorescentes de couleurs différentes par le même hôte infecté : c'est le cas du modèle Lentiviral Gene Onthology (LeGO) rouge-vert-bleu [66].

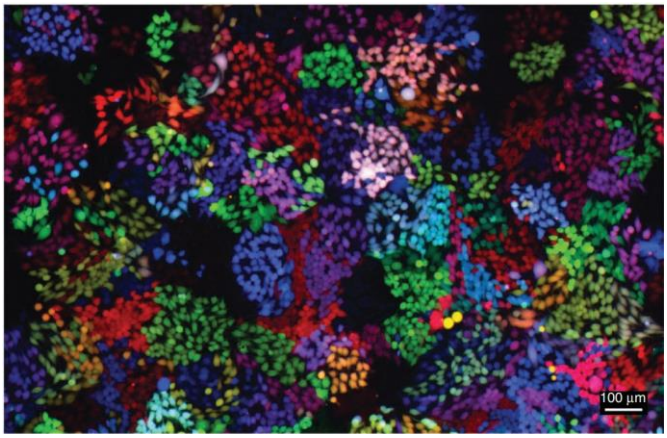


Figure 14 : Le modèle de suivi de lignage LeGO.
Le lignage avec le modèle LeGO consiste en l'infection simultanée de trois vecteurs viraux codant pour l'expression des protéines fluorescentes mCherry (rouge), Venus (vert) et Cerulean (bleu). L'intégration de deux vecteurs conduit à l'émission de couleur jaune (rouge + vert), cyan (bleu + vert) ou magenta (rouge + bleu) tandis que l'intégration des trois vecteurs donne une couleur blanche. Ci-dessus, une population de la lignée cellulaire 293T a été infectée avec le système LeGO. Les cellules sont observées au microscope à fluorescence. Adapté à partir de [66].

L'infection virale permet aussi l'intégration de courtes étiquettes d'ADN appelées code-barres (barcoding) [61], [62], [67]. Pour cela, une librairie de code-barres est artificiellement

synthétisée et ils sont ensuite intégrés aléatoirement au génome des cellules hôtes. L'analyse des code-barres peut être effectuée par PCR [67] et par séquençage à haut débit [68].

Des outils de recombinaison génétiques inductibles ont également été mis au point et sont utilisés dans la mise en œuvre de suivi de lignage. Parmi ces outils moléculaires, on mentionne les technologies CRISPR-Cas9 [69], Cre-ERT$_2$ [70] ou FRT/FLP [71] [61], [62]. Ces méthodes peuvent être mise en place *in vivo* et de manière spécifique à un organe ou une population cellulaire et sont également inductibles. Elles rendent donc possible l'étude ciblée de phénomènes biologiques à l'échelle d'une population réduite (développement ou homéostasie d'un organe, formation de cancer).
Des modèles d'induction de fluorescence aléatoire ont alors vu le jour tel que le Brainbow [72], [73] ou le Confetti [74]. Très proche du modèle LeGO présenté ci-dessus, ils permettent l'expression de plusieurs protéines fluorescentes par les cellules infectées (*in vitro*) ou dans les tissus cibles (*in vivo*). Toutefois, l'avantage majeur de ces modèles réside dans la présence de sites LoxP reconnus par l'enzyme Cre-recombinase, qui permet de recombiner aléatoirement les séquences des protéines fluorescentes (Figure 15). Si une Cre-recombinase inductible est utilisée (Cre-^{ERT2}) [75], la recombinaison peut être effectuée à un temps biologique d'intérêt. De plus, l'induction consistant en une injection de tamoxifène, le niveau de recombinaison est dose-dépendant, ce qui permet de moduler la complexité d'analyse du modèle.

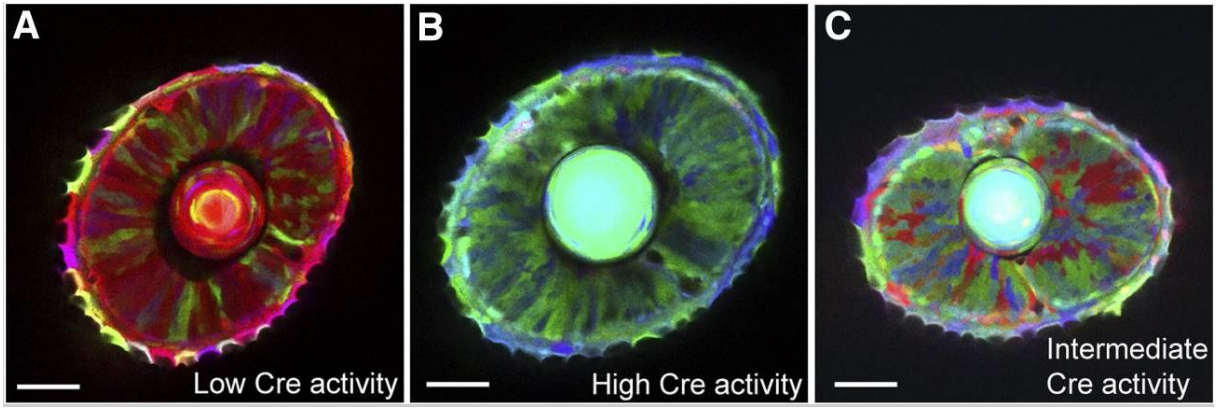


Figure 15 : La modulation de recombinaison du vecteur Brainbow.
Le modèle Brainbow 1.0, mis en place dans l'œil de larve de Zebrafish, montre un niveau de recombinaison variable en fonction de l'activité de la Cre-recombinase. Sans recombinaison, le modèle Brainbow exprime uniquement la protéine fluorescente RFP (rouge). A l'inverse, fortement recombinée, la YFP (vert) est majoritairement exprimée. A un niveau intermédiaire, de la CFP (bleu) et de la YFP sont produites, en plus de la RFP. Adapté à partir de [73].

Dans certains cas, les modèles fluorescents par recombinaison génétique ont été couplés à l'insertion de code-barres, renforçant la résolution d'analyse et générant un plus grand nombre de clones traçables [76].

E) Méthodes rétrospectives

Les méthodes rétrospectives consistent quant à elles essentiellement en des techniques de séquençage de l'ADN à haut débit à une échelle unicellulaire. Elles vont consister en la recherche de mutations somatiques, rares, apparues naturellement comme les « copy-number variants » (CNV), les « single-nucleotides variants » (SNV) ou les microsatellites (MSI). Ces mutations peuvent être recherchées dans des tissus sains ou atteints de pathologies. Appliquée à la cancérologie, ce sont des mutations clés de la cancérogénèse qui peuvent être recherchées (mutation sur le gène *APC, TP53, K-RAS*, *etc.*) ainsi que des marqueurs de cellules

indifférenciées ou de différenciation (marqueurs de CS, CIT, *etc.*). Ces études utilisent les nouvelles techniques de pointe telles que le Next Generation Sequencing (NGS) ou le single cell-RNA sequencing (sc-RNA seq) qui permettent de reconstruire les trajectoires de lignage.

Coupler les méthodes perspectives et rétrospectives permet d'avoir des informations sur le phénotype cellulaire et la répartition spatiale (approche prospective) ainsi que des caractérisations à l'échelle moléculaire (approche rétrospective).

VI) Objectifs du projet

Les études précédentes de notre laboratoire ont mis en évidence le rôle clé de TRα1 dans le contrôle de la biologie des CS/progéniteurs dans les cryptes intestinales *via* la régulation des voies signalétiques WNT, NOTCH et des régulateurs du cycle cellulaire [6], [7], [48]. Elles suggèrent fortement que l'altération de TRα1 participe aux processus pathologiques conduisant à l'initiation et à la progression tumorale, en s'intégrant parfaitement dans le scénario hautement complexe qui relie la plasticité cellulaire et l'hétérogénéité des cancers. En effet, TRα1 peut contrôler la destinée cellulaire *via* une action sur NOTCH [7] et plusieurs travaux indiquent que les HT sont des "multi-tissues reprogrammers" [77], également capables d'induire la transdifférenciation [78], [79]. De plus, l'expression de TRα1 dans les CCR humains est très hétérogène et cette hétérogénéité peut être responsable des résistances aux chimiothérapies (*i.e.* cellules en dormance qui réacquièrent un profil prolifératif après un traitement) [68].

Par conséquent, les objectifs de mon projet ont été de :

- Mettre en place un modèle de suivi de lignage par code-barre fluorescent dans des lignées d'adénocarcinome colique ;
- Définir en détail les propriétés clonales des cellules cancéreuses code-barres exprimant différents niveaux de TRα1 ;
- Mettre en place le même modèle de suivi de lignage dans des cultures d'organoïdes tumoraux humains, afin d'étudier les effets des HT et de TRα1 dans le CCR au niveau de la cellule unique.

VII) Approches expérimentales

Afin d'identifier et de caractériser les différents sous-types cellulaires CSC et/ou CSC-like impliqués dans la biologie des CCR, nous avons mis en place un modèle de code-barres rouge-vert-bleu (RVB) selon le protocole de Weber K. décrit dans Nature Protocol [80]. Cette approche permet le suivi des lignages et d'observer l'apparition et l'évolution de sous-types cellulaires, en définissant le gain, la perte ou la conservation d'un caractère potentiel souche. Les vecteurs Lentiviral Gene Onthology (LeGO) ont permis de produire des particules lentivirales exprimant des protéines fluorescentes Venus (vert), mCherry (rouge) et Cerulean (bleu). L'infection avec ces lentivirus vise à induire l'expression de protéines fluorescentes dans les cellules et représente la première étape de l'établissement du modèle d'analyse de code-barres RVB (Figure 16). L'intégration du transgène dans chaque cellule étant aléatoire, elle permet la création de clones de 7 couleurs différentes. Même au sein d'une même infection avec un seul vecteur, il est possible de différencier plusieurs clones d'intensités de fluorescence différentes et avec des sites d'insertion variables. Ainsi, il est théoriquement possible de créer aléatoirement une infinité de clones RVB pour la mise en place du modèle de code-barres RVB, l'intérêt étant de pouvoir analyser autant de sous-types cellulaires. Les

sites d'insertion des vecteurs peuvent ensuite être localisés par ligation-mediated PCR (LM-PCR) ou par séquençage haut débit (Ins-seq) permettant une caractérisation génomique (code-barres) et fluorescente (RVB) de chaque cellule infectée.

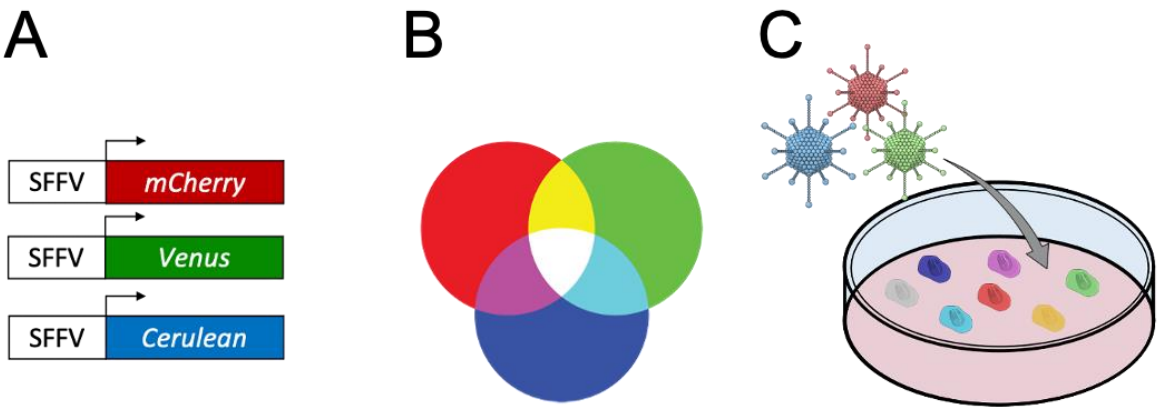


Figure 16 : Principe du modèle de code-barres RVB avec le système LeGO.
(A) Les vecteurs lentiviraux LeGO sont composés d'un promoteur SSFV qui contrôle la transcription des protéines fluorescentes mCherry (rouge), Venus (vert) et Cerulean (bleu). (B) En infectant une culture cellulaire avec le système lentiviral LeGO, il est possible de générer huit populations de couleur rouge, verte ou bleue (dans le cas d'intégration unique du vecteur) ; jaune, cyan ou magenta (dans le cas d'intégration double des vecteurs) ; blanche (dans le cas d'intégration triple des vecteurs) ou non fluorescente (dans le cas d'absence d'intégration de vecteur). Les populations n'ayant pas intégré les vecteurs sont éliminées par un tri cellulaire. (C) Les cultures sont infectées par dilution de la suspension lentivirale dans le milieu de culture.

Pour étudier l'hétérogénéité tumorale dans un modèle simplifié, nous avons développé des lignées cellulaires Caco-2/TC7 à code-barres fluorescentes basées sur l'approche lentivirale LeGO [80]. Elles peuvent ainsi être suivies en fluorescence (microscopie, cytométrie) et par PCR/Ins-seq (site d'insertion), pour des expériences *in vitro* et de xénogreffe.

Pour faire suite au développement des lignées Caco-2/TC7 fluorescentes cultivées en monocouche, l'approche de code-barres RVB a été également appliquée aux tumoroïdes humains permettant les mêmes analyses dans un modèle plus intégré et pertinent en cancérologie humaine.

Matériels et méthodes

I) Culture cellulaire

A) Entretien de lignée cellulaire

Les cellules de la lignée d'adénocarcinome colique humain Caco-2/TC-7 (données par l'équipe de JN. Freund de l'IRFAC, unité Inserm U1113 de Strasbourg) sont cultivées à 37 °C en atmosphère humide 5 % CO_2 dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Dutscher), complémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco) et contenant 4 mM L-alanyl-L-glutamine dipeptide et 100 UI de pénicilline/streptomycine (Pen/Strep) (Gibco) (DMEM complet). Avant que les cellules soient confluentes, elles sont misent en suspension avec 0,05 % trypsine - 0,02 % éthylène diamine acide tétraacétique (Trypsine-EDTA 1X, Gibco) et ensemencées à un ratio de 1:10.

B) Analyse de la prolifération cellulaire : Incucyte

Les analyses avec l'Incucyte (Sartorius) ont été effectuées à l'UMR7021 CNRS (Illkirch Graffenstaden (67)) en collaboration avec le Dr Sophie Martin.

Les mesures de prolifération cellulaire des lignées Caco-2/TC-7 sont effectuées en mesurant l'évolution de la confluence toutes les 4 h, pendant 7 jours (188 h). Pour ce faire, 1000 cellules par puits sont ensemencées dans une plaque 96 puits (Falcon). L'intégralité des puits est photographiée automatiquement par l'appareil permettant de quantifier en temps réel (time-lapse) l'expansion cellulaire. La vitesse de prolifération est estimée en calculant le temps de doublement de population dans la phase de croissance exponentielle.

C) Culture tridimensionnelle de lignée d'adénocarcinome colique en sphéroïdes

Formation des sphéroïdes

La formation et la culture des sphéroïdes s'effectue selon le protocole Giolito V. publié dans JoVE [81] (Figure 17). L'induction de sphères s'effectue dans des plaques 24 puits, chaque puits étant divisé en 1200 micro-puits (AggreWell, StemCell Technology). Les puits sont rincés 2 fois consécutives de la manière suivante : ajout de 500 µL de solution antiadhérente par puits (anti-adherence rinsing solution, Stemcell), suivi d'une centrifugation 5 min à 1200 g et d'un lavage avec 2 mL de milieu DMEM. Du milieu DMEM complet (1 mL) complémenté avec de l'extrait de membrane basale (BME) à 2,5 % (Basement Membrane Extract BME Cultrex R&D, 3432-005-01), est ensuite déposé dans chaque puits avant d'ensemencer les cellules à une concentration de $7{,}2 \times 10^5$ cellules/puits (600 cellules/sphéroïde) pendant 48 h dans une étuve à atmosphère humide (37 °C, 5 % CO_2).

Récolte et maintien

Les sphères sont récoltées par aspiration avec une pipette sérologique de 10 mL et filtrées sur un filtre réversible de 37 µm (Stemcell Technologies, Reversible Strainers) dans un tube conique de 15 mL pour éliminer les débris cellulaires et le milieu de culture. Le filtre est retourné dans un nouveau tube et lavé avec du milieu DMEM complet BME 2,5 %, permettant de récupérer les sphères. Les sphéroïdes sont ensemencés à une concentration de 22 sphéroïdes/cm^2 dans des boîtes de culture de 10 cm de diamètre, dont le fond a été recouvert préalablement (coating) avec de l'agarose 1,5 % dans du DMEM.

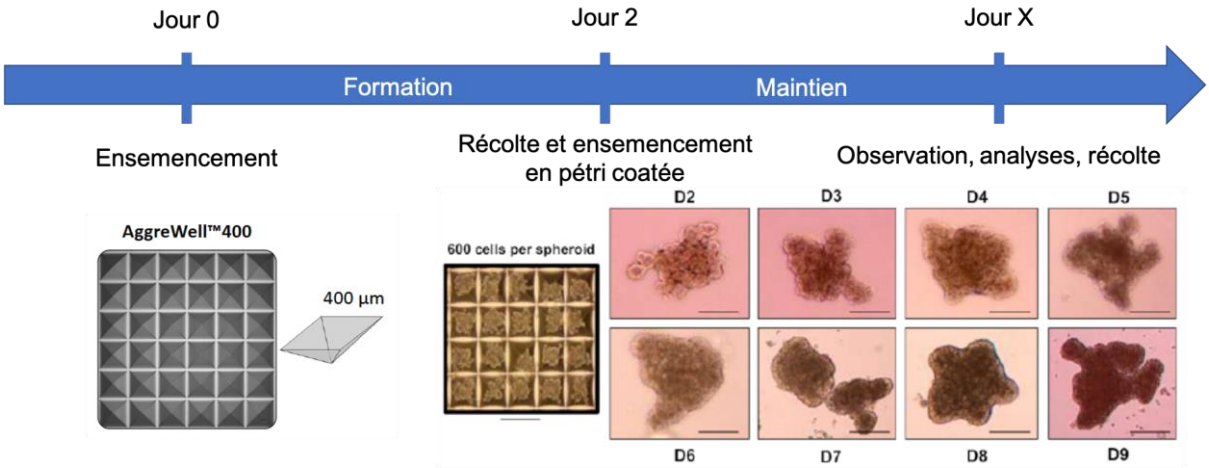


Figure 17 : Formation et maintien de sphéroïdes de la lignée d'adénocarcinome colique humain Caco-2/TC-7 pendant 9 jours. Les sphéroïdes sont formés dans des plaques de culture dont chaque puits est constitué de 1200 micro-puits en forme de pyramide inversée. Chaque micro-puits reçoit 600 cellules. Ce sont les structures pyramidales qui permettent d'induire l'adhésion des cellules entre elles, conduisant à la formation d'agrégats. Après deux jours de culture, les structures tridimensionnelles sont récoltées et peuvent être maintenues dans des boîtes de culture tapissées d'un revêtement anti-adhérent (agarose dilué à 1,5 % dans du milieu de culture). L'image des sphéroïdes en micro-puits est prise au grossissement 4X, échelle = 100 µm, les images des sphères de D2 à D9 sont prises au grossissement 10X, échelle = 30 µm. D, jour de culture.

Dissociation des sphéroïdes

Après récolte et lavage en tampon phosphate salin (PBS) 1X, les sphères sont dissociées par traitement avec 100 µL de TrypLE™ Express 1X (Gibco) (enzyme de remplacement de la trypsine) sur culot sec. La réaction est effectuée pendant 10 min à 37°C sous agitation à 500 rpm. Toujours en présence de TrypLE™, une dissociation mécanique est réalisée par 5 aspirations/rejets avec une pipette de 200 µL, puis l'étape d'incubation est répétée. Vingt aspirations/rejets avec une pipette de 200 µL permettent de finaliser la dissociation. Le surnageant est récolté et filtré (37 µm) puis centrifugé 3 min à 1200 g. Le culot est ensuite lavé avec du PBS 1X et une nouvelle centrifugation est effectuée. Les cellules dissociées peuvent être utilisées pour différentes applications (*e.g.* cytométrie, xénogreffes).

D) Organoïdes coliques tumoraux humains

Les organoïdes tumoraux (tumoroïdes) ont été dérivés de tumeurs humaines par Carla Frau [82]. Une banque cellulaire a été créée, à partir de biopsies provenant de plusieurs patients, en accord avec les règles d'éthique en vigueur (accords # DC-2013-1870 et AC-2013-1871). Pour notre étude nous avons utilisé la lignée de tumoroïdes issue du prélèvement décrit ci-dessous (Tableau 2).

Prélèvement	Grade de différenciation	Classification PTNM	Caractéristiques moléculaires
11/02/2019	Adénocarcinome lieberkünien, peu différencié, après traitement	pT4bN1aL0V0 (Stade 4)	- MSI - Perte d'expression des protéines MLH1 et PMS2 (système de réparation de l'ADN) - Hyperméthylation du promoteur de MLH1 - Mutation BRAFV600E

Tableau 2 : Caractérisation morphologique et moléculaire de la tumeur à l'origine de la mise en culture des tumoroïdes humains.
L'analyse anatomopathologique montre que ce cancer est de stade 4 avec un statut peu différencié. Considérant ses caractéristiques moléculaires (MSI, perte d'expression de gènes du système de réparation de l'ADN, hyperméthylations et mutation BRAFV600E), ce cancer serait de type CMS1 (MSI – Immun).

Entretien

La culture des organoïdes tumoraux humains s'effectue dans des boîtes de culture Ibidi rondes (Clinisciences) à 37 °C, en atmosphère humide avec 5 % de CO_2. Le milieu de culture utilisé est l'Intesticult humain (IntestiCult Organoid Growth Medium, StemCell Technology) complémenté avec 1 % de pénicilline-streptomycine (P/S) (Gibco). Les tumoroïdes étant des structures tridimensionnelles, la culture est réalisée dans des gouttes de Matrigel (Corning Matrigel Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced, phenol red free).

L'ensemble des étapes de repiquage doivent avoir lieu à froid, sur de la glace. Dans un premier temps, le milieu de culture est aspiré, puis 1 mL de solution de récolte des cellules (Matrisperse, Corning) est ajouté par boite. La suspension est transférée dans un tube conique de 15 mL. Après une première étape de centrifugation à 4 °C à 300 g pendant 5 minutes, le culot est repris dans 1 mL de PBS 1X à 4 °C. Quelques aspirations-reflux avec un pipetman P1000 permettent une dissociation mécanique des structures. Du PBS 1X est ajouté (qsp 10 mL) pour terminer le lavage des cellules. Après une seconde centrifugation, le culot est repris dans un volume de BME de sorte à former des dômes de 25 µL. Ce volume est ajusté en fonction du nombre de dômes désirés. Pour former les dômes, les cellules en suspension dans le BME sont déposées en goutte à goutte sur le fond de la boîte préalablement chauffée à 37 °C. Celle-ci est placée à 37 °C en atmosphère humide pendant 10 minutes afin de polymériser le BME avant l'ajout de 1 mL de milieu de culture.

Le milieu de culture est changé tous les deux jours jusqu'au repiquage suivant. Les organoïdes sont repiqués une fois par semaine, mais la vitesse de croissance des cultures pouvant varier, il faut adapter la fréquence des repiquages et/ou la concentration d'ensemencement.

II) Infection aux vecteurs lentiviraux

A) Infection RGB

Caco-2/TC-7

L'infection se fait par utilisation de particules virales issues des vecteurs lentiviraux Lentiviral Gene Ontology (LeGO) (produits par la Plateforme de virologie de l'ENS de Lyon, France).

Les particules virales sont produites à partir de glycoprotéines VSV-G dérivées de HIV-1 [28]. Les protéines fluorescentes choisies pour mettre en place le code-barres rouge/vert/bleu (RVB) sont mCherry, Venus et Cerulean, en accord avec le protocole de Weber K. [28].

Les cellules sont ensemencées à $5{,}0 \times 10^4$ cellules/mL/puits de milieu complet dans une plaque de 12 puits (Falcon). Après adhérence des cellules au support (entre 2 et 5 h), de l'hexadimethrine bromide (polybrene) (SIGMA-ALDRICH) à 8 µg/mL dans du PBS 1X (Dutscher) est ajouté aux cultures pour optimiser l'infection. La culture est ensuite supplémentée en particules virales pour déterminer le titre optimal, à différentes concentrations (Tableau 33) à partir des titres initiaux (mVenus : $2{,}71 \times 10^9$ Unité d'Infection UI/mL, mCherry : $3{,}15 \times 10^9$ UI/mL, mCerulean : $1{,}66 \times 10^9$ UI/mL) pendant 24 h en chambre humide à 37 °C 5 % CO_2. Le

renouvellement du milieu de culture (milieu de culture complet, 1 mL par puits) stoppe l'infection et la culture est maintenue 72 h avant d'être utilisée pour les expérimentations.

	8X	4X	2X	1X	0,50X	0,25X	0,13X
Titre (UI/mL)	$1{,}76\times10^{7}$	$8{,}80\times10^{6}$	$4{,}40\times10^{6}$	$2{,}20\times10^{6}$	$1{,}10\times10^{6}$	$5{,}50\times10^{5}$	$2{,}75\times10^{5}$

Tableau 3 : Dilutions des vecteurs lentiviraux LeGO pour déterminer le titre optimal lors des infections dans la lignée Caco-2/TC-7.
La gamme de dilution est conçue pour encadrer un point de référence (1X) déterminé à partir des travaux de [80] et en diluant d'un facteur 1000 les stocks de particules virales. Elle est composée au total de sept concentrations qui s'étendent de 8 fois plus faible à 8 fois plus forte que le point central.

Tumoroïdes coliques humains

L'infection est réalisée selon la méthode mise au point dans notre équipe [82]. Elle consiste en une dissociation des tumoroïdes comme effectuée en entretien, suivie d'une incubation pendant 1 h à 4 °C sous agitation à 500 rpm des virions dilués dans de l'Intesticult humain complémenté en Y27632 à 10 µM (Dihydrochloride, Stem cell) qsp 100 µL. Le mix est ensuite incubé à 37 °C pendant 4 h en chambre humide à 37 °C 5 % CO_2. Un lavage dans 10 mL de PBS 1X froid suivi d'une centrifugation 5 min à 300 g, 4°C, permet d'arrêter l'infection. Les tumoroïdes infectés sont alors ensemencés comme à l'accoutumée. La fluorescence commence à être visible après 3 jours.

Une gamme d'infection (Tableau 4) a été réalisée à partir du protocole de Frau et al. [82] pour rechercher le titre d'infection optimal. Le titre viral de ce protocole est utilisé comme point de référence (Tableau 4 : 1X) au milieu d'une gamme de dilution qui s'étend d'un titre 10 fois plus dilué (Tableau 4 : 0,1X) à 10 fois plus concentré (Tableau 4 : 10X).

	10X	5X	2,5X	1X	0,5X	0,1X
Titre viral (UI/mL)	$1{,}4 \times 10^{8}$	7×10^{7}	$3{,}5\times 10^{7}$	$1{,}4 \times 10^{7}$	$0{,}7 \times 10^{7}$	$1{,}4 \times 10^{6}$

Tableau 4 : Dilutions des vecteurs lentiviraux LeGO pour déterminer le titre optimal lors des infections des tumoroïdes coliques humains.
La gamme de dilution a été déterminée pour encadrer un point de référence (1X) issu de [82]. Elle s'étend d'une concentration 10 fois plus faible à 10 fois plus forte que la référence.

B) Modulation du niveau d'expression de TRα1

Le niveau d'expression de TRα1 est modulé grâce à des particules lentivirales (Plateforme de virologie, ENS de Lyon) exprimant différents vecteurs pLKO. Le vecteur pLKO-TRα1 permet de sur-exprimer TRα1. Le vecteur pLKO-Sh-TRα1 induit la diminution de son expression (Sh-TRα1 : TAGTCATTCTAACTGCACTTT). Enfin, un vecteur pLKO-Sh-control exprime une séquence nucléotidique non spécifique (Scrambled).

Vecteurs	Titre initial (UI/mL)	Titre final pour 50 000 cellules (UI/mL)	Titre final pour 200 000 cellules (UI/mL)	Titre final pour 500 000 cellules (UI/mL)
pLKO-TRα1 (TRα1-Augmenté)	$5{,}59\times10^{8}$	$7{,}99\times10^{4}$	$7{,}99\times10^{4}$	$7{,}99\times10^{4}$
pLKO-Sh-control (TRα1_Normal)	$1{,}70\times10^{9}$	$6{,}75\times10^{6}$	$6{,}75\times10^{6}$	$6{,}75\times10^{6}$
pLKO-Sh-TRα1 (TRα1_Diminué)	$1{,}35\times10^{9}$	$6{,}75\times10^{6}$	$6{,}75\times10^{6}$	$6{,}75\times10^{6}$

Tableau 5 : Dilutions des vecteurs lentiviraux pour moduler le niveau d'expression de TRα1 dans les lignées Caco-2/TC-7.

Pour effectuer des infections lentivirales avec des efficacités reproductibles, il est important de toujours conserver le même ratio entre la quantité de particules virales utilisée et le nombre de cellules ensemencées. Ce tableau récapitule le titre viral en fonction du nombre de cellules ensemencées, selon les plaques de culture utilisées.

III) Quantification et contrôle de la modulation d'expression de TRα1

A) Expression relative d'ARNm : PCR quantitative (qPCR)

L'ARN total est extrait à l'aide du kit Nucleospin RNA (Machenery-Nagel). Pour éviter la présence d'ADN génomique contaminant (ADNg), une digestion à la DNase est effectuée. La transcription inverse (RT) est réalisée avec la transcriptase inverse iScript (Bio-Rad) avec 1 µg d'ARN total selon les instructions du fabricant. Pour vérifier la pureté des échantillons après la RT, une PCR de contrôle est effectuée dans toutes les préparations, pour amplifier le gène de ménage *PPIB* (100 bp).

Pour les approches qPCR, le SYBR qPCR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara) est utilisé et la réaction a lieu dans un appareil CFX (Bio-Rad). Dans chaque échantillon, l'expression d'ARNm spécifique est quantifiée en utilisant la méthode ΔΔCt et les valeurs sont normalisées par rapport aux niveaux de *PPIB*.

PPIB	**Sens**	ATGATCCAGGGCGGAGACTT
	Anti-sens	GCCCGTAGTGCTTCAGTTTG
TRα1	**Sens**	TGCCTTTAACCTGGATGACAC
	Anti-sens	TCGACTTTCATGTGGAGGAAG

Tableau 6 : Liste des oligonucléotides utilisés pour la qPCR.

B) Expression protéique : Western Blot

Les protéines sont extraites à partir de Caco2/TC-7 à confluence dans des plaques de culture 6 puits (Falcon, 353046) avec 100 µl de tampon RIPA (ThermoFisher) puis avec un sonicateur (Bioruptor® Plus, Diagenode). Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford avec une gamme étalon à la BSA.

Les échantillons de protéines de cellules Caco-2/TC-7 (50 µg par piste) sont séparés par SDS-PAGE et transférés sur des membranes PVDF 0,2 µm (Amersham). Les membranes sont bloquées avec du TBS-Tween (Euromedex) complémenté en lait écrémé à 5% avant incubation avec des anticorps primaires anti-TRα (Abcam, dilution 1/500ème) et anti-actine (Sigma, dilution 1/10 000 ^{ème}). Cette étape est suivie d'une incubation avec des anticorps secondaires conjugués à la HRP (Promega). Le signal est alors analysé à l'aide d'un kit de détection de chimioluminescence enzymatique (LumiLight, Roche) et l'acquisition d'image est réalisée à l'aide d'un système d'imagerie PXi (Syngene) selon le protocole du constructeur.

IV) Xénogreffes

Les travaux avec les animaux ont été réalisés conformément aux normes éthiques de Bien Être Animal, selon la législation française et européenne, sous la demande d'autorisation de projet n°34407. Préalablement aux expérimentations, les animaux ont été acclimatés à leur environnement et habitués à la contention pendant deux semaines. Les expérimentations sont menées sur des souris NOD-Scid femelles (Charles River) âgées de 10 semaines, correspondant à de jeunes adultes.

A) Implantation sous-cutanée de sphéroïdes entiers.

Les implantations sont effectuées sous anesthésie à l'isoflurane (Iso-Vet, Piramal) (Protocole d'induction : 3% d'isoflurane – 2 L/min d'oxygène - Protocole d'entretien au masque : 1,5% d'isoflurane – 0,5 L/min d'oxygène). Les souris sont maintenues sur un tapis chauffant toute la durée de l'anesthésie, jusqu'à leur réveil complet. Avant de débuter la procédure, du Métacam (Boehringer Ingelheim) est injecté en sous-cutané (2 mg/mL, injecté à 5 mg/kg soit 2,5 µL/g) pour prendre en charge la douleur pendant et après expérimentation.

A l'aide d'une aiguille de 18G, une tunnelisation en sous-cutané sur le flanc droit de l'animal permet de créer un espace nécessaire sous la peau pour implanter les sphéroïdes. L'ouverture réalisée est maintenue ouverte avec une pince chirurgicale et 1200 sphéroïdes sont injectés dans 50 µL de Cultrex BME/sérum physiologique (Physiodose, Laboratoire Gilbert) (volume à volume) à l'aide d'un pipetman P200 (pointe stérile utilisée).

Les animaux sont surveillés quotidiennement et un suivi du poids est effectué une fois par semaine. Les greffons sont récupérés 3 mois après l'implantation.

B) Injection sous-cutanée de sphéroïdes dissociés.

Après dissociation de 1200 sphéroïdes, la suspension cellulaire est reprise dans 50 µL de Cultrex BME/sérum physiologique (volume à volume) puis 1,4 x10^6 cellules sont injectées dans le flanc droit de l'animal avec une seringue de 1 mL montée avec aiguille de 23G.

V) Cytométrie en flux et tri cellulaire :

Les analyses par cytométrie en flux et le tri cellulaire sont réalisées à la plateforme de cytométrie de l'IGBMC (Illkirch Graffenstaden (67)).

Pour analyser l'efficacité d'infection au système LeGO RVB, l'analyse est effectuée 7 jours après l'infection lentivirale. Les cellules Caco-2/TC-7 et les tumoroïdes sont dissociés comme lors d'un repiquage, puis repris dans 500 µL de PBS 1X- BSA 1%. Les échantillons sont filtrés avec un filtre de 37 µm pour éliminer les agrégats cellulaires puis passés au cytomètre BD LSR Fortessa X20 (Becton Dickinson). La stratégie de gating est montré en Annexe 1.

Les données sont traitées avec le logiciel Diva. Pour commencer, la proportion de cellules fluorescentes (R et/ou V et/ou B) et déterminée (Figure 18, Flèche n°1). Ensuite, la répartition des populations rouge, vert et bleu au sein de la population fluorescente totale est déterminée. En prenant l'exemple de la population verte (Figure 18, Flèche n°2), celle-ci est composée de cellules mono-infectées Venus, mais également double-infectées (mCherry + Venus = jaune, Cerulean + Venus = cyan) et triple-infectées (mCherry + Cerulean + Venus = blanc). En conséquence, pour obtenir la proportion réelle de cellules seulement vertes, il faut soustraire à la population Venus totale (Figure 18, Flèche n°2), les populations jaune, cyan et blanc (Figure 18, Flèche n°3). La répartition entre les populations vert, rouge, bleu, cyan, magenta, jaune et blanc est déterminée en suivant ce raisonnement.

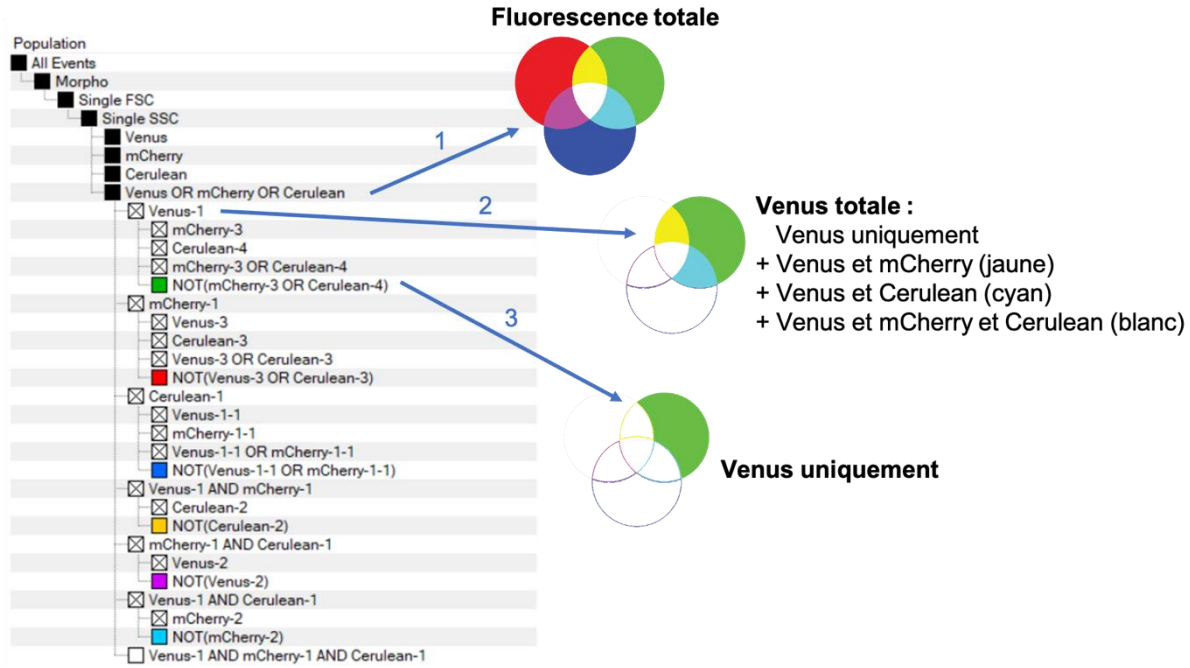


Figure 18 : Stratégie de « gating » et d'analyse des populations cellulaires RVB après infection avec le système LeGO. La quantification en cytométrie en flux de l'efficacité d'infection RVB consiste d'abord à déterminer la proportion totale de cellules fluorescentes dans un échantillon (Fluorescence totale). A partir de cette population, uniquement fluorescente, il est possible de déterminer la proportion de cellules mCherry positives (cellules rouges, magenta, jaunes et blanches), Venus positives (vertes, jaunes, cyan et blanches) et Cerulean positives (bleues, cyan, magenta et blanches). La dissociation des sept combinaisons de fluorescence (rouge, vert, bleu, cyan : bleu + vert, jaune : vert + rouge, magenta : bleu + rouge et blanc : rouge + vert + bleu) est effectuée grâce au principe d'union, intersection et exclusion.

Le tri est réalisé avec un trieur BD FACS Aria Fusion Special Order System. Les Caco-2/TC-7 triées sont récupérées à une cellule par puits dans des plaques de culture 96 puits (Falcon) contenant 100 µL de DMEM + 10 % SVF + 1 % P/S. Les tumoroïdes, quant à eux, sont récupérés dans 1mL d'Intesticult humain + 1 % P/S + Y27632 (10µM). La remise en culture s'effectue ensuite comme décrit dans les procédures d'entretien.

VI) Prélèvement de tumeurs dans les souris xénogreffées et coupes au cryostat

Après la mise à mort des animaux greffés, les tumeurs sont récupérées et fixées pendant 30 min à 4 heures selon leur taille en paraformaldéhyde 4 % (PFA, Electron Microscopy Sciences) à 4°C avant d'être incluses en O.C.T (Tissue Tek, 1402701017). Les sphéroïdes Caco-2/TC-7 sont récoltés en culot sec après avoir été lavés au PBS 1X et sont fixés pendant 30 min en PFA 2 % à 4°C.

Les échantillons sont coupés au cryostat (LEICA CM 3050 S) dans les conditions suivantes :

Température chambre	Température objet	Épaisseur de coupe
-26 °C	-25 °C	8 µm

Tableau 7 : Conditions de coupe au cryostat des inclusions en OCT.

VII) Immunofluorescence sur coupes congelées

L'ensemble des anticorps utilisés ainsi que leurs dilutions sont présentés en Annexe 2.

Les lames sont lavées 3 fois pendant 5 minutes dans du PBS 1X, puis une étape de démasquage antigénique de 30 minutes à température ambiante (TA) est réalisée dans du dodécylsulfate de sodium (SDS) 1% (Euromedex). Cette étape dénature partiellement les protéines et facilite la reconnaissance protéine/anticorps. Une seconde étape de 3 lavages au PBS 1X est réalisée avant la perméabilisation / saturation au PBS 1X – sérum albumine bovine (BSA) 0,25% (Sigma LifeScienc, A2153-100G) - Triton 0,05% (Euromedex, 2000-A) pendant 30 minutes à TA.

Le marquage avec les anticorps primaires est réalisé sur la nuit dans de l'Antibody Diluent (Dako REAL antibody diluant). Le lendemain, après 3 lavages de 5min au PBS 1X, les anticorps secondaires couplés à des fluorochromes sont incubés 1 h à TA. Trois nouveaux lavages PBS permettent de stopper l'incubation des anticorps secondaires puis un marquage de 5 min au DAPI (Sigma, 0,0005mg/mL, dilution 1/20 000) est réalisé. Trois lavages au PBS 1X et un à l'eau distillée précède le montage entre lame et lamelle avec du milieu de montage Invitrogen Prolong Gold antifade reagent (Thermo Scientific). Le milieu de montage est laissé à polymériser pendant au moins 1h à TA. Les lames sont conservées à 4°C.

Certains marqueurs nécessitent une amplification du signal. La préparation des coupes congelées, ainsi que les marquages primaires, sont effectués comme dans les procédures précédentes. Les anticorps secondaires biotinylés sont incubés 30 minutes à TA. Après une étape de lavage, l'amplification du signal est réalisée grâce au kit ABC signal amplification (Thermoscientific, ABC Peroxidase Staining Kit, 32020) 30 minutes à TA. Une autre série de lavages au PBS 1X est réalisée, suivie d'une amplification du signal grâce au TSA-Cy5 Reagent (dilution et référence présentés en Annexe 2) 5 minutes à TA. Il est possible de réaliser des marquages avec des anticorps secondaires non amplifiés à la suite de cette procédure. Après le marquage secondaire, les lames sont incubées avec le DAPI, puis montées entre lame et lamelle comme décrit précédemment.

VIII) Coloration hématoxyline-éosine de Harris :

Les colorations ont été faites sur des coupes congelées d'échantillons inclus en OCT. Trois lavages de 5 minutes en PBS 1X sont réalisés avant d'effectuer la coloration hématoxyline de Harris (Surgipath) pendant 5 minutes. La lame est rincée à l'eau courante 5 minutes (en laissant couler l'eau du robinet). Une différenciation acide (éthanol 96 % + 1 % HCl pur) de 5 secondes est réalisée, puis un nouveau lavage sous l'eau courante de 15 à 20 minutes. On réalise alors la seconde coloration : éosine-érythrosine (éosine 225 R.A.L. 3,125g : érythrosine 239 R.A.L 1,875g ; eau ultra pure qsp 1L) pendant 10 secondes. Un dernier rinçage à l'eau de ville est réalisé jusqu'à ce que la coloration rose disparaisse. La lame est rincée rapidement avec de l'eau distillée et est laissée à sécher 1 heure à TA avant d'être montée avec de la résine Eukitt Neo (Orsatec).

IX) Imagerie

A) Microscope Axiophot

Les lames colorées avec l'hématoxyline-éosine (HE) ont été observées et imagées au laboratoire avec un microscope Axiophot (Zeiss).

B) Microscope à Champ Large

Les observations et l'imagerie des immunofluorescences (IF) sur coupes congelées ont été réalisées à la plateforme de microscopie de l'IGBMC avec un microscope à champ large inversé (Zeiss Cell Observer).

C) Microscope Axiovert

Les observations des cultures cellulaires des Caco-2/TC-7 RVB et des tumoroïdes RVB ont été réalisées au laboratoire avec un microscope inversé à fluorescence Axiovert.A1 (Zeiss). Les propriétés de fluorescence des protéines mCherry, Venus et Cerulean ainsi que les filtres utilisés sont présentés en Annexe 3.

X) Traitement des images et mise en forme des résultats

L'ensemble des images (HE, IF et WB) ont été traitées avec le logiciel Image-J/Fiji.

Le traitement statistique et la mise en forme des données ont été réalisés à l'aide des logiciels Excel et GraphPad Prism. Les données représentées dans les graphiques ont été exprimées sous forme de moyenne et écart-type. Les différences entre plusieurs groupes expérimentaux au sein d'une procédure ont été comparées par un test de Kruskal-Wallis. Les différences entre des groupes deux à deux ont été évaluées par un test de Mann-Whitney. Un test de corrélation de Pearson a permis d'analyser les données recueillies à l'Incucyte et de comparer entre elles les vitesses de prolifération.

Résultats

I) Mise en place des lignées d'adénocarcinome colique humain Caco-2/TC-7 RVB

A) Infection optimale RVB Caco2

Pour développer le modèle LeGO RVB (respectivement rouge, mCherry ; vert, Venus ; bleu, Cerulean) dans les lignées cellulaires Caco-2/TC-7, les premiers travaux ont consisté à titrer l'efficacité de l'infection lentivirale, afin de déterminer le rendement en fonction de la quantité de particules virales utilisée. L'efficacité correspond au rapport entre le nombre de cellules fluorescentes et le nombre total de cellules d'un échantillon infecté. Il a été montré dans des études précédentes que l'efficacité optimale doit être comprise entre 50 et 70 % [80]. Tout d'abord, les cellules Caco-2 sont infectées suivant une gamme de titration composée de sept dilutions. Soixante-douze heures après l'infection, la fluorescence dans le cytoplasme des cellules peut être observée au microscope. En parallèle, l'efficacité d'infection des trois protéines fluorescentes est mesurée par cytométrie en flux à chacun des titres viraux. Cette expérimentation ne nécessite pas de réplicat, puisqu'elle vise à identifier un intervalle de titrations lentivirales dans lequel se trouve le titre d'infection optimale pour chaque préparation de particules virales.

Lors des infections avec les particules lentivirales codantes pour mCherry (Figure 19) l'efficacité s'élève à 35 % au titre le plus dilué $2{,}75x10^5$ UI/mL. L'efficacité augmente ensuite rapidement pour avoisiner 60 % à $5{,}50x10^5$ UI/mL et 80 % à $1{,}10x10^6$ UI/mL. A partir de $2{,}20x10^6$ UI/mL, elle atteint un seuil à 90 % qui reste constant pour tous les titres plus concentrés.

En infectant avec les virions exprimant Venus (Figure 19), la courbe d'efficacité en fonction des titres viraux présente un aspect similaire à celle de mCherry. Ainsi, le titre le plus dilué $2{,}75x10^5$ UI/mL montre une efficacité de 35 %. Toutefois, le deuxième titre, $5{,}50x10^5$ UI/mL, a une efficacité plus faible que mCherry en atteignant à peine 40 %. Ensuite, 70 % d'efficacité sont rapidement atteint à $1{,}10x10^6$ UI/mL et 80 % à $2{,}20x10^6$ UI/mL. Le même plateau que décrit précédemment, s'élevant à 90 % d'efficacité, est finalement rejoint à partir de $4{,}40x10^6$ UI/mL.

Pour finir, la courbe d'efficacité en fonction du titre d'infection pour exprimer Cerulean, présente le même profil qu'avec les autres constructions (Figure 19). Cependant, l'efficacité avoisine déjà 50 % à $2{,}75x10^5$ UI/mL, et atteint 70 % à $5{,}50x10^5$ UI/mL et 80 % à $1{,}10x10^6$ UI/mL. Le seuil à 90 % est atteint à $2{,}20x10^6$ UI/mL. Pour résumer, l'infection avec des virus codants pour Cerulean semble donc plus efficace que pour mCherry et Venus.

	8X	**4X**	**2X**	**1X**	**0,50X**	**0,25X**	**0,13X**
Titre (UI/mL)	$1{,}76x10^7$	$8{,}80x10^6$	$4{,}40x10^6$	$2{,}20x10^6$	$1{,}10x10^6$	$5{,}50x10^5$	$2{,}75x10^5$

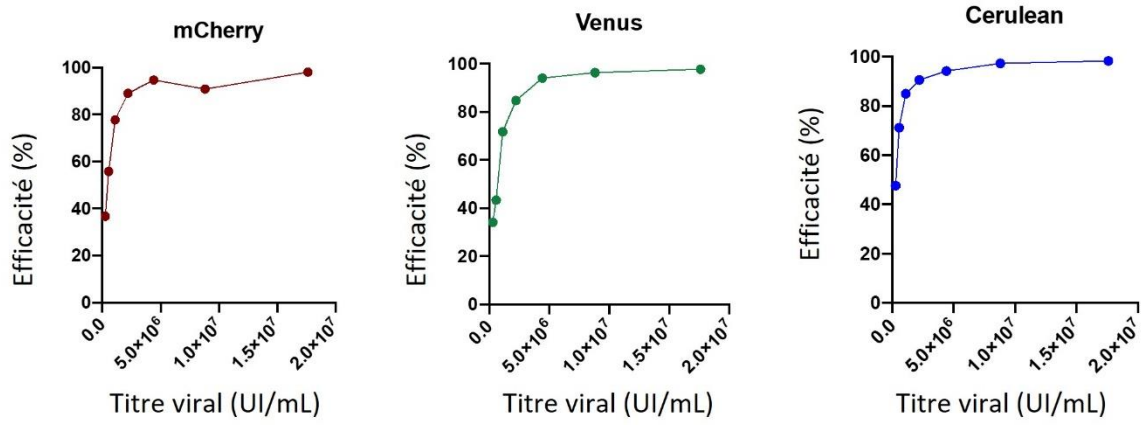


Figure 19 : Détermination de l'efficacité des particules lentivirales codant pour le système LeGO lors de l'infection des cellules Caco-2/TC-7.
L'infection de la lignée d'adénocarcinome colique humain Caco-2/TC-7 avec les particules lentivirales du système LeGO, suivant la gamme de dilution des virions (tableau) montrent en cytométrie en flux une efficacité d'infection qui augmente fortement de 40 à 80 % pour les concentrations les plus basses de la gamme de dilution (de 2,75x10^5 à 1,10x10^6 UI/mL). Aux concentrations supérieures (de 2,20x10^6 à 1,76x10^7 UI/mL), l'efficacité atteint un plateau à 90 %. L'analyse a été effectuée sur 15 000 cellules par condition, trois jours après infection.

Suite à ces premiers résultats, la gamme de dilution est réduite aux points inférieurs à 2,20x10^6 UI/mL et une dilution supplémentaire est ajoutée. Cette nouvelle gamme (Figure 20) s'étend alors de 1,10.10^6 UI/mL à 1,38.10^5 UI/mL et est composée de quatre points avec une dilution d'un facteur deux d'un point à un autre. Comme précédemment, les efficacités sont analysées en cytométrie en flux après trois jours d'infection mais cette fois, elles sont réalisées en tripliquats biologiques.

	0,50X	**0,25X**	**0,13X**	**0,06X**
Titre (UI/mL)	1,10x10^6	5,50x10^5	2,75x10^5	1,38x10^5

Figure 20 : Gamme de dilution restreinte des particules lentivirales codant pour le système LeGO pour infecter les lignées Caco-2/TC-7.

Cette nouvelle infection révèle que, pour les virions induisant l'expression de mCherry, l'efficacité est de 20 % à 1,38x10^5 UI/mL et 2,75x10^5 UI/mL, sans différence significative. Elle atteint 50 % à 5,50.10^5 UI/mL puis augmente jusqu'à 70 % à 1,10x10^6 UI/mL (Figure 21).

Lors de l'infection visant à exprimer Venus, comme avec mCherry l'efficacité s'élève à 20 % à 1,38x10^5 UI/mL. Elle atteint ensuite 50 % à 2,75.10^5 UI/mL puis 70 et 80 % à respectivement 5,50.10^5 UI/mL et 1,10x10^6 UI/mL (Figure 21).

Comme observé précédemment, l'infection pour exprimer Cerulean est plus efficace. En effet, au titre le plus faible 1,38x10^5 UI/mL, elle atteint déjà 40 %, valeur obtenue avec mCherry et Cerulean entre 2,75.10^5 UI/mL et 5,50.10^5 UI/mL. A 2,75.10^5 UI/mL, l'efficacité atteint 70%. Un plateau se forme dès 5,50.10^5 UI/mL à 80% et il n'y a pas de différence significative entre 5,50.10^5 UI/mL et 1,10x10^6 UI/mL (Figure 21).

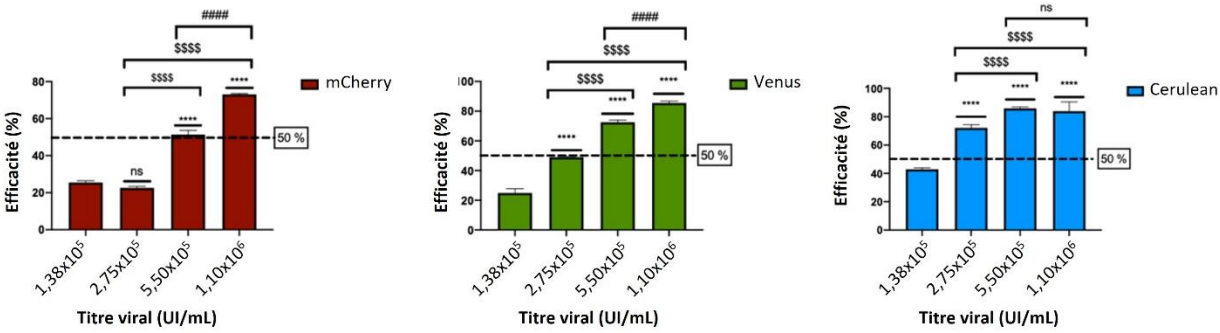


Figure 21 : L'infection des cellules Caco-2/TC-7 avec la gamme de titration restreinte permet de déterminer le titre d'infection optimal pour induire l'expression des protéines RVB dans les cellules.
L'infection des lignées, réalisée en trois réplicats, montre que 50 % d'efficacité est atteint à 5,50x10⁵UI/mL avec mCherry, 2,75x10⁵ UI/mL avec Venus et une valeur comprise entre 1,38x10⁵ et 2,75x10⁵ UI/mL avec Cerulean. Un test statistique de Student non paramétrique permet d'analyser s'il existe des différences significatives entre les titres d'infection, en comparant par rapport au titre 1,38x10⁵ UI/mL (*) ; 2,75x10⁵ UI/mL ($) et 1,10x10⁶ UI/mL (#). (ns) non significatif avec P > 0,05 et (****) P ≤ 0,0001.

Ainsi, des concentrations optimales pour chaque suspension lentivirale ont été retenues, afin de permettre des infections reproductibles des lignées d'adénocarcinome colique humain Caco-2/TC-7. Elles sont choisies de manière à induire une efficacité située entre 50 et 70 %. Ces titres d'infection s'élèvent à 8,25x10^5 UI/mL pour mCherry (valeur médiane entre 5,50x10^5 et 1,10x10^6 UI/mL), 4,13x10^5 UI/mL pour Venus (valeur médiane entre 2,75x10^5 et 5,50x10^5 UI/mL) et 2,07x10^5 UI/mL pour Cerulean (valeur médiane entre 1,38x10^5 et 2,75x10^5 UI/mL).

Toutefois, en considérant que les vecteurs LeGO (carte de vecteurs en Annexe 4) sont identiques et que les trois protéines fluorescentes présentent de grandes homologies de séquence nucléotidique ainsi que de structure protéique, il n'est pas attendu que les titres optimaux soient différents. Des erreurs techniques de titration étant possibles, les titres de chaque suspension virale ont été quantifiés à nouveau par la plateforme de virologie (ENS de Lyon) et les titres optimaux s'élèvent finalement à 2,58x10^5 UI/mL pour mCherry, 2,10x10^5 UI/mL pour Venus et 2,02x10^5 UI/mL pour Cerulean. Ces trois titres, quasiment égaux, confirme la suspicion d'erreur lors de la première titration. Ils sont alors définis comme titre de référence pour infecter les Caco-2.

L'infection simultanée avec les trois virions, aux titres définis précédemment, permet la mise en place de cultures multi-fluorescentes présentant des populations rouges, vertes, bleues dans le cadre d'intégration d'un seul vecteur, mais aussi cyan, jaunes, magenta lors d'une double intégration ou blanches dans le cas d'une triple intégration (Figure 22). Dans le cadre de ce travail, les proportions de différentes populations RVB n'ont pas été quantifiées lors de la triple infection car elle n'a été réalisée qu'en tant que preuve de concept. Les Caco-2/TC-7 pour la suite des expériences ne seront utilisées qu'en mono-infection.

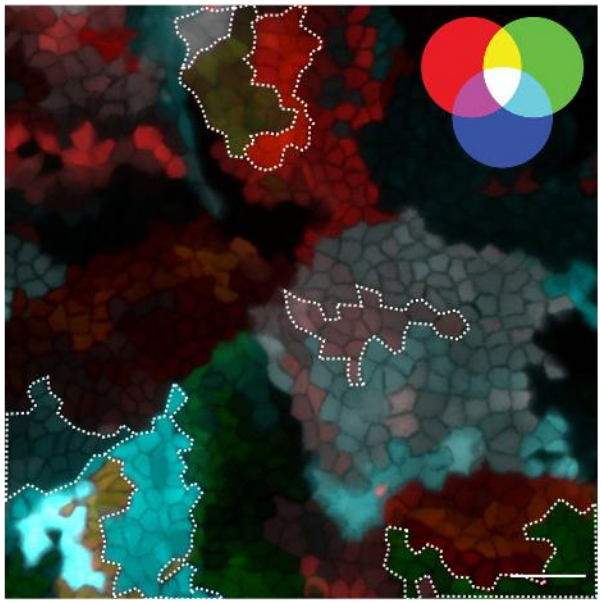


Figure 22 : La triple infection (RVB) des cellules Caco-2/TC-7 induit la génération de plusieurs populations fluorescentes.
L'infection avec les trois productions virales, codant pour l'expression des protéines fluorescentes mCherry, Venus et Cerulean aux titres optimaux (mCherry : 8,25x10^5 UI/mL ; Venus 4,13x10^5 UI/mL ; Cerulean 2,07x10^5 UI/mL) induit après 72 heures d'infection l'apparition de sept populations, de couleurs rouge (mCherry), verte (Venus) et bleue (Cerulean), jaune (mCherry + Venus), cyan (Venus + Cerulean), magenta (mcherry + Cerulean) ou blanche (mCherry + Venus + Cerulean). L'observation au microscope trois jours après l'infection montre l'expansion des populations clonales, en forme de colonies de couleurs différentes dont la fluorescence est émise dans le cytoplasme. Grossissement 20X, barre d'échelle 100 µm.

B) Génération d'une banque de lignées mono-fluorescentes Caco-2/TC-7-RVB

La détermination du titre d'infection optimal a permis d'infecter de manière efficace des populations de Caco-2/TC-7 (Figure 23) pour ensuite générer trois banques cellulaires de clones respectivement rouges, verts ou bleus. Après infection, tri cellulaire et expansion clonale (ensemencement d'une seule cellule par puits pour générer une population monoclonale R, V ou B), un total de cent vingt-six clones rouges, verts ou bleus ont été isolés (Annexe 5).

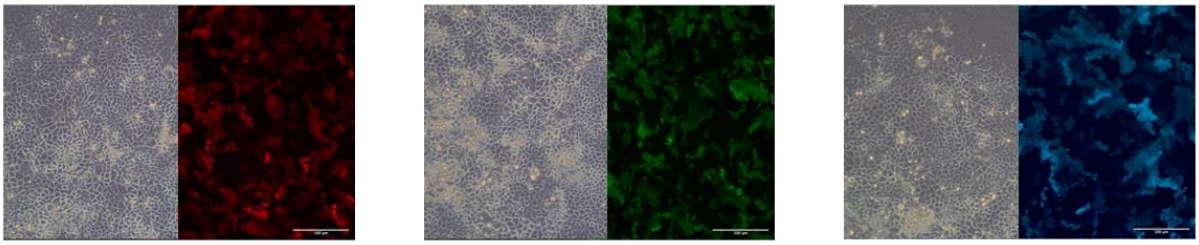


Figure 23 : Les mono-infections des Caco-2/TC-7 aux titres optimaux avec le système LeGO permettent de générer des clones R/V/B.
Pour chaque infection, des clones rouges, verts ou bleus d'intensités de fluorescence différentes sont observés. Les images représentent des observation trois jours après infection au grossissement 5X, barre d'échelle 100 µm.

Il est important de souligner que chaque clone a sa propre intensité de fluorescence ainsi que son phénotype, par l'aspect morphologique des cellules et leur vitesse de prolifération (Figure 24).

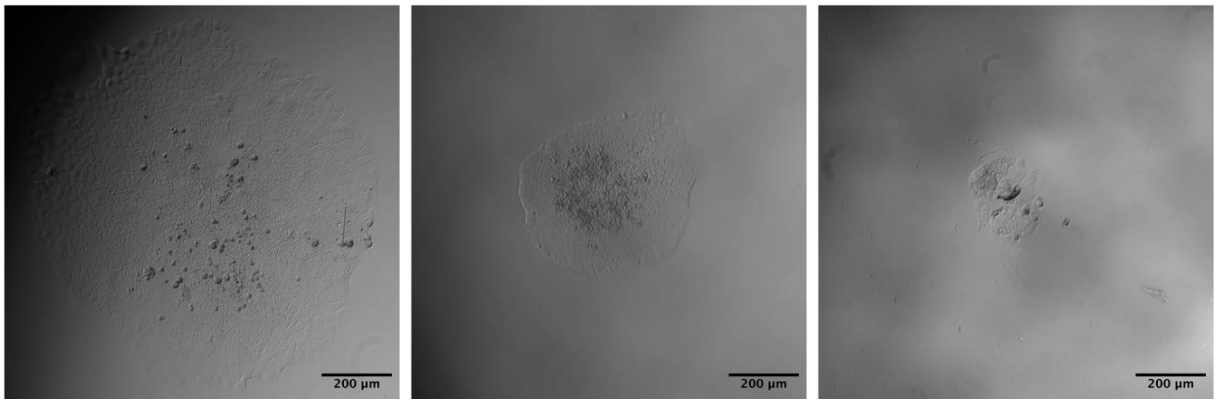


Figure 24 : L'expansion clonale des clones Caco-2/TC-7 R/V/B révèle des phénotypes différents.
Douze jours après le tri cellulaire et l'ensemencement d'une cellule par puits dans une plaque 96 puits, des colonies se sont développées. Celles-ci, issues d'une même infection (ici, trois clones infectés avec les particules virales codant pour la protéine Cerulean), montrent des colonies de tailles différentes.-Grossissement 5X, barre d'échelle 200 µm.

Les différentes intensités de fluorescence de chaque cellule triée et remise en culture ont été déterminées automatiquement lors du tri. L'intensité de chaque clone est répertoriée en Annexe 5.

II) Analyse des effets de la modulation de TRα1

Pour étudier les effets de la modulation de TRα1 sur la croissance tumorale et la composition clonale, les banques cellulaires Caco-2/TC-7-RVB ont été utilisées.

A) Caractérisation des clones *in vitro* en culture monocouche

Comme il a été montré précédemment (*voir Introduction, partie IV : Les hormones thyroïdiennes et leurs récepteurs en physiopathologie intestinale*), TRα1 est impliquée dans la prolifération cellulaire. Une sélection des clones issus de chaque infection mono-couleur présentant des vitesses de prolifération similaires a donc été effectuée pour éviter des biais expérimentaux lors de la modulation d'expression de TRα1. A partir d'une sélection de dix clones par couleur, un seul clone de chaque couleur fluorescent a finalement été retenu, après une comparaison des vitesses de prolifération par mesure de la confluence en Incucyte.

Les trois clones, nommés R45 (mCherry), V41 (Venus) et B7 (Cerulean) montrent des courbes de prolifération sur une semaine très proches les unes des autres (Figure 25). Le calcul du temps de doublement de population a été effectué lors de la phase de croissance exponentielle et tous sont de l'ordre de 30-32 heures. Une comparaison par test ANOVA de l'aire sous chaque courbe a permis de montrer l'égalité significative pour ces trois clones, traduisant des statuts prolifératifs similaires entre eux.

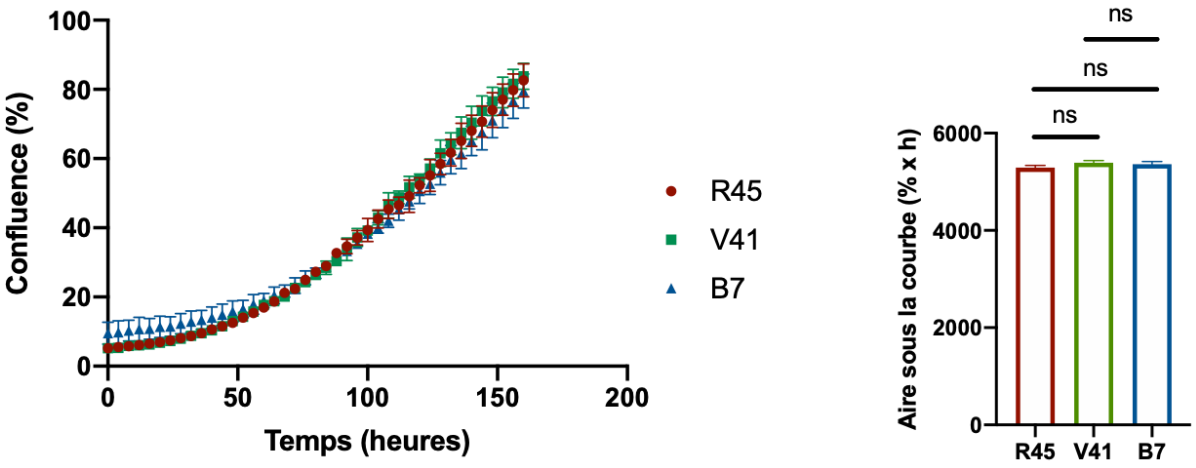


Figure 25 : Les clones Caco-2/TC-7 R45, V41 et B7 ont une vitesse de prolifération proche.
Le suivi de la confluence pendant une semaine par le système Incucyte a permis de sélectionner les trois clones R45 (rouge), V41 (vert) et B7 (bleu) sur le critère de la vitesse de prolifération (panel de gauche). La similarité entre les vitesses de chacun des clones a été vérifiée en mesurant le temps de doublement de population dans la phase exponentielle et en calculant l'aire sous chaque courbe (panel de droite). Les aires ont été comparées avec un test ANOVA et montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois valeurs. P > 0,05. (Les aires sous les courbes ont été calculées avec Graphpad Prism, voir Annexe 6). L'expérimentation a été réalisée en trois réplicats biologiques composés chacun de trois réplicats techniques.

Après sélection des clones, la première étape a consisté à moduler le niveau d'expression de TRα1 par infection lentivirale. Plus précisément, l'expression de TRα1 a été surexprimée dans le clone R45 (R45-TRα1-Augmenté) ou diminuée dans le clone B7 (B7-TRα1-diminué). Une infection contrôle a été également effectuée dans le clone V41 permettant d'obtenir des cellules qui expriment un niveau endogène de TRα1 (V41-TRα1-Normal).

Le niveau de transcrit de TRα1 a d'abord été contrôlé dans chacun des clones par RTqPCR, en trois réplicats biologiques. Un contrôle appelé « Parent » a été utilisé : il s'agit de Caco-2/TC-7 sauvages, non infectées ni pour moduler TRα1, ni avec le système LeGO. Les qPCR révèlent qu'il n'y a pas de différence significative du niveau d'expression entre le contrôle « Parent » et V41-TRα1-Normal. En revanche, R45-TRα1-Augmenté présente des niveaux d'ARNm de TRα1 significativement supérieurs (douze fois) par rapport à V41-TRα1-Normal. B7-TRα1-Diminué a un niveau d'ARNm de TRα1 significativement réduit (cinq fois) par rapport aux cellules V41-TRα1-Normal (Figure 26).

Le niveau d'expression protéique de TRα1 a également été analysé par Western blot. Là encore, V41-TRα1-Normal a un niveau de TRα1 similaire à la lignée « Parent » (légèrement plus important), R45-TRα1-augmenté un niveau supérieur et B7-TRα1-Diminué un niveau inférieur à V41-TRα1-Normal (Figure 26).

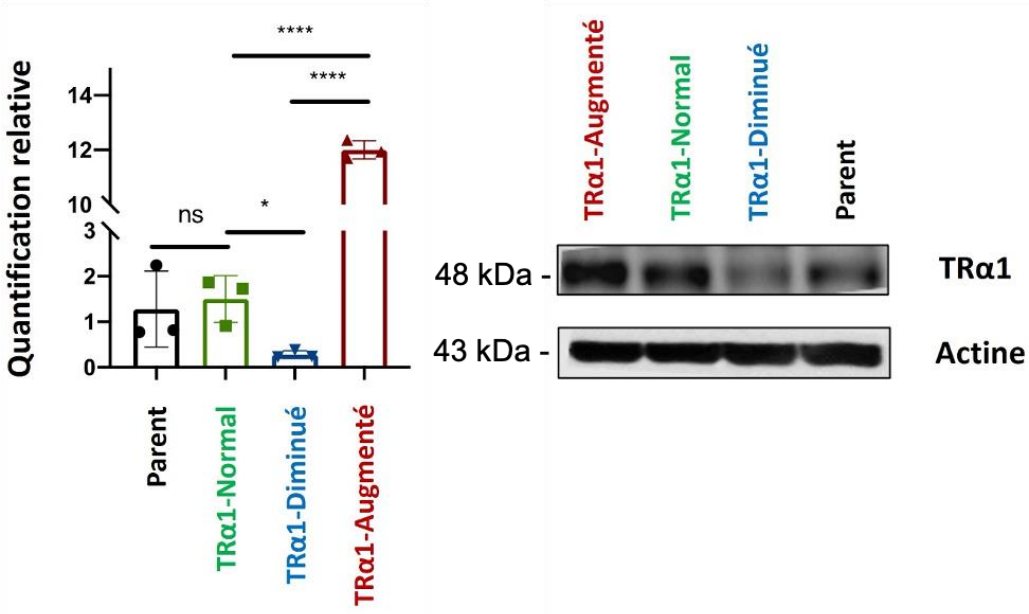


Figure 26 : Modulation de TRα1 au niveau ARNm et protéique.
*La quantification relative de l'ARNm par RT-qPCR (panel de gauche) avec une normalisation par rapport à la lignée Caco-2/TC-7 Parent (lignée sauvage) ne montre pas différence significative entre Parent et TRα1-Normal. En revanche, TRα1-diminué a un niveau de TRα1 significativement plus faible et TRα1-Augmenté un niveau plus fort que TRα1-normal. Dans chaque qPCR l'expression de TRα1 a été normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage PPIB. Analyse statistique par test de Student non paramétrique avec trois réplicats biologiques composés chacun de trois réplicats techniques, ns : non significatif ; * : P < 0,05 et *** : P ≤ 0,0001. L'étude du niveau d'expression protéique de TRa1 par Western blot (panel de droite) montre des résultats concordants avec les niveaux de l'ARNm (les membranes de western blot sont présentées en Annexe 7).*

Les effets de la modulation de TRα1 sur la vitesse de prolifération ont été analysés avec le système Incucyte. R45-TRα1-Augmenté montre une prolifération plus importante que la lignée « Parent ». Spécifiquement, son temps de doublement de population en phase exponentielle est proche mais le début de la phase exponentielle de croissance est plus précoce. En revanche, en comparaison à V41-TRα1-Normal, la vitesse de prolifération de R45-TRα1-Augmenté est plus rapide (pente de la courbe plus raide en phase exponentielle). La vitesse de V41-TRα1-Normal est légèrement plus lente que celle de la lignée sauvage. Enfin, B7-TRα1-Diminué montre une vitesse de prolifération particulièrement lente (pente très douce) par rapport aux niveaux normal, augmenté ou par rapport à la lignée Parent.

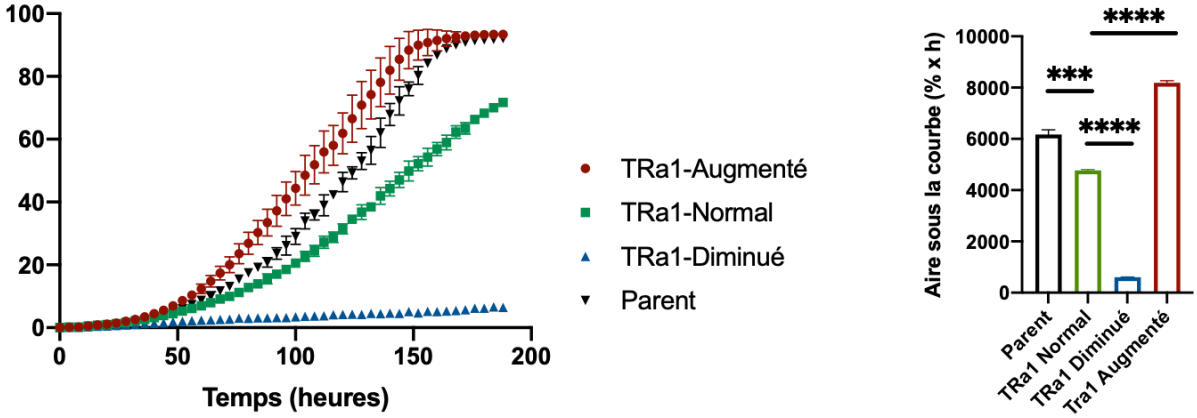


Figure 27 : La modulation du niveau de TRα1 dans les clones R45 et B7 modifie leur vitesse de prolifération.
L'observation de l'évolution de la confluence pendant une semaine en système Incucyte des clones dont le niveau d'expression de TRα1 a été modulé montre des différences de leurs vitesses de prolifération (panel de gauche). Le taux de confluence de R45 est augmenté tandis que B7 a pratiquement cessé de proliférer, par rapport à la lignée V41. Il faut noter que V41 présente une vitesse de prolifération ralentie par rapport à la lignée Parent (sauvage) non infectée. La différence entre les vitesses de chacun des clones a été vérifiée en mesurant le temps de doublement de population dans la phase exponentielle et en calculant

*l'aire sous chaque courbe (panel de droite). Les aires ont été comparées deux à deux avec un test de Student et montre que toutes les vitesses sont significativement différentes entre elles. *** : P < 0,0001 et **** : P ≤ 0,00001 (Les aires sous les courbes ont été calculées avec Graphpad Prism, voir Annexe 6). L'expérience a été réalisée avec trois réplicats biologiques composés chacun de trois réplicats techniques.*

B) Étude *in vitro* de la dynamique clonale au cours du temps à l'aide de sphéroïdes complexes composés de cellules avec des niveaux RVB-TRα1-modulés

TRα1 a une expression hétérogène dans les CCR [4], [8]. Dans le but de récapituler expérimentalement cette hétérogénéité et d'étudier la participation de chaque clone cellulaire à la formation et à la croissance de sphéroïdes tumoraux les clones Caco-2/TC-7-RVB-TRα1-modulés ont été utilisés. Cette approche permet de suivre au cours du temps l'évolution des clones et leurs caractéristiques. Pour cela, des sphéroïdes composés des trois clones R45-TRα1-Augmenté, V41-TRα1-Normal et B7-TRα1-Diminué en équipartition (nombre totale de cellules par sphère : 600, c'est à dire 200 cellules de chaque clone) ont été produits puis maintenus en culture pendant des temps variables avant analyses successives. Spécifiquement, des récoltes ont été effectuées à jour 2, 4, 7, 10 et 20 après formation des sphères, pour réaliser des marquages immunofluorescents sur des coupes congelées sériées et des observations en microscopie.

En accord avec nos travaux précédents [81], on observe que les sphéroïdes forment d'abord des agrégats d'une centaine de microns de diamètre (Figure 28 A, J2) puis s'arrondissent (Figure 28 A, J4 à J10) et peuvent s'élargir jusqu'à environ 500 µm de diamètre au bout de 20 jours (Figure 28 A, J20). Après vingt jours en culture, les structures, très larges, ont tendance à s'agréger entre elles et perdent leur aspect circulaire.

La pertinence du modèle de culture tridimensionnelle en sphéroïdes repose sur la capacité des sphères à reproduire l'organisation spatiale et la hiérarchisation de l'axe vertical de l'épithélium intestinal (Figure 28, B) [81]. A l'intérieur des structures, il a été montré qu'un lumen et un gradient de prolifération se forment de la bordure externe vers le centre [81]. Bien que plusieurs couches cellulaires séparent le lumen de la bordure externe, il est parfois délimité par une simple monocouche cellulaire. Au cours du temps, ce lumen se rempli de débris cellulaires et est bordé par des cellules apoptotiques [81]. La suite de mes travaux a donc consisté à observer si le niveau d'expression de TRα1 dans les différents clones cellulaires définissait une localisation en bordure externe des sphéroïdes, en zone intermédiaire et autour du lumen. L'objectif était de déterminer si l'on pouvait corréler leur hiérarchisation avec l'organisation au sein des sphères des trois clones RVB TRα1-Augmenté, TRα1-Normal ou TRα1-Diminué.

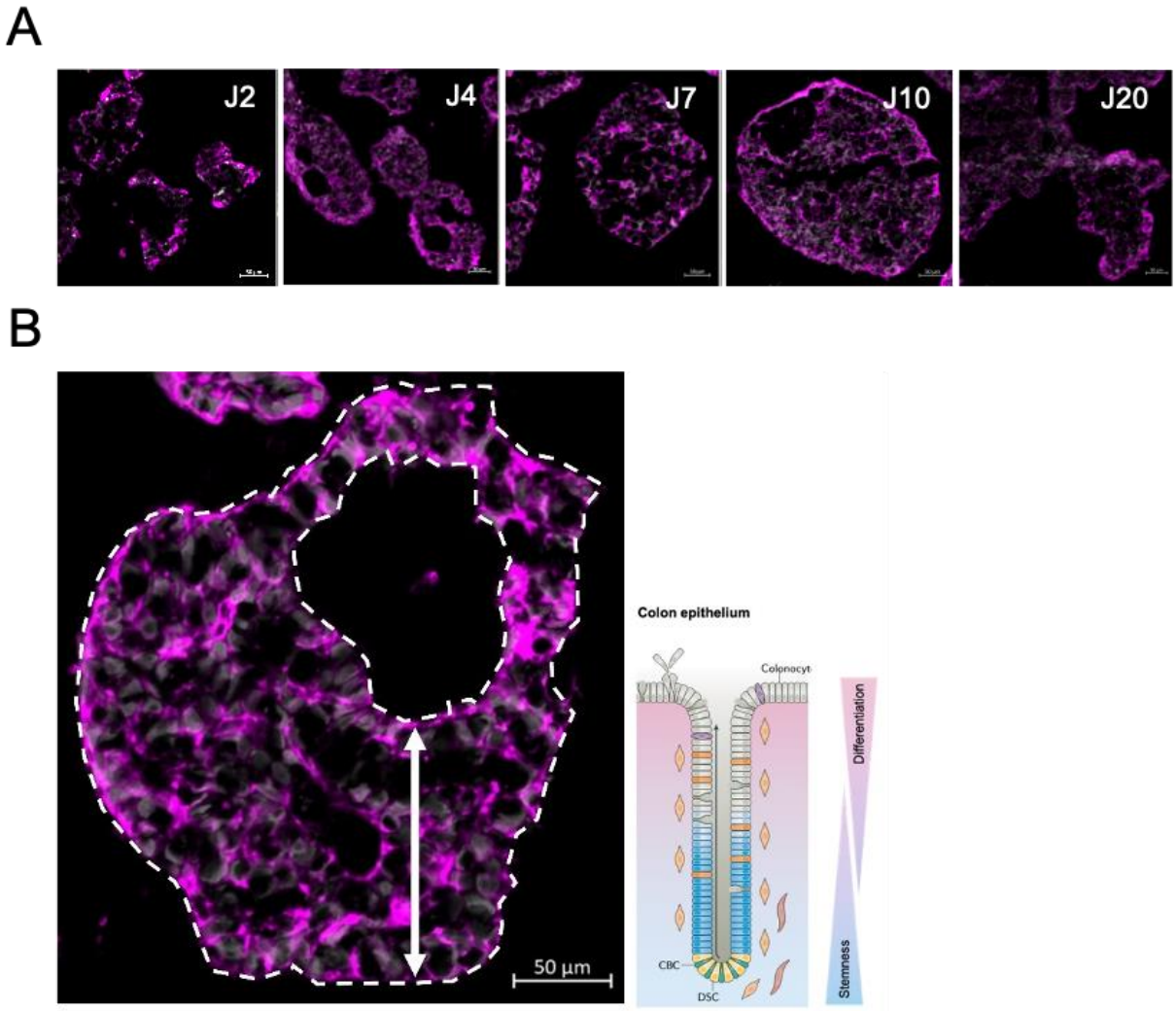


Figure 28 : Les sphéroïdes de Caco-2/TC-7 reproduisent la hiérarchisation de l'axe vertical crypte-villosité/épithélium de surface.
L'observation en IF, avec le marquage de la protéine membranaire EpCAM (magenta) montre de jour en jour (J2 à J20) la formation d'un lumen au centre des sphéroïdes, qui rappelle la lumière intestinale tandis que l'extension des sphères s'effectue par la bordure externe, qui se rapproche des cryptes dans lesquelles se trouvent les cellules souches prolifératives. Les noyaux sont colorés au DAPI (gris), grossissement 20X, barre d'échelle 50 µm.

La composition des sphères en clones RVB est dynamique au cours du temps. Dans les conditions précoces, aux jours 2 et 4, les structures sont majoritairement composées de clones verts V41-TRα1-Normal. Les groupements de cellules rouges R45-TRα1-Augmenté sont plutôt localisés en bordure de sphères (Figure 29, J4). Il est important de souligner l'absence de cellules bleues correspondant au clone B7 dont le niveau de TRα1 est diminué (Figure 29).

A partir de sept jours en culture, la proportion des clones verts et rouges s'inverse et les structures sont alors principalement constituées du clone R45-TRα1-Augmenté (Figure 29, J7). Les populations vertes sont localisées en bordure ou au centre des structures, sans prévalence.

Une approche en immunofluorescence a été utilisée pour corréler l'expression de certains marqueurs dans les clones des sphéroïdes au cours du temps. Le premier marqueur observé est la protéine membranaire EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule), spécifique des

cellules épithéliales (Figure 29) [83]. EpCAM est exprimée dans l'intégralité des structures, sans distinction des différents temps d'observation ni des différentes populations RVB.

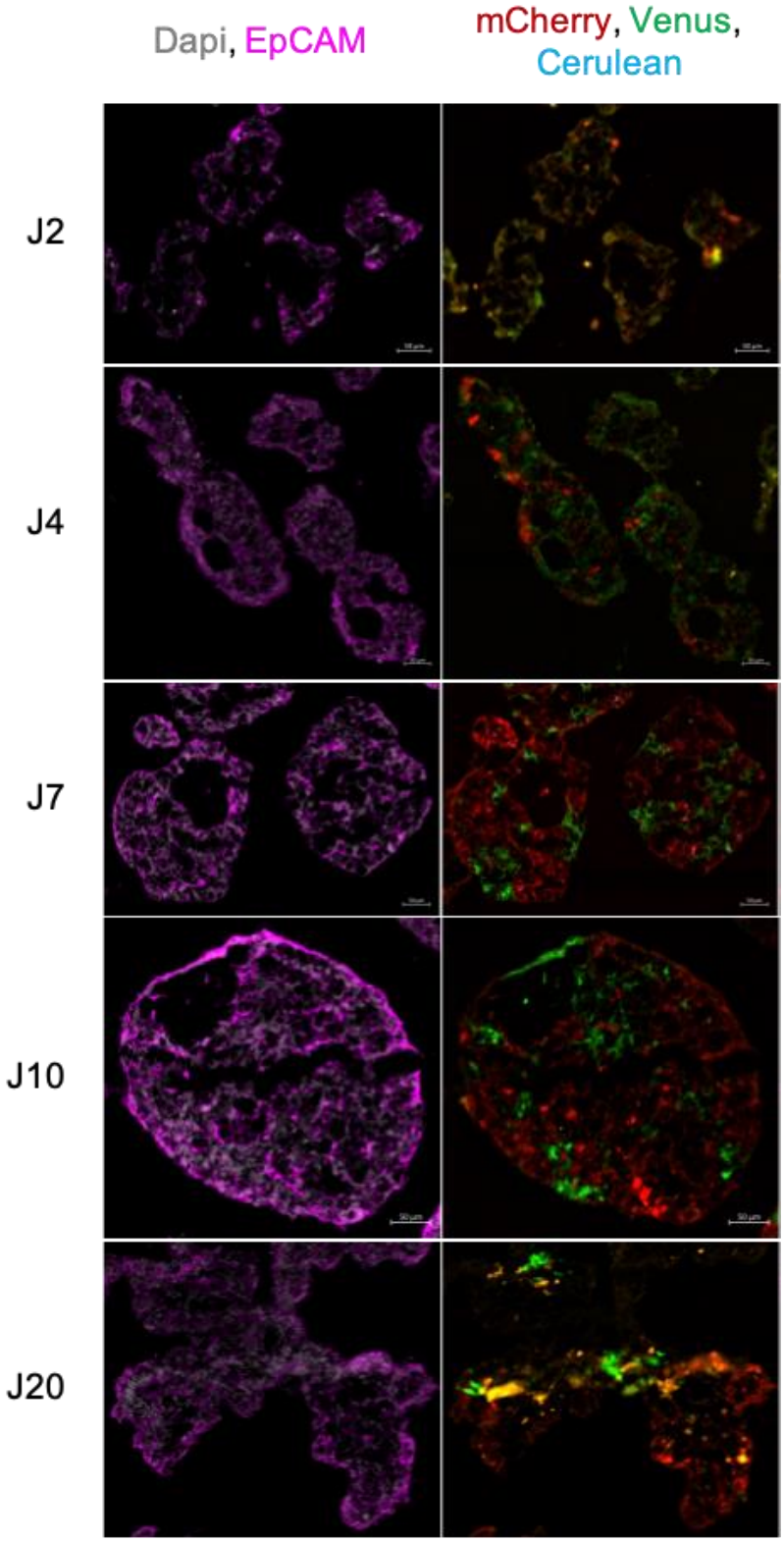
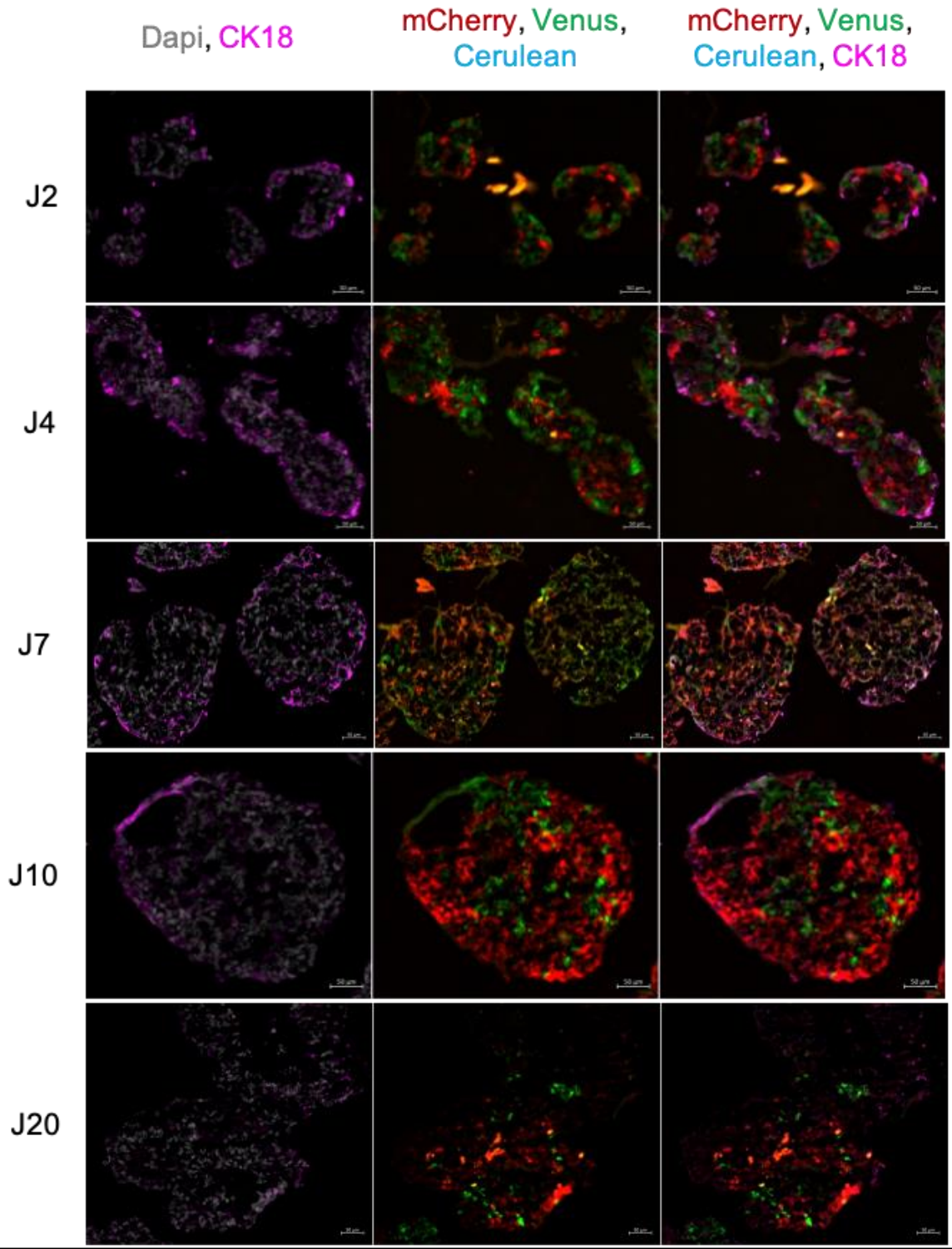


Figure 29 : La protéine membranaire EpCAM est exprimée à la membrane des cellules Caco-2/TC-7 RVB-TRα1 modulés qui composent les sphéroïdes.
Pendant plusieurs jours en culture (de J2 à J20), les sphéroïdes Caco-2/TC-7 RVB grossissent et montrent une dynamique de la répartition des clones R45 et V41. Les clones B7 ne sont pas présents dans les structures. Toutes les cellules sont marquées à leur membrane par l'anticorps anti-EpCAM (marquage en IF sur coupes congelées). Les noyaux sont marqués au DAPI (en gris), les cellules R45 (mCherry) sont rouges, V41 (Venus) verte, et B7 (Cerulean) bleue. EpCAM est coloré en magenta. Grossissement 20X, barre d'échelle 50 µm.

Pour comprendre plus en détail la composition cellulaire des sphéroïdes et l'éventuelle répartition dans les clones, un marquage de la cytokératine 18 (CK18) a été effectué. Il s'agit d'une protéine exprimée dans le cytoplasme au niveau du cytosquelette des cellules non différenciées peuplant le compartiment prolifératif/souche de l'intestin grêle et du colon [84].

Dans la condition la plus précoce (Figure 30, J2) des portions de la bordure cellulaire externe des sphéroïdes expriment fortement la CK18. Les cellules exprimant cette protéine sont vertes ou rouges, sans distinction. Au jour 4 (Figure 30, J4), une grande partie de la bordure cellulaire externe des sphères est positive à la CK18. A ce stade, les structures sont composées majoritairement de cellules V41-TRα1-Normal, particulièrement en bordure externe où sont présentes les cellules CK18-positives, soulignant une corrélation entre expression de CK18 et clones verts. Au jour 7 (Figure 30, J7), le marquage apparaît à la fois dans les cellules de la bordure externe et dans les couches plus internes. Néanmoins, l'expression de la CK18 reste le plus intense au niveau des cellules les plus externes. Globalement, ce marqueur semble être distribué de manière comparable dans les clones verts et rouges. Enfin, à partir du dixième jour (Figure 30, J10) le nombre de cellules exprimant la CK18 diminue. Seules quelques cellules V41-TRα1-Normal, en bordure externe des sphères, présentent encore le marquage, qui disparait finalement au vingtième jour (Figure 30, J20).



CK18	Jour 2	Jour 4	Jour 7	Jour 10	Jour 20
Expression	+	++	+	+	-
Localisation	Externe	Externe	Externe/Intermédiaire	Externe	
Clones marqués	Vert/Rouge	Vert/Rouge	Vert/Rouge	Vert	

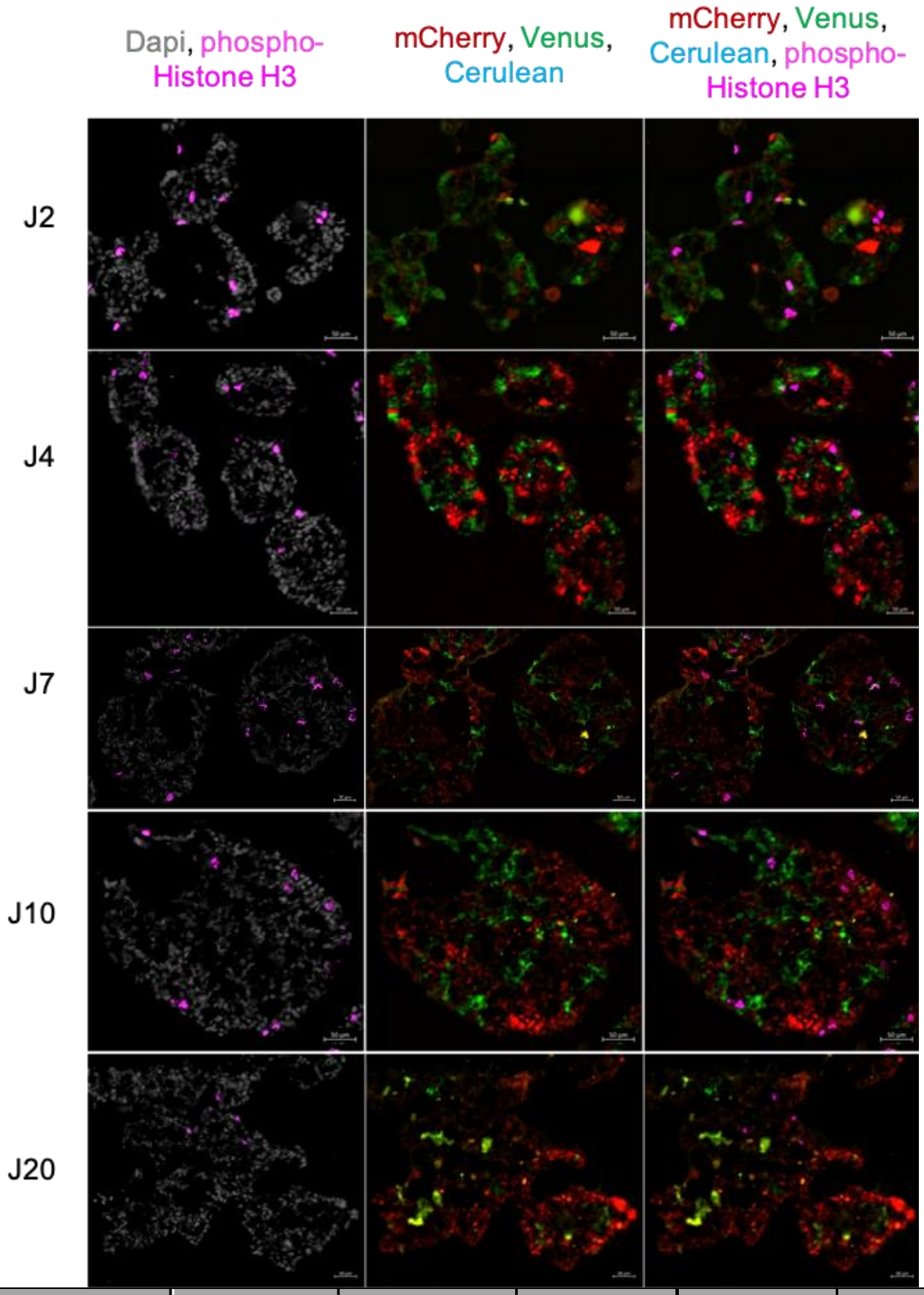
Figure 30 : Le statut non différencié évolue au cours du temps dans les cultures en sphéroïdes de Caco-2/TC-7 TRα1 modulés. Le marqueur des cellules non différenciées cytokératine 18 (CK18) est analysé en IF sur coupes congelées (magenta). Les cellules CK18-positives sont localisées en bordure cellulaire externe des sphéroïdes des jours 2 à 10 (J2 - J10) puis disparait au vingtième jour (J20). La protéine CK18 est exprimée dans les cellules vertes V41 (Venus) et rouges R45 (mCherry). Les cellules bleues B7 (Cerulean) sont absentes des structures. Les noyaux sont marqués au DAPI (en gris). Grossissement 20X, barre d'échelle 50 µm. Le tableau récapitule au cours du temps l'expression du marqueur CK18, sa localisation et les clones RVB qui l'expriment

Dans l'intestin grêle et le colon, de manière physiologique, le fond des cryptes abrite des cellules prolifératives [2]. Après avoir effectué le marquage de la CK18 dans les sphéroïdes (Figure 30), l'observation de la prolifération a ensuite été réalisée par le marquage de la protéine phospho-Histone H3 (Figure 31). La phospho-Histone H3 est une protéine exprimée dans le noyau des cellules engagées dans la division cellulaire et spécifiquement présente au cours de la phase M du cycle cellulaire [85].

De manière générale, elle est plus exprimée par la bordure cellulaire externe qu'au centre des sphéroïdes. Au deuxième jour d'observation (Figure 31, J2), les clones V41-TRα1-Normal expriment préférentiellement la phospho-Histone H3 tandis qu'au jour 4 (Figure 31, J4) le marquage est réparti équitablement entre les clones verts et rouges (R45-TRα1-Augmenté). Dès le septième jour, les cellules R45-TRα1-Augmenté expriment majoritairement la protéine (Figure 31, J7, J10, J20), en accord avec l'expansion de ce clone.

Le nombre de cellules positives au marquage de la phospho-Histone H3, dans chaque structure, est stable entre les jours 2 et 4 puis augmente aux jours 7 et 10, avec l'augmentation de la taille des sphères. Au vingtième jour, le nombre de cellules exprimant le marqueur a diminué par rapport à jour 10 (Figure 31).

La comparaison des patrons d'expression des marqueurs de la prolifération (phospho-Histone H3, Figure 31) et des cellules non différenciées (CK18, Figure 30) sur des coupes sériées révèle une bonne corrélation entre les cellules impliquées dans le processus mitotique et leur statut non différencié (Annexe 8), notamment aux jours 2 à 10.



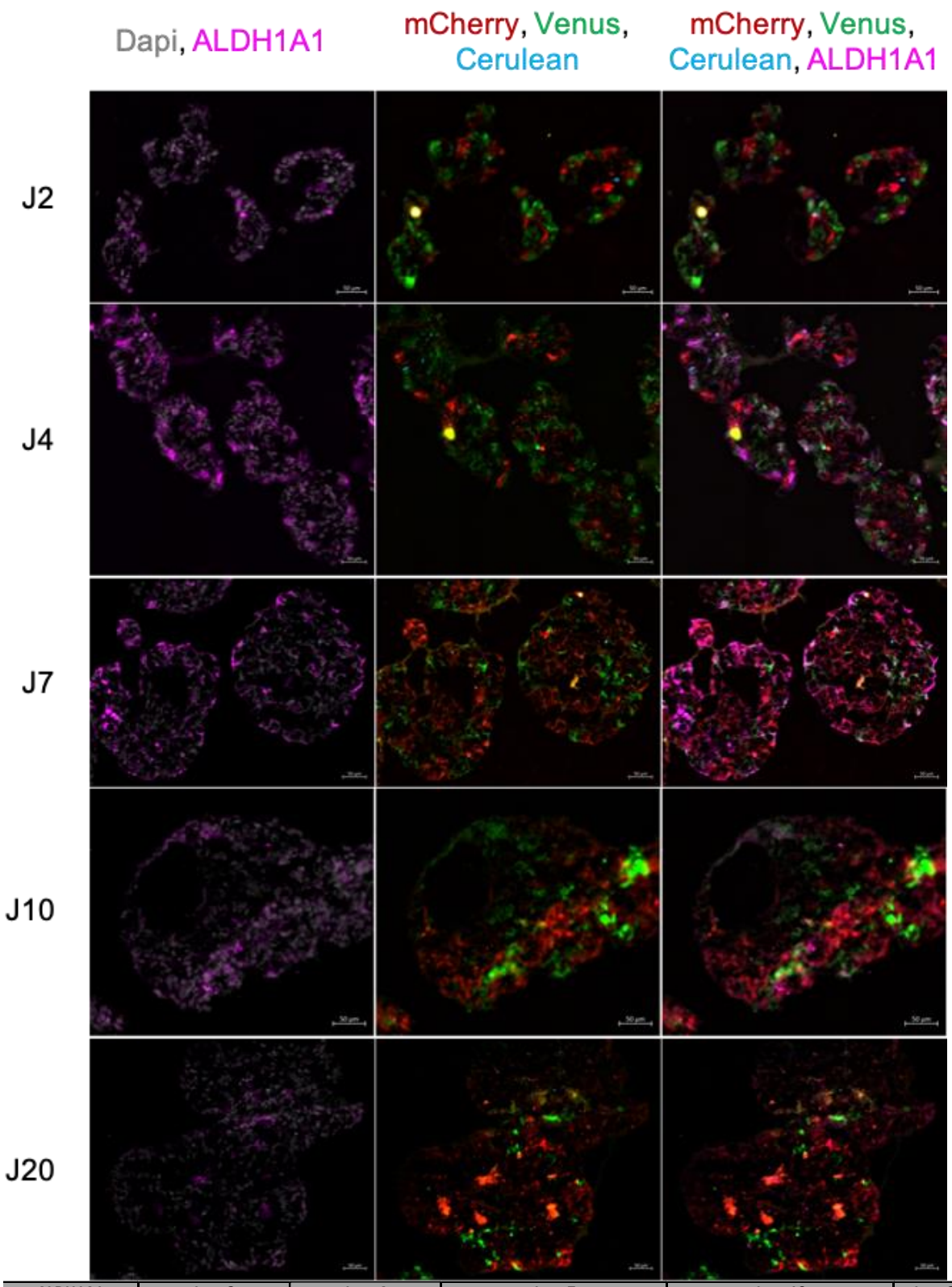
Phospho-Histone H3	Jour 2	Jour 4	Jour 7	Jour 10	Jour 20
Expression	+	+	+	+	-
Localisation	Externe	Externe	Externe	Externe	
Clones marqués	Vert	Vert/Rouge	Rouge	Rouge	

Figure 31 : Les cellules en bordure externe des sphéroïdes Caco-2/TC-7 RVB-TRα1 modulés prolifèrent.
La prolifération, étudiée par le marquage en IF sur coupes congelées de la protéine nucléaire phospho-Histone H3 (magenta) est dynamique au cours du temps. Son marquage corrèle avec celui du noyau des cellules par le DAPI (en gris), et les cellules prolifératives sont situées en bordure des sphères aux jours 2 à 10 (J2 - J10). Le vingtième jour (J20) montre moins de cellules

positives au marquage de la phospho-Histone H3. Les cellules R45 (mCherry) sont rouges, V41 (Venus) sont vertes, et les cellules B7 (Cerulean) bleues sont absentes des structures. Grossissement 20X, barre d'échelle 50 µm. Le tableau récapitule au cours du temps l'expression du marqueur, sa localisation dans les structures et les clones RVB positifs au marquage.

Pour identifier davantage la nature des cellules prolifératives, notamment celles situées dans des zones au statut non différencié, un marquage spécifique des CSC a été réalisé avec un anticorps anti-ALDH1A1 [86]. Cette protéine est intéressante dans l'étude des CSC car elle est associée à un statut peu différencié, à la formation de métastases, à la résistance aux thérapies et est corrélée avec des stades avancés de CCR [86]. Elle est exprimée au niveau du cytoplasme et des membranes cellulaires. Dans la condition la plus précoce (Figure 32, J2) quelques rares cellules en zone externe des sphéroïdes présentent un marquage de l'ALDH1A1, sans distinction entre les clones rouges ou verts. En revanche, à jour 4 (Figure 32, J4), le nombre de cellules positives et l'intensité du marquage augmentent. Beaucoup de cellules V41-TRα1-Normal, présentes en bordure des structures, arborent un net marquage de la protéine sous forme de clusters de quelques cellules. Des cellules R45-TRα1-Augmenté expriment également l'ALDH1A1, mais il s'agit de clones positifs de taille plus limitée. Quelques jours plus tard, à jour 7 (figure 32, J7), comme pour le marquage de la CK18 (Figure 30, J7), l'expression de ALDH1A1 est toujours en zone externe mais peut être retrouvée sur plusieurs couches cellulaires. Là encore, des clusters de cellules positives sont observés, également répartis entre les clones verts ou rouges. Dès le dixième jour (Figure 32, J10, J20) le marquage devient limité à quelques cellules, voire est absent.

La comparaison entre les coupes sériées, incubées avec les différents anticorps, permet d'observer qu'aux jours 4, 7 et 10, les zones arborant un statut non différencié (CK18-positives), abritent des cellules prolifératives qui sont également positives au marqueur de CSC ALDH1A1 (Annexe 8). Des jours 2 à 7, ces régions semblent mixtes dans leur composition de clones rouges et verts, puis dès le dixième jour deviennent principalement rouges.



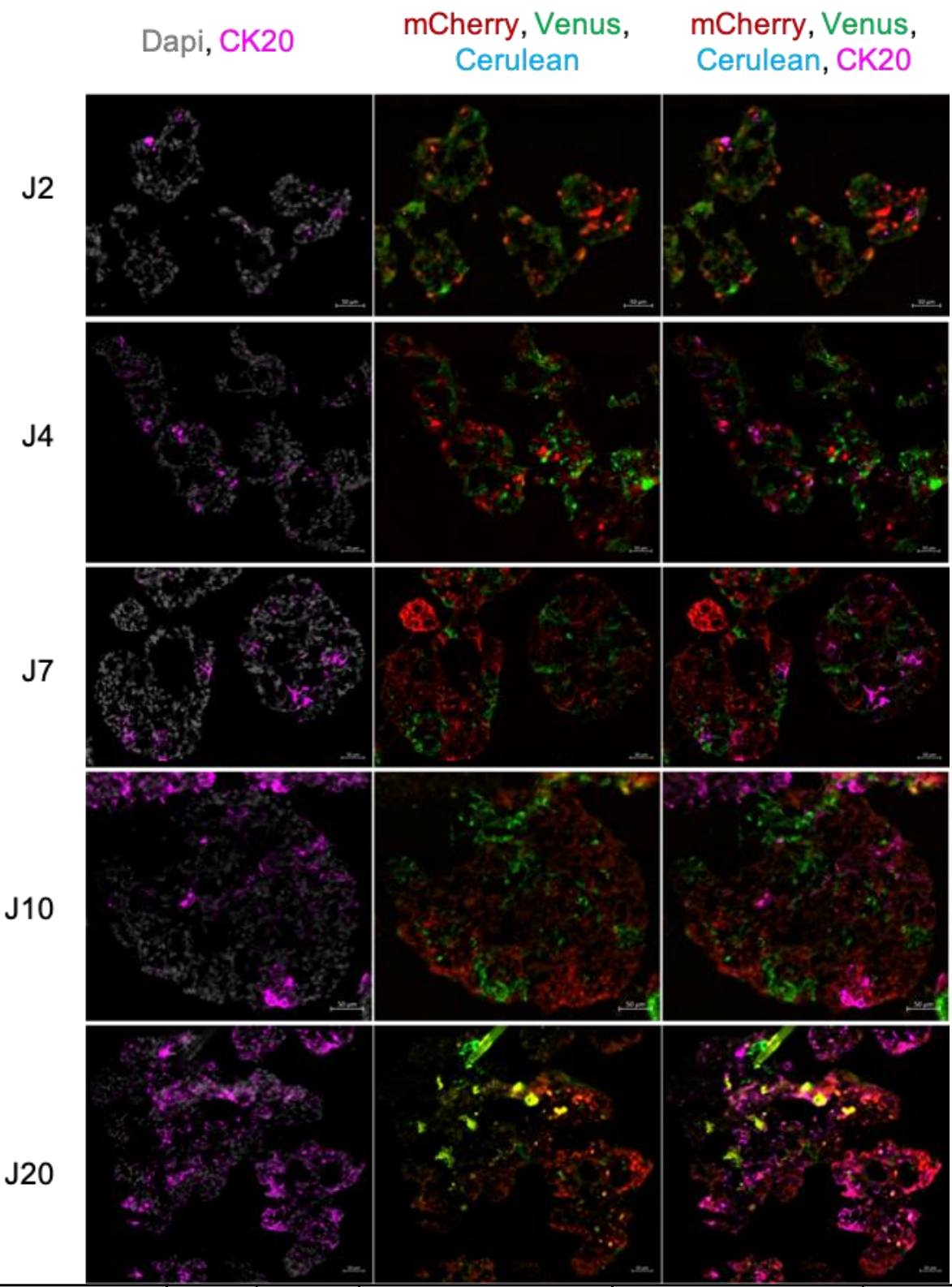
ALDH1A1	Jour 2	Jour 4	Jour 7	Jour 10	Jour 20
Expression	+/-	++	+	+/-	-
Localisation	Externe	Externe	Externe/Intermédiaire	Externe/Intermédiaire	
Clones marqués	Vert/Rouge	Vert/Rouge	Vert/Rouge	Rouge	

Figure 32 : Les sphéroïdes RVB-TRα1 modulés abritent des cellules souches cancéreuses.
Le marquage en IF sur coupes congelées montre la présence de CSC positives au marqueur ALDH1A1 (magenta) en nombre plus important aux jours 2 à 7 (J2 – J7). Aux jours 10 (J10) et 20 (J20), on note une diminution des cellules ALDH1A1-positives. Les noyaux sont marqués au DAPI (en gris), les clones R45 (mCherry) sont rouges, V41 (Venus) sont verts et les clones B7

(Cerulean) bleus sont absents des structures. Grossissement 20X, barre d'échelle 50 µm. Le tableau récapitule au cours du temps l'expression du marqueur, sa localisation dans les structures et les clones RVB qui sont positifs au marquage.

Le dernier marqueur analysé est la cytokératine 20 (CK20). Il s'agit d'une protéine cytoplasmique exprimée au niveau du cytosquelette des cellules différenciées des villosités dans l'intestin grêle et de l'épithélium de surface dans le colon [87].
Dans la condition la plus précoce (Figure 33, J2), de très rares cellules, toujours isolées et R45-TRα1-Augmenté expriment la CK20. Elles n'adoptent pas de localisation de prédilection au sein des couches cellulaires des sphéroïdes. Deux jours plus tard (Figure 33, J4), des clusters apparaissent, composés de deux ou trois cellules R45-TRα1-Augmenté. Là encore, le marquage peut être au niveau de différentes couches cellulaires des sphéroïdes. A partir du septième jour (Figure 33, J7), les clusters cellulaires CK20-positifs sont plus étendus. Il est alors possible d'en dénombrer entre trois et quatre par sphère, s'étendant de la bordure cellulaire externe vers l'intérieur des structures et constitués de cinq à dix cellules environ, réparties dans les clones V41-TRα1-Normal ou R45-TRα1-Augmenté. Au dixième jour (Figure 33, J10), les clusters sont plus larges mais localisés entre la zone externe et centrale des sphéroïdes. La CK20 est principalement exprimée dans les clones rouges. Au vingtième jour (Figure 33, J20), les clusters s'étendent de la périphérie jusqu'à la lumière des sphéroïdes : ils constituent environ la moitié des structures. A ce stade, CK20 est majoritairement exprimée par les clones R45-TRα1-Augmenté, dû à leur forte expansion.

La comparaison entre les coupes sériées révèle que les zones différenciées CK20-positives sont découplées de celles qui expriment la CK18, spécifique des cellules non différenciées. De plus, le nombre de cellules positives au marquage de la CK20 croît au cours du temps, alors qu'en parallèle le nombre de cellules CK18-positives diminue. La CK20 est exprimée par des clones verts et rouges qui bordent le lumen, ou dans la zone intermédiaire entre le lumen et la bordure externe.



CK20	Jour 2	Jour 4	Jour 7	Jour 10	Jour 20
Expression **Localisation** **Clones marqués**	-	+/- Externe Rouge	+ Intermédiaire/Lumen Rouge	+ Intermédiaire/Lumen Rouge	+ Partout Rouge

Figure 33 : Les cellules Caco-2/TC-7 RVB-TRα1-modulées se différencient au cours du temps dans les cultures en sphéroïdes. Le marquage en IF sur coupes congelées des cellules différenciées exprimant la protéine cytokératine 20 (CK20, en magenta) augmente de plus en plus dans les structures pendant vingt jours de culture (observation du jour 2 J2 au jour 20 J20). Les

clones R45 (mCherry) rouges expriment majoritairement la CK20. Les clones V41 (Venus) sont verts, et les clones B7 (Cerulean) bleus sont absents des structures. Grossissement 20X, barre d'échelle 50 µm. Le tableau récapitule au cours du temps l'expression du marqueur, la localisation dans les structures et les clones RVB positifs au marquage.

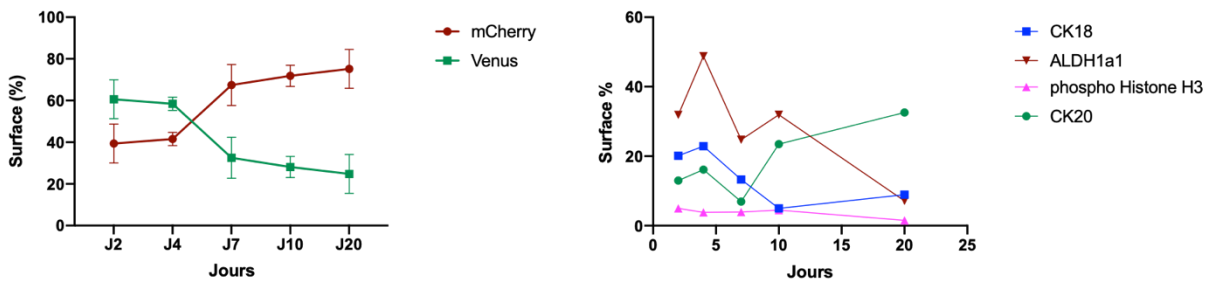
Afin de compiler l'ensemble de ces résultats, une analyse semi-quantitative de l'aire occupée par chaque marquage, dans un champ optique et à chaque temps a été réalisée. Cette analyse permet d'estimer l'évolution de répartition entre les clones rouges et verts (Figure 34, panel de gauche) ainsi que les marqueurs présentés précédemment (Figure 34, panel de droite). Les quantifications ont été normalisées par l'aire totale occupée par toutes les cellules pour les marqueurs CK18, CK20 et ALDH1A1 et par l'aire totale de tous les noyaux du champ optique pour la phospho-Histone H3. Ces quantifications sont des estimations très préliminaires réalisées avec une méthode de mesure qui demande à être améliorée. De ce fait, elles n'ont pas été l'objet d'analyses statistiques.

Dans les deux conditions les plus précoces, aux jours 2 et 4, les sphères sont en majorité composées par les clones V41-TRα1-Normal (environ 60 %). Au septième jour, la tendance s'inverse et les sphéroïdes sont constitués d'environ 70 % de clones R45-TRα1-Augmenté. Ensuite, jusqu'au vingtième jour, cette proportion reste constante, entre 70 et 80 %.

Concernant l'analyse de la dynamique des marqueurs, EpCAM n'a pas été quantifié puisqu'il est exprimé sans distinction par l'intégralité des cellules composant les sphères. On s'intéresse d'abord au statut différencié / non différencié des sphéroïdes. En suivant l'évolution de la proportion de marquage de la CK18 au cours du temps, il apparait qu'environ 20 % de la composition des sphères soit non différenciée aux jours 2 et 4, puis cette proportion diminue de moitié au jour 7, jusqu'à atteindre une proportion assez basse de moins de 10 % dès le dixième jour. A l'inverse, le marquage de la CK20, spécifique des cellules différenciées, augmente progressivement de 15 % au jour 2 jusqu'à 30 % au jour 20. La valeur au jour 7 révèle une chute de la zone CK20-positive en dessous de 10 %. Il est possible que cela provienne d'un problème survenu lors du marquage avec les anticorps.

La proportion de cellules prolifératives observée par le marquage de la phospho-Histone H3 reste toujours faible, inférieur à 5 %, mais semble tout de même diminuer au cours du temps, comme le marquage des cellules non différenciées.

Enfin, la proportion de CSC exprimant le marqueur ALDH1A1 diminue également au cours du temps, comme la proportion de cellules non différenciées et en prolifération, en opposition au marquage des cellules différenciées. Toutefois, un doublement de la proportion du marqueur des CSC apparait au jour 4 (50 %) par rapport aux jours 2 et 7 (30 %). Aux jours 7 et 10, cette proportion reste stable, avant de diminuer au jour 20 à environ 10 %.



		CK18	Phospho-Histone H3	ALDH1A1	CK20
Jour 2	**Marquage** **Localisation** **Clones marqués**	+ Externe Vert/Rouge	+ Externe Vert	-	-
Jour 4	**Marquage** **Localisation** **Clones marqués**	++ Externe Vert/Rouge	+ Externe Vert/Rouge	++ Externe Vert/Rouge	+/- Externe Rouge
Jour 7	**Marquage** **Localisation** **Clones marqués**	+ Externe/Intermédiaire Vert/Rouge	+ Externe Rouge	+ Externe/Intermédiaire Vert/Rouge	+ Intermédiaire/Lumen Rouge
Jour 10	**Marquage** **Localisation** **Clones marqués**	+ Externe Vert	+ Externe Rouge	+/- Externe/Intermédiaire Rouge	+ Intermédiaire/Lumen Rouge
Jour 20	**Marquage** **Localisation** **Clones marqués**	-	-	-	++ Partout Rouge

Figure 34 : Les populations RVB et les marqueurs étudiés sont dynamiques au cours du temps dans les sphéroïdes de Caco-2/TC-7 TRα1 modulés.
La quantification de la taille des clones R45 (mCherry) rouges et V41 (Venus) verts permet d'observer qu'aux jours 2 et 4 la population V41 est majoritaire et que cette tendance s'inverse à partir du septième jour en culture (panel en haut à gauche) où les populations R45 ont une prévalence. Les marqueurs pour qualifier la composition des sphéroïdes (panel en haut à droite) montrent que les sphères, composées de cellules ayant un statut non différencié aux temps précoces perdent ces propriétés pour se différencier au cours du temps. Cependant, le taux de prolifération reste quasi-constant au cours du temps avec une baisse au jour 20, qui corrèle également avec un nombre diminué de CSC. Le tableau récapitule au cours du temps l'expression de chacun des marqueurs, leur localisation dans les structures et les clones RVB qui sont positifs au marquage.

C) Étude *in vivo* de la dynamique clonale au cours du temps à l'aide de xénogreffes de sphéroïdes complexes composés de cellules avec des niveaux RVB-TRα1-modulés

Dans le but d'étudier l'impact de la modulation positive ou négative de TRα1 sur la prise et la croissance tumorale, nous avons utilisé des approches de xénogreffes *in vivo*, fournissant un environnement plus complexe et physiologique. Dans ce but, les sphéroïdes RVB TRα1-modulés ont été utilisés selon deux protocoles : xénogreffes à partir de (i) sphéroïdes dissociés pour étudier la formation tumorale, (ii) des sphéroïdes entiers non dissociés pour étudier l'évolution et la croissance de la tumeur au cours du temps. Dans les deux cas, des implants en sous-cutané dans le flanc droit de souris immunodéficientes NOD-scid ont été réalisés.

Pour s'assurer que les cellules implantées sont viables et capables de proliférer, une partie des cellules ou des sphéroïdes préparés pour les greffes sont remis en cultures monocouches après la procédure d'implantation. Dans le cas des sphères dissociées (Figure 35, A) ou non dissociées (Figure 35, B), les cellules prolifèrent lors de la remise en culture et une majorité de cellules R45-TRα1-Augmenté apparait. Moins de cellules V41-TRα1-Normal sont présentes et il n'y a que quelques rares cellules B7-TRα1-Diminué. La croissance s'effectue sous forme de colonies rouges, vertes ou bleues.

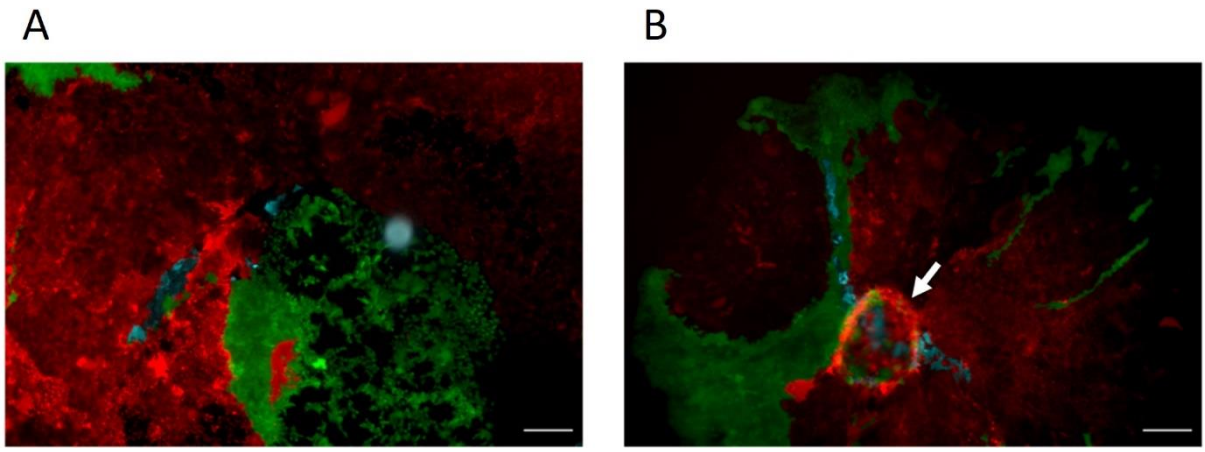


Figure 35 : Contrôle de la viabilité des cellules ou des sphéroïdes implantés en sous-cutané dans le flanc des souris NOD-scid. Les sphères dissociées (A) et non dissociées (B) remises en culture monocouche prolifèrent et s'organisent en colonies rouges, vertes ou bleues. Lors de la remise en culture des sphéroïdes non dissociés, les clones cellulaires s'étalent en monocouche cellulaire après adhésion des sphères au fond de la boîte de culture (B, flèche). Photographie prise 17 jours après ensemencement, grossissement 5X, barre d'échelle 200 µm.

Après sacrifice des animaux receveurs des xénogreffes 90 jours après implantation, cinq tumeurs ont été prélevées, dont deux sont issues de sphéroïdes dissociés et trois de sphéroïdes non dissociés. Toutes les tumeurs récupérées sont de petites tailles, mesurant généralement 5 mm de diamètre. Les tumeurs ont adhéré à l'épiderme et sont vascularisées (Figure 36).

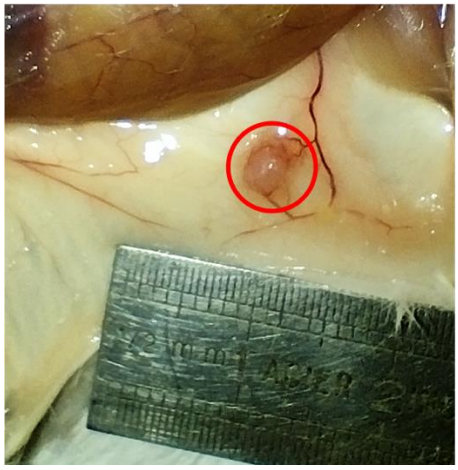


Figure 36 : L'implantation sous-cutanée des sphéroïdes dissociés de Caco-2/TC-7-RVB-TRα1 modulés montre le développement de tumeurs.
Les tumeurs ont été prélevées trois mois après l'implantation, lors de la mise à mort des souris NOD-scid. L'implantation des sphéroïdes non dissociés montre le développement de structures similaires en aspect et en taille à celle montrée ici.

Après le prélèvement et la fixation, la morphologie des tumeurs a d'abord été observée avec une coloration à l'hématoxyline-éosine (HE). Les échantillons issus des sphères dissociées montrent deux types de structures (Figure 37, A) : (i) des tumeurs rondes avec une lumière, cerclées et délimitées par une monocouche cellulaire qui semble très compacte (Figure 37, A, flèche noire). Les noyaux des cellules sont particulièrement rapprochés, ne laissant voir que très peu de cytoplasme. La lumière est généralement vide ou peut contenir des débris cellulaires. (ii) Des structures moins définies en forme et en organisation, avec une densité plus faible, où les noyaux sont beaucoup moins rapprochés les uns des autres et laissant place

au cytoplasme (Figure 37, A, flèche rouge). Ce tissu peu compact entoure toutes les tumeurs, formant une large structure unique.

En comparaison, les tumeurs issues des sphéroïdes non dissociés (Figure 37, B) sont constituées de plusieurs agrégats de sphères. Au cœur de chaque structure sphérique est observable une lumière de taille et forme variables. Ces lumières semblent aussi renfermer des débris cellulaires. Le contour des lumières est moins compact, il est plus difficile d'observer une monocouche cellulaire et l'espace entre les noyaux est plus important, laissant de l'espace au cytoplasme (Figure 37, B, flèche noire). Tout autour, se trouve un tissu organisé en « alvéole » (Figure 37, B, flèche rouge). Enfin, encore plus à l'extérieur, on retrouve le tissu peu compact décrit plus haut, reconnaissable par l'observation aisée du cytoplasme avec peu de noyaux.

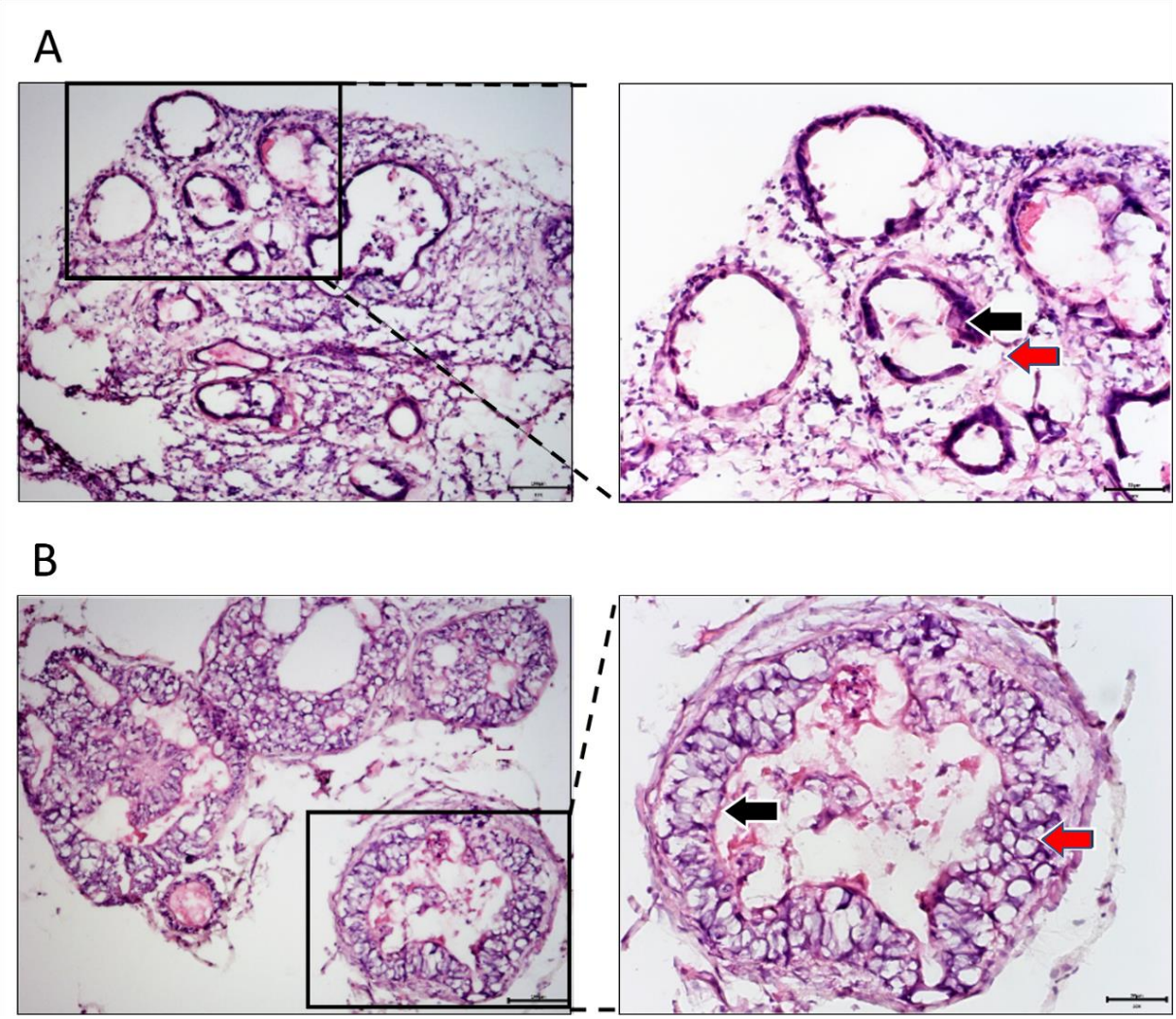


Figure 37 : La greffe des sphéroïdes dissociés ou entiers conduit au développement de structures de morphologies différentes. Coloration Histologique à l'HE (hématoxyline : noyaux en violet et éosine : cytoplasme en rose) sur des tumeurs RVB-TRα1 modulé à partir de sphéroïdes dissociés (A) et de sphéroïdes entiers (B). Images de gauche : Barre d'échelle : 200µm, Grossissement : 10X. Images de droite : Barre d'échelle : 100µm, Grossissement : 20X.

En complément, des marquages en IF sur des coupes congelées ont été réalisés pour caractériser la nature des composants cellulaires observés en coloration HE. Les figures présentées ci-dessous sont des agrandissements des zones d'intérêt, les structures entières sont présentées en Annexe 9.

Dans un premier temps, un marquage en IF de la protéine membranaire EpCAM, marqueur des cellules épithéliales, a été réalisé. Les IF (Figure 38), montrent que la protéine EpCAM est exprimée au niveau des membranes des cellules tumorales des deux types de tumeurs. Cela a permis de confirmer que seules les cellules RVB greffées sont marquées par l'anticorps anti-EpCAM, sans distinction entre les trois clones.

Les tumeurs issues des implantations de sphéroïdes dissociés et entiers montrent une composition RVB des différents clones en fonction de leur niveau de TRα1. En effet, les clones rouges (R45-TRα1-Augmenté) sont très présents au niveau des structures, les clones verts (V41-TRα1-Normal) sont moins abondants et pour finir, les clones bleus (B7-TRα1-Diminué) sont généralement plus rares. D'une structure à l'autre, il arrive que les clones B7-TRα1-Diminué soient plus présents que les clones verts dont le niveau de TRα1 est endogène. De plus, les tumeurs issues de sphéroïdes non dissociés présentent plus de clones TRα1-Normal et TRα1-Diminué que les tumeurs issues de sphères dissociées, dans lesquelles les clones bleus TRα1-Diminué sont parfois même absents.

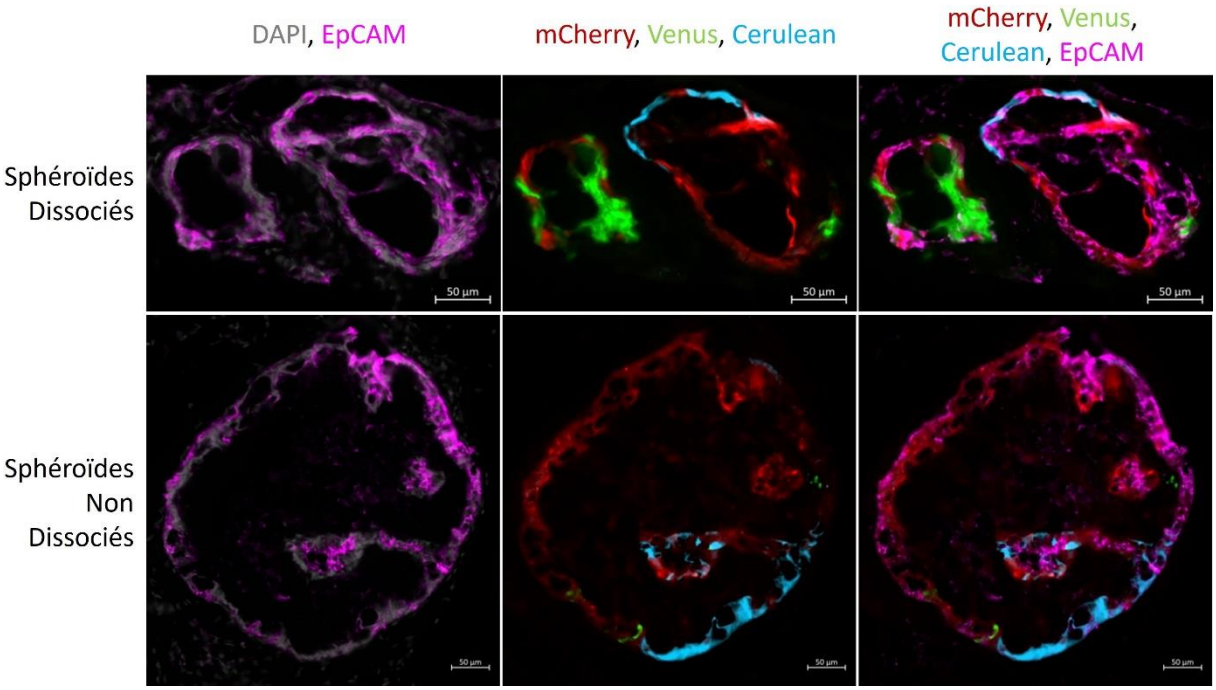


Figure 38 : La protéine EpCAM, marqueur spécifique des cellules épithéliales, est présente dans les cellules tumorales RVB des xénogreffes.
Marquage en IF sur coupes congelées de la protéine membranaire EpCAM (magenta) dans les tumeurs RVB-TRα1 modulé issues de sphéroïdes dissociés ou de sphéroïdes entiers. Les noyaux sont marqués au DAPI (gris). Barre d'échelle : 50µm, Grossissement : 20X.

La caractérisation intra-tumorale a été poursuivie par une étude des cellules non différenciées grâce au marquage de la CK18. Son expression, au niveau du cytosquelette, est observable dans une majeure partie des structures RVB positives des tumeurs issues des sphéroïdes dissociés. CK18 est plus faiblement exprimée dans les tumeurs de sphéroïdes entiers, cette fois essentiellement dans les cellules R45-TRα1-Augmenté.

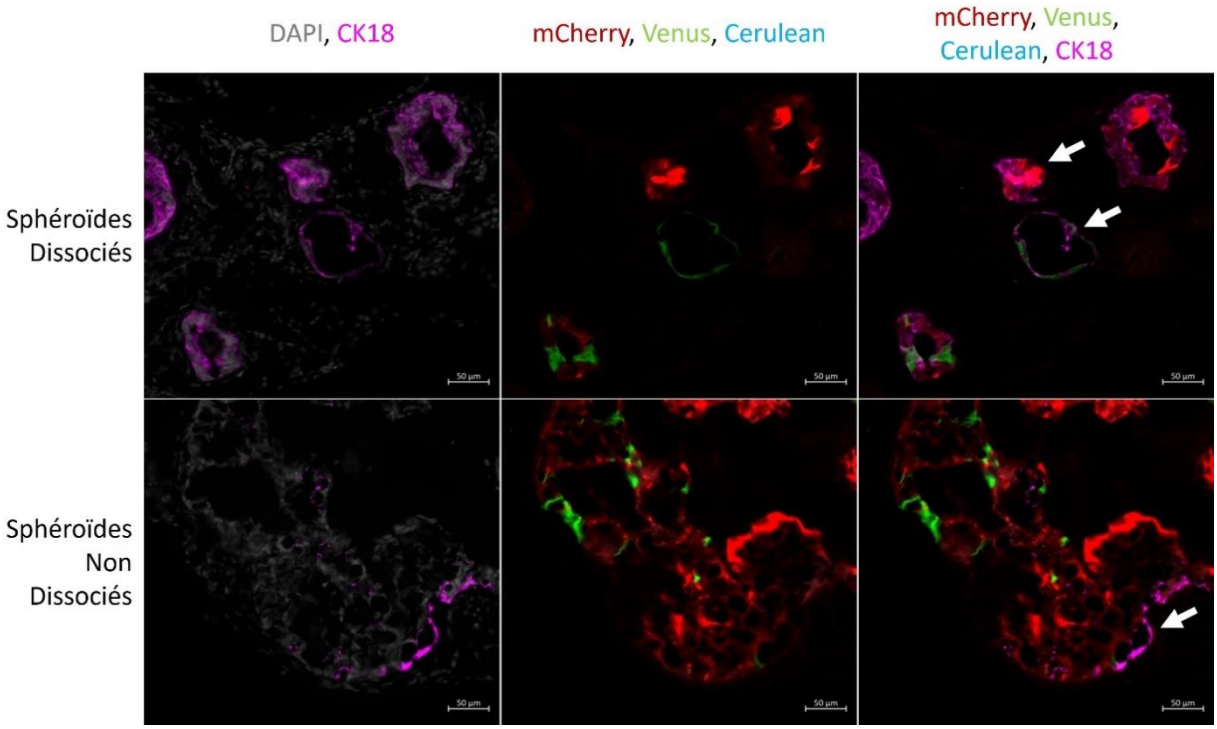


Figure 39 : Mise en évidence de la propriété non différenciée de certaines populations cellulaires des tumeurs issues de sphéroïdes xénogreffés.
Marquage en IF sur coupes congelées de la protéine du cytosquelette CK18 dans les tumeurs RVB-TRα1 modulé issues de sphéroïdes dissociés, où les flèches montrent les cellules positives à CK18 (en haut exprimant mCherry, en bas exprimant Venus) et issues de sphéroïdes entiers, où la flèche indique une zone doublement positive pour mCherry et CK18. Les noyaux sont marqués au DAPI (gris) Barre d'échelle : 50µm, Grossissement : 20X.

Une recherche des cellules prolifératives a ensuite été menée avec un marquage de la phospho-Histone H3, spécifiquement exprimée lors de la mitose. On note tout d'abord qu'elle est exprimée uniquement dans les tumeurs issues de sphéroïdes dissociées (Figure 40). Elle marque de manière prépondérante les noyaux des cellules mCherry correspondant au clone R45-TRα1-Augmenté et plus rarement quelques cellules non fluorescentes situées dans le stroma de la souris receveuse de la greffe.

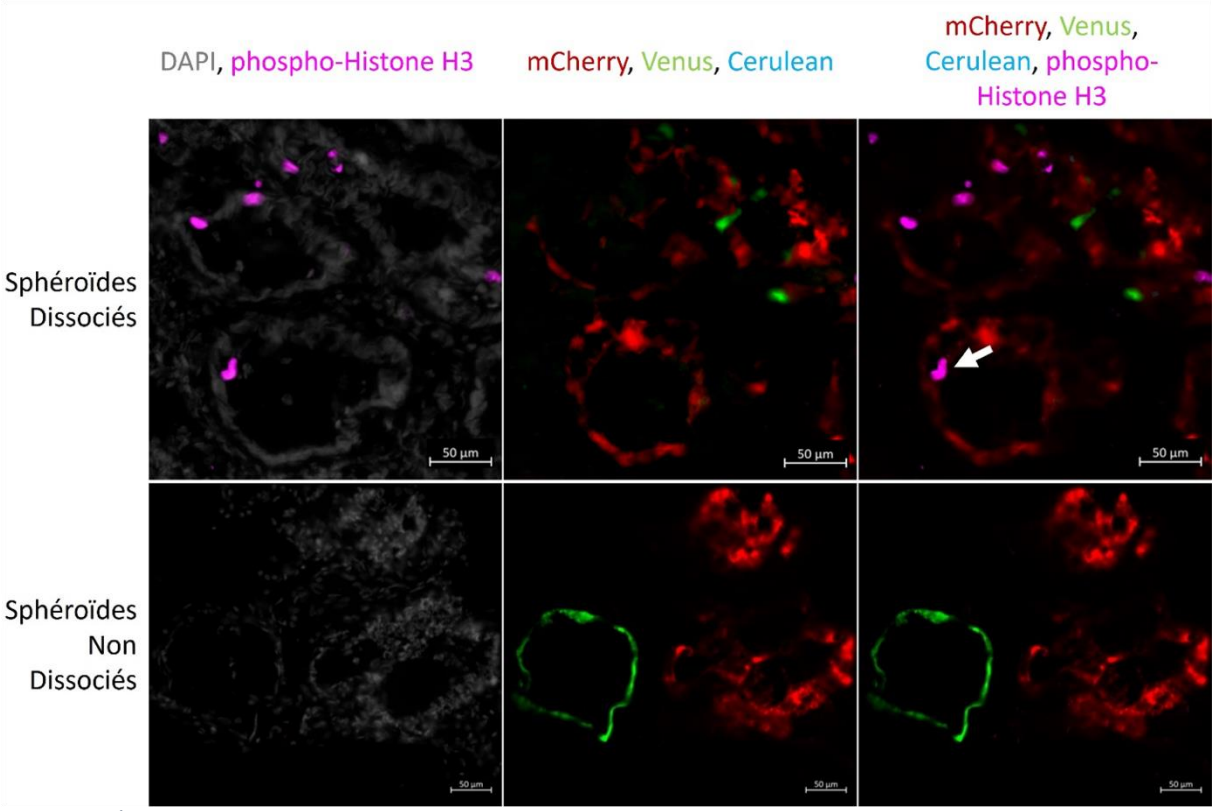


Figure 40 : Étude du marqueur mitotique phospho-Histone H3 pour caractériser les tumeurs de Caco-2/TC-7-RVB. Marquage en IF sur coupes congelées du marqueur de prolifération phospho-Histone H3 dans les tumeurs RVB-TRα1 modulé issues de sphéroïdes dissociés (La flèche pointe une zone exprimant la mCherry et la phospho-Histone H3) et issues de sphéroïdes entiers. Les noyaux sont marqués au DAPI (gris) Barre d'échelle : 50µm, Grossissement : 20X.

Pour une identification plus précise des cellules non différenciées et prolifératives, des marquages de l'éphrine B2 (cellule souche) [89] et de la cycline D1 (marqueur du cycle cellulaire) [90] ont également été réalisés mais n'ont pas montré de signaux spécifiques (coloration de débris cellulaires présents dans la lumière des tumeurs ; Annexe 9). En revanche, le marqueur ALDH1A1 (Figure 41) exprimé par les CSC du CCR est exprimé au niveau cytoplasmique des cellules tumorales dans les deux types d'implantation. Les cellules positives à ce marqueur expriment généralement la protéine mCherry (TRα1-Augmenté) et plus rarement Venus (V41-TRα1-Normal). Aucune cellule positive au marquage ALDH1A1 et exprimant Cerulean (TRα1-diminué) n'a été décelée.

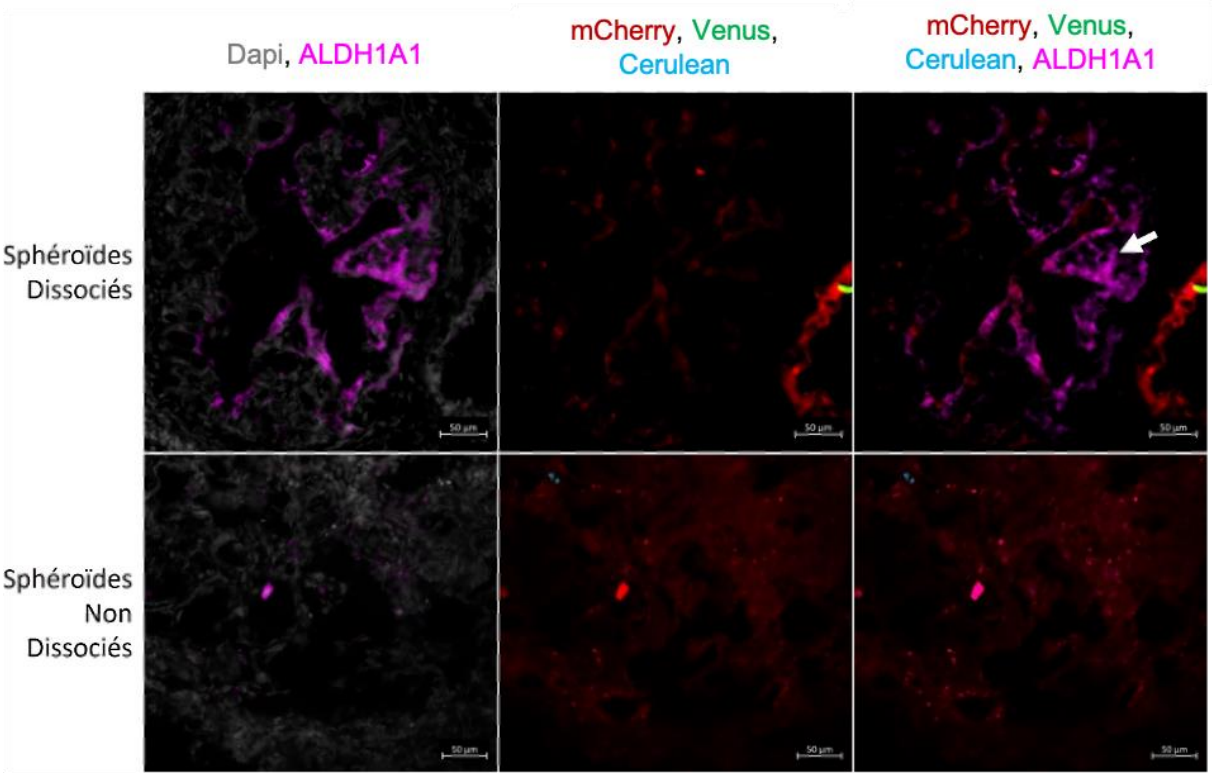


Figure 41 : Mise en évidence de la propriété souche de certaines populations cellulaires des xénogreffes.
Marquage en IF sur coupes congelées du marqueur des CSC ALDH1A1 dans les tumeurs RVB-TRα1 modulé issues de sphéroïdes dissociés (la flèche montre les structures ALDH1A1 et mCherry positives) et issues de sphéroïdes entiers. Les noyaux sont marqués au DAPI (gris). Barre d'échelle : 50µm, Grossissement : 20X

Finalement, l'étude des cellules différenciées a été réalisée, dans le but de compléter la caractérisation des différentes populations intra-tumorales. Le marqueur de la protéine membranaire cytokératine 20 (CK20) montre des cellules positives, uniques ou regroupées en petit nombre (Figure 42), au niveau des tumeurs, là où les cellules sont très resserrées les unes des autres et apparaissent bien polarisées. Plus précisément, nous remarquons que la tumeur issue de sphéroïdes dissociés présente plus de structures positives à ce marquage par rapport à l'autre type de tumeur et que les quelques cellules positives à ce marquage sont en large prédominance mCherry.

Les différents types cellulaires ont également été analysés ; les cellules goblet grâce au marqueur Mucine 2 [91] ; les cellules entéro-endocrines grâce à la chromogranine A [92], mais également les cellules de Paneth grâce au marqueur lysozyme [93] ainsi que les « tuft cell » grâce au marquage par Dcamkl1 (Doublecortin-like and CAM kinase-like 1) [94] et pour finir l'aldolase B et C pour les entérocytes [95]. Ces marquages se sont révélés aspécifiques en ne marquant que les débris cellulaires (Annexe 9).

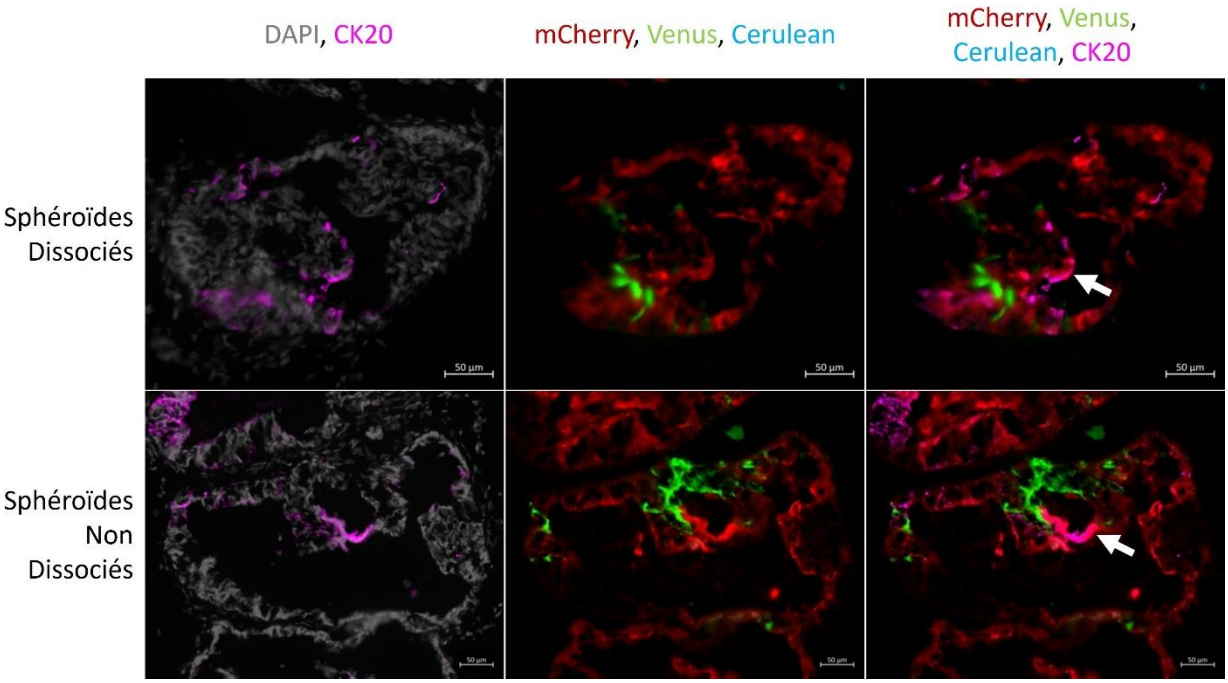


Figure 42 : Mise en évidence de la présence de cellules différenciées dans les xénogreffes.
Marquage en IF sur coupes congelées de la protéine du cytosquelette CK20 dans les tumeurs RVB-TRα1 modulé issues de sphéroïdes dissociés et issues de sphéroïdes entiers. Les flèches montrent les structures CK20 positives, les noyaux sont marqués au DAPI (gris). Barre d'échelle : 50µm, Grossissement : 20X.

III) Mise en place des organoïdes tumoraux humains RVB

Dans l'objectif d'effectuer des études avec un modèle plus complexe et représentatif de la physiopathologie du CCR, le modèle LeGO RVB a ensuite été mis en place dans des cultures d'organoïdes dérivés de tumeurs humaines.

Ces tumoroïdes sont composés de différentes populations cellulaires recapitulant la complexité et l'hétérogénéité de la tumeur d'origine [96]. De plus, nous avons montré précédemment que les CCR présentent une grande hétérogénéité intra- et inter-tumorale des niveau d'expression de TRα1 [4]. Ainsi, l'approche de code-barres RVB sera appliquée aux tumoroïdes humains pour analyser dans un modèle plus intégré et pertinent en cancérologie humaine, la compétition entre les clones, dans un contexte de niveaux endogènes mais naturellement hétérogènes de TRα1. Cette approche permet de suivre au cours du temps l'expansion des différents sous-types cellulaires *in vivo* (xénogreffes) mimant la prise et l'expansion tumorale. Le niveau d'expression de TRα1 sera déterminé dans chaque sous-population fluorescente et mis en corrélation avec les différents phénotypes (souche, progéniteur, différencié) et caractéristiques (capacités prolifératives et/ou d'invasion). Afin d'étudier un grand nombre de sous-populations, les tumoroïdes seront triplement infectés, puis triés pour ne conserver que les cellules fluorescentes ayant intégré les vecteurs LeGO. Après amplification, les tumoroïdes fluorescents seront greffés dans des souris immunodéficientes. Il sera également possible de traiter les animaux avec de l'hormone T3 pour étudier les effets des HT sur la croissance tumorale et l'expansion clonale.

A) Définition du titre d'infection : analyse morphologique

Dans le cadre de la mise en place du modèle RVB dans les cultures de tumoroïdes humains, une approche d'observation de la croissance des structures et de l'expression des protéines fluorescentes transduites par les infections a été mise en œuvre. Pour cela, une gamme

d'infection s'étendant d'un titre viral de $1,4x10^6$ UI/mL à $1,4x10^8$ UI/mL de chaque virion RVB a été réalisée. La morphologie des tumoroïdes et leurs fluorescences sont comparées au septième jour après l'infection lentivirale avec les trois virions en simultané (triple infection) (Annexe 10). Le but est de trouver un équilibre entre capacité quasi-normale de croissance et intensité de fluorescence.

L'infection suivant la gamme de titration montre après sept jours qu'aux deux titres les plus dilués, les tumoroïdes sont de la même taille que ceux non infectés (entre 100 et 150 µm de diamètre). Cependant, leur intensité de fluorescence est basse et difficile à observer. Dans les trois concentrations médianes de la gamme, la taille et la morphologie des tumoroïdes sont comparables à celles du contrôle et l'intensité de fluorescence d'intensité suffisante pour les observations en microscopie. Enfin, aux deux titres les plus concentrés, la fluorescence est forte mais les tumoroïdes peu développés, des cellules mortes sont également présentes dans le milieu de culture.

Nous avons noté que quel que soit le titre d'infection, l'intensité de fluorescence de la protéine Venus reste plus faible que celle de mCherry et Cerulean. Une erreur de titration a probablement eu lieu lors de la production de la suspension virale et est actuellement en cours d'estimation.

Une nouvelle gamme d'infection a ensuite été mise en place, restreintes aux titres intermédiaires les plus intéressants (Tableau 8).

	1X	**0,75X**	**0,50X**
Titre viral (UI/mL)	$1,40x10^7$	$1,05x10^7$	$0,70x10^7$

Tableau 8 : Gamme de dilution optimisée de chaque virion pour l'infection lentivirale RVB des tumoroïdes humains.

La fluorescence montre des résultats qui diffèrent peu d'un titre à l'autre, avec comme précédemment une plus forte expression des protéines mCherry et Cerulean (Figure 43).

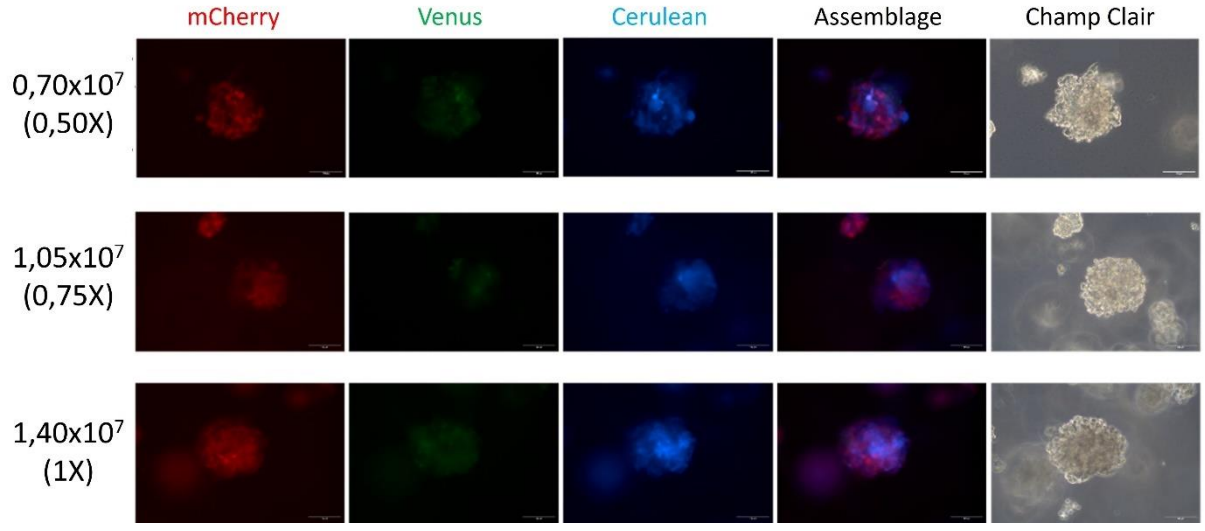


Figure 43 : Infection optimisée des organoïdes tumoraux humains.
L'infection des tumoroïdes avec des particules virales selon la gamme de dilution optimisée montre des structures tridimensionnelles avec des niveaux de fluorescence plus faciles à observer que dans les conditions plus extrêmes de la première gamme de dilution. Observation microscopique effectuée sept jours après l'infection, au grossissement 20X, barre d'échelle 100 µm.

Pour utiliser une approche plus quantitative, des mesures de l'aire des structures ont été effectuées. Le tableau regroupant l'ensemble des mesures réalisées est présenté en Annexe 11 et une synthèse des résultats est montrée dans la Figure 44.

De manière générale, l'évolution de l'aire des tumoroïdes augmente au cours du temps de façon exponentielle. Dans les conditions les plus précoces, jusqu'au troisième jour de culture, il n'y a pas de différence significative entre les aires des structures aux différents titres d'infection. Cependant, dès le jour 4, les tumoroïdes infectés avec 1,40x10^7 UI/mL de chaque virion ont une aire significativement plus faible que les structures contrôles non infectées. Après sept jours en culture, ce sont aux titres 1,40x10^7 UI/mL et 1,05x10^7 UI/mL que les aires sont significativement plus petites par rapport aux tumoroïdes contrôles.
Les tumoroïdes infectés 0,70x10^7 UI/mL ont une aire qui n'est significativement pas différente des conditions contrôles non infectées pendant les sept jours de culture.

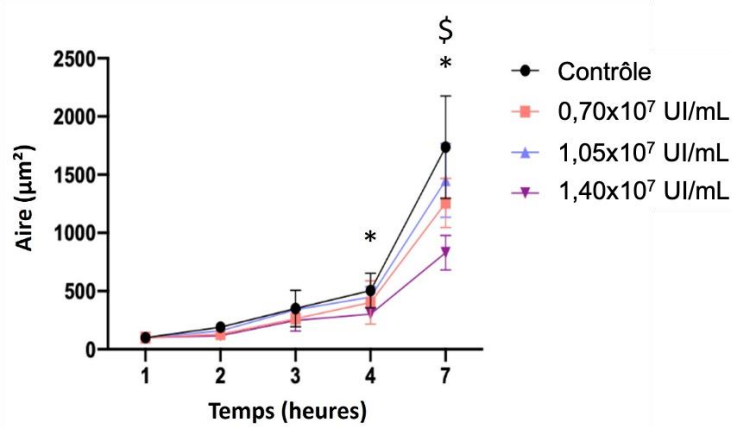


Figure 44 : Mesure de l'aire des tumoroïdes humains après infection lentivirale RVB pendant 7 jours. Chaque point de la courbe représente la moyenne du dénombrement par champ optique (n = 4) ± l'écart type, en fonction de la condition d'infection RVB aux jours 1, 2, 3, 4 et 7. Analyse statistique par test de Student non paramétrique. Aux jours 1, 2 et 3 il n'y a pas de différence significative entre les tumoroïdes infectés et le contrôle (P > 0,05). Au quatrième jour, le titre 1,40x10^7 UI/mL est significativement différent du contrôle (*) et au septième jour 1,40x10^7 UI/mL (*) et 1,05x10^7 UI/mL ($) sont significativement différents du contrôle avec P ≤ 0,01.

B) Définition du titre d'infection : approche quantitative par titration en cytométrie en flux

Une analyse par cytométrie en flux a été réalisée le septième jour, sur les tumoroïdes infectés selon la gamme d'infection RVB optimisée aux titres 0,70x10^7 UI/mL, 1,05x10^7 UI/mL et 1,40x10^7 UI/mL (Figure 45). L'analyse a été effectuée sur plus de 50 000 cellules par condition. L'ensemble des résultats de la cytométrie sont présentés en Annexe 12. Ces résultats sont considérés préliminaires et n'ont donc pas été analysés statistiquement.

Les efficacités totales d'infection (fluorescence totale) sont proches les unes des autres aux trois titres d'infection. Elles s'élèvent à 75,5 % à 0,70x10^7 UI/mL, 72,5 % à 1,05x10^7 UI/mL et 76,5 % à 1,40x10^7 UI/mL.

A 0,70x10^7 UI/mL, 62 % des cellules expriment la protéine mCherry, 54 % expriment Venus et 49 % Cerulean. A 1,05x10^7 UI/mL, la répartition des expressions des trois protéines est légèrement moins homogène avec 68 % de cellules mCherry, 55 % de Venus et 37 % de Cerulean. Enfin, à 1,40x10^7 UI/mL, les proportions sont proches de celles observées lors de l'infection à 0,70x10^7 UI/mL avec 69 % de cellules mCherry, 57 % de Venus et 43 % de Cerulean.

L'analyse de la répartition des sous-populations fluorescentes (rouge, verte, bleue, jaune, cyan, magenta et blanche) aux différentes conditions d'infection révèle que, dans l'ensemble, chaque sous-population représente entre 10 et 20 % de la fluorescence totale. Aux trois titres d'infection, les populations rouges sont environ deux fois plus conséquentes que les population bleues. Des observations similaires sont effectuées dans les populations jaunes qui sont deux à trois fois plus importantes que les populations cyans.
Cette analyse reste une estimation préliminaire qui doit être répétée pour faire l'objet d'analyses statistiques.

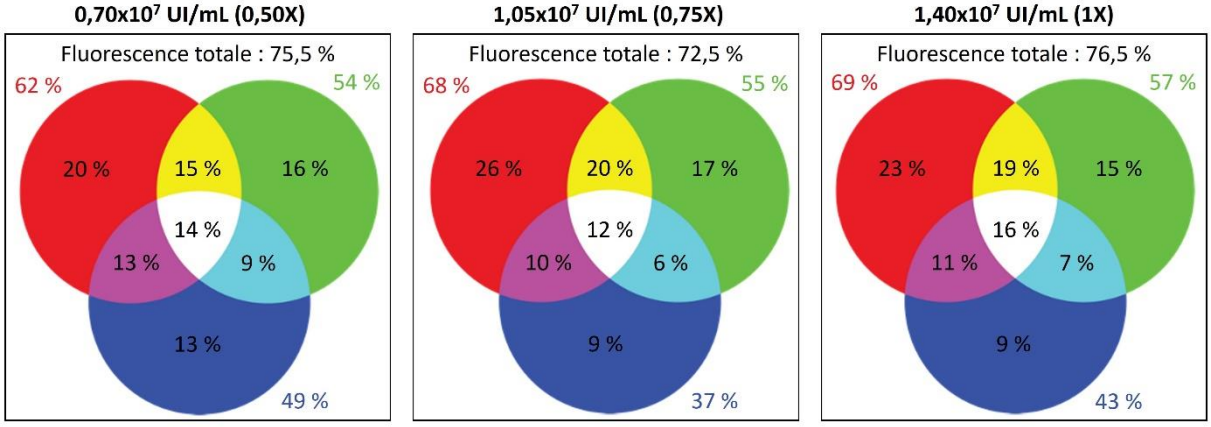


Figure 45 : L'efficacité d'infection et la répartition des différents clones cellulaires est similaire entre les trois titres d'infection RVB des tumoroïdes humains.
Aux titres d'infection 0,70x10⁷ UI/mL, 1,05x10⁷ UI/mL et 1,40x10⁷ UI/mL, l'efficacité totale d'infection avoisine 75 %. Sept sous-populations fluorescentes sont générées et quantifiées par cytométrie en flux une semaine après l'infection. En moyenne, 15 % de chaque sous-population rouge, verte, bleue, jaune, cyan, magenta et blanche sont quantifiées.

Dans le cadre d'une étude pilote, un tri cellulaire (Annexe 13) a été réalisé sept jours après une nouvelle infection des tumoroïdes humains, triplement infectés à 1,40x10^7 UI/mL. Nous avons noté que les sept populations fluorescentes ne sont pas réparties équitablement. Cependant, la fluorescence est suffisante pour effectuer des tests préliminaires. Ainsi, nous avons généré une culture de tumoroïdes multiple-fluorescents qui ont été greffés dans des souris immunodéficientes NOD-scid en intra-veineuse et en sous-cutanée (injection de 50 000 cellules). Ces expérimentations sont en cours et des tumeurs issues d'injection sous-cutanée ont été prélevées. Quatre tumeurs ont été décelées deux semaines après l'implantation et prélevées un mois après la greffe (5 à 10 mm de diamètre). Elles seront analysées par des marquages en hématoxyline/éosine et en immunofluorescence.

Discussion

I) Mise en place des lignées d'adénocarcinome colique humain Caco-2/TC-7 RVB

Le système LeGO code-barres RVB permet le développement d'un modèle fluorescent de lignage cellulaire prospectif par génération aléatoire de populations clonales. Sa mise en place facilite le suivi de clones cellulaires colorés et de phénotypes différents au sein d'une structure complexe (e.g. épithélium intestinal sain ou tumeur). Cette technique offre également la possibilité de suivre au cours du temps l'évolution dynamique des sous-types cellulaires ou même d'une cellule unique, et d'en étudier la prolifération, la différenciation ainsi que ses interactions/régulations avec d'autres sous-types.

Dans ce système prospectif, l'évolution des populations clonales est suivie dans le temps, puis le phénotype et l'identité des clones d'intérêt sont déterminés a posteriori. A l'inverse, dans un système de lignage rétrospectif, une population est suivie en fonction de son expression d'un marqueur spécifique (protéine, mutation d'un gène : par exemple suivi des cellules qui ont subi une perte de fonction du gène *APC*). Pour résumer, le lignage prospectif présente l'avantage de marquer aléatoirement des clones et de les isoler (tri en cytométrie, microdissection laser) pour une caractérisation ultérieure. En plus du suivi cellulaire, cette approche permet de déceler des nouvelles populations ou des évènements rares survenus au cours d'un processus cellulaire (par exemple retracer l'origine d'une cellule métastatique).

Le suivi peut être effectué selon deux paramètres : la fluorescence (type et intensité) ainsi que le site d'insertion des vecteurs lentiviraux permettant l'expression des protéines fluorescentes. En combinant l'expression des trois protéines fluorescentes mCherry (rouge), Venus (vert) et Cerulean (bleu), les infections peuvent engendrer sept populations fluorescentes de couleurs rouge, vert, bleu lors d'intégration d'un seul des trois vecteurs ; cyan, jaune ou magenta lors de l'intégration simultanée de deux vecteurs et enfin blanc lors de l'intégration simultanée des trois vecteurs (Figure 22). Les intégrations étant constitutives, la fluorescence est stable au cours du temps [66], [97].

Cependant, il faut noter qu'au sein d'une population d'une même couleur, plusieurs clones d'intensités de fluorescence différentes peuvent être présents, permettant la complexification du modèle en élargissant le nombre de clones à suivre au cours du temps. Ces différences d'intensités peuvent être causées par un nombre différent d'évènements d'intégration des vecteurs dans le génome de l'hôte mais également par les sites d'insertion eux-mêmes. L'insertion au niveau d'un gène dont la transcription est très active engendrera une forte production de protéine fluorescente et ainsi une intensité élevée. A l'inverse, si l'intégration a lieu au niveau d'un gène faiblement exprimé ou ayant une activité instable dans le temps (par exemple régulé par le cycle circadien) la production protéique sera faible et/ou trop variable dans le temps, induisant potentiellement un biais important dans le suivi du lignage.

Pour ces raisons, les sites d'insertion des vecteurs LeGO doivent être soigneusement contrôlés. Différentes techniques de séquençage permettent la détermination des sites d'intégration de fragments d'ADN comme la PCR médiée par ligation [98], [99] ou le séquençage haut débit de nouvelle génération (Next Generation Sequencing NGS). Dans le cadre de ces travaux, les sites d'insertion des clones sont en cours de caractérisation par la

technique « Ins-Seq » (ProfilExpert, Lyon). Cette méthode est basée sur un séquençage de l'ADN génomique de chaque clone, afin de déterminer les sites d'insertion de chaque vecteur LeGO. Cette information sera utilisée pour vérifier en routine chaque clone par PCR après création d'une banque d'oligonucléotides qui permettent d'amplifier les inserts dans les région du génome [100].

En offrant deux paramètres de suivi (fluorescence et site d'insertion), le code-barres RVB est ainsi plus complexe qu'un modèle fluorescent simple (par exemple protéine reportrice) et rend possible de distinguer des clones différents d'une même couleur. De plus, il permet l'étude de sous-populations ayant des génomes identiques mais présentant des phénotypes différents [9], [11]. Ceci est une caractéristique importante car, en principe, elle permettra de comparer le devenir d'un même clone au cours du temps et/ou selon un traitement.

Cependant, il est important de considérer que cette approche génère une quantité importante de clones, théoriquement une infinité, ce qui engendre une quantité très importante de données à analyser. Pour pallier ce problème, il est possible de définir une stratégie en fonction des besoins expérimentaux. Le tri cellulaire et la création d'une banque de lignées cellulaires ou de tumoroïdes RVB représentent ainsi une manière de choisir a priori le nombre de clones fluorescents que l'expérimentateur souhaite utiliser. Ceci permet également d'adapter la complexité de l'expérimentation et de l'analyse en fonction de la question biologique, des besoins et des outils à disposition. D'autres modèles de lignage fluorescent, tel que le Brainbow [73], sont inductibles de manière dose dépendante, ce qui permet de gérer le degré de complexité sans passer par des étapes intermédiaires de tri cellulaire qui peut compromettre la diversité d'une population (mort de certaines cellules lors de la remise en culture après le tri). A ce stade de notre projet, nous avons décidé de maximiser la complexité en utilisant le système LeGO.

A) Infection optimale RGB Caco2

En utilisant différentes gammes de dilution pour déterminer le titre optimal de chaque suspension virale, nous avons pu montrer que les lignées d'adénocarcinome colique humain Caco-2/TC-7, ensemencées à 50 000 cellules, peuvent être infectées aux titres suivants pour engendrer une efficacité d'infection de l'ordre de 60 % : mCherry : $2{,}58 \times 10^5$ UI/mL ; Venus $2{,}30 \times 10^5$ UI/mL ; Cerulean $2{,}02 \times 10^5$ UI/mL. Le rendement d'une infection lentivirale dépend du ratio entre la quantité de particules virales et le nombre de cellules. D'une expérimentation à une autre, ce rapport doit donc être strictement identique pour assurer la reproductibilité des infections. Pour comparer les résultats entre eux, il est essentiel de travailler avec des conditions et paramètres identiques d'observation des fluorescences en microscopie et en cytométrie en flux.

Conformément à ce qui est décrit dans la littérature, nous avons pu observer qu'en dessous de 50 % d'infection, les intensités de fluorescence sont trop faibles pour être correctement observées. En revanche, au-dessus de 70 %, le risque d'insertions mutationnelles et/ou délétères est grand et les infections ont un effet néfaste sur les cultures cellulaires [66]. Pour limiter ce risque, les travaux de référence [66] ont déterminé les titres d'infection en visant une multiplicité d'infection, c'est-à-dire un nombre d'intégration des vecteurs par cellule à 0,7 [101]. Cette moyenne, déterminée statistiquement sur une distribution de Poisson du nombre d'intégrations en fonction du titre viral, permet de montrer qu'à des multiplicités d'infection

trop élevées, le risque d'insertion mutationnelle devient alors trop important. En complément, l'identification des sites d'insertion permet aussi de déterminer si l'intégration n'a pas eu lieu dans la séquence d'un gène essentiel au fonctionnement normal de la machinerie cellulaire.

En parallèle, même dans des conditions optimales (efficacité de 60 %), les infections induisent un stress cellulaire. Pour caractériser les effets dus à la procédure d'infection, un contrôle peut être effectué avec un vecteur vide. Nous n'avons pas effectué ce contrôle lors de l'induction d'expression du système LeGO et nous nous sommes uniquement basés sur des comparaisons morphologiques (aspect cellulaire et capacité proliférative) par rapport à des cultures contrôles non infectées. Ce contrôle d'infection d'un vecteur vide doit être inclus dans nos prochaines expériences.

Bien que les cellules cancéreuses présentent un certain nombre de mutations et une instabilité génomique importante [102], l'insertion des vecteurs LeGO dans les conditions d'infection optimales n'aggraverait théoriquement pas cette instabilité [66]. Cela justifie l'intérêt de la titration des vecteurs dans le but d'anticiper des risques (toxicité cellulaire, insertions mutationnelles, *etc.*). En effet, même si on peut supposer qu'une mutagenèse trop importante provoque la mort des clones, il peut s'avérer qu'ils aient un avantage à l'expansion [103]. En tout cas, l'analyse des sites d'insertion est un point fondamental dans le choix des clones cellulaires. De plus, pour vérifier que le traçage cellulaire n'est pas affecté par l'évolution des clones perdant ou amplifiant les copies des cassettes insérées par infection, le code-barres RVB doit être vérifié par PCR dans chaque clone avant et après expérimentation.

B) Banques cellulaires Caco-2/TC-7-RVB

L'infection aléatoire et l'isolement par tri cellulaire suivi d'une expansion clonale permet de créer plusieurs clones dont il est ensuite possible d'analyser le phénotype, indépendamment les uns des autres, mais aussi d'effectuer des analyses dans des cultures multi-clonales. Nous avons observé que, en moyenne, 10 % des clones ensemencés après tri cellulaire se développent. Ce ratio aussi faible s'explique notamment par l'ensemencement d'une seule cellule par puits d'une plaque 96, causant un environnement particulièrement stressant.

De manière intéressante, les clones qui prolifèrent ne se développent pas tous à la même vitesse et montrent différents phénotypes dans leur croissance. Ces différences peuvent être expliquées par l'intégration aléatoire des vecteurs LeGO. Il peut aussi s'agir de sous-types cellulaires, déjà présents dans la lignée cellulaire, aux statuts prolifératifs différents, comme montré dans le cas des cellules Caco-2 [104, p. 2]. Cette deuxième hypothèse conforterait donc notre idée de présence de plusieurs sous populations au sein de notre modèle. Les plus rapides peuvent être congelées après environ trois semaines de culture.

De plus, les clones générés n'ont pas tous la même intensité de fluorescence (Annexe 5, intensités en unité arbitraire déterminées lors du tri cellulaire). A partir de ces clones, il est alors aisé d'utiliser plusieurs clones d'une même couleur de fluorescence mais d'intensités différentes dans une même expérimentation. En revanche, il est utile d'anticiper que plus une population est rare, plus elle sera difficile à observer et il sera donc préférable qu'elle porte de base une intensité fluorescente élevée pour favoriser sa détection et son analyse.

II) Études des effets de la modulation de TRα1 sur l'expansion clonale

A) Modulation de TRα1 dans les Caco-2/TC-7

Comme il a été montré précédemment, la protéine TRα1 est impliquée dans la biologie des CS intestinales [6] et est surexprimée dans les CCR [4], [8]. Cependant, il est important de noter que cette expression est hétérogène (Figure 12) [4], [8] et que la signification biologique ainsi que les effets de cette expression hétérogène n'ont jamais été abordés en biologie du CCR.

La modulation du niveau d'expression de TRα1 peut être effectuée par infection lentivirale et présente l'avantage d'être constitutive, donc stable dans le temps [97]. La surexpression et la diminution sont induites par infection avec un vecteur pLKO permettant soit l'expression de TRα1 soit celle d'un ARN-interférant selon un protocole déjà utilisé par notre équipe [8].

Dans nos études précédentes, l'utilisation de ces vecteurs avait montré un haut taux d'infection des cellules, supérieure à 90 %. Dans ce cas, les cellules infectées n'ont pas été sélectionnées. Les quantifications de la modulation de TRα1 aux niveaux ARNm et protéique ont été effectuées sur la population totale. Il en résulte probablement l'induction d'une hétérogénéité au sein d'une population. Cependant, le manque de sélection ne nous permet pas de savoir, par exemple dans le cas de la régulation de TRα1, si les clones analysés présentent la modulation attendue du niveau ou s'ils ont échappé à l'infection. L'absence de sélection est volontaire, pour limiter le stress cellulaire. La vérification par PCR de la présence du vecteur viral dans le génome cellulaire ou la quantification de leur niveau de TRα1 (qPCR, sc-RNA-seq, *etc.*) permettra de discriminer entre ces deux possibilités.

Lors des expérimentations décrites dans ces travaux, le niveau de TRα1-Augmenté est en moyenne dix fois plus important que le niveau endogène quantifié dans les cultures de Caco-2/TC-7 sauvages. Cette valeur a été choisie car dans le CCR, le niveau de TRα1 peut être augmenté jusqu'à cinq fois par rapport aux muqueuses saines [8]. Nous avons volontairement choisi une valeur plus importante pour accentuer légèrement les effets, en restant tout de même dans un ordre de grandeur physiologiquement pertinent. Lors des infections contrôle, le niveau de la protéine TRα1 dans le clone V41-TRα1-Normal est légèrement plus faible que le niveau de la lignée parentale non infectée. Cette infection avec un vecteur vide, montre que les particules virales ont un effet sur les cultures, comme déjà reporté dans le cas du ralentissement du métabolisme ou en induisant du stress [103]. Enfin, dans le cadre de la sous-régulation, le clone B7-TRα1-Diminué présente une diminution de l'expression de TRα1 d'un facteur cinq à dix par rapport à la lignée contrôle infectée, là encore pour rester dans un ordre de grandeur physiologique, comme reporté dans Uchuya-Castillo [8].

B) Étude *in vitro* de la dynamique des sphéroïdes RVB-TRα1-modulés au cours du temps

Les sphéroïdes issus de Caco-2/TC-7 permettent de générer et analyser de manière reproductible des structures tridimensionnelles, modélisant de manière simplifiée des tumeurs coliques [81]. Nous avions également confirmé qu'au sein de ces structures, les cellules sont hétérogènes et montrent une hiérarchisation avec la présence de CSC, de progéniteurs prolifératifs et de cellules différenciées [81], [105]. Cette organisation se définit au cours du temps. Tout d'abord, au deuxième jour après formation des sphères, les structures d'une cinquantaine de microns de largeur ressemblent plutôt à des agrégats avec un taux important de cellules en prolifération [81]. Rapidement, les structures s'arrondissent

et un lumen apparaît. A ce stade (4-5 jours après la formation des sphères) les cellules en prolifération et les CSC sont localisées en bordure des structures, mimant un compartiment de prolifération/souche (Figure 46, A). Par contre, le lumen, délimité par une monocouche cellulaire, rappelle le compartiment de différenciation [2], [81] (Figure 46, A). Dans les conditions les plus tardives, les sphéroïdes s'élargissent jusqu'à environ 500 µm et ils sont caractérisés par une diminution des cellules en prolifération.

Pour étudier les effets de la modulation de TRα1 dans des populations cellulaires spécifiques et l'expansion clonale, le modèle des sphéroïdes de Caco-2/TC-7 nous est apparu très approprié. Les sphéroïdes ont été générés à partir d'une suspension cellulaire mixte de trois clones fluorescents monocolores, arborant chacun un niveau de TRα1 différent : R45-TRα1-Augmenté (mCherry), V41-TRα1-Normal (Venus) et B7-TRα1-Diminué (Cerulean). Les cultures ont été analysées à différents temps pour étudier la composition clonale et associer à chaque clone le statut CSC, prolifératif ou différencié.

Tout d'abord, nous avons observé qu'il existe une dynamique de la répartition clonale des sphères, au niveau de la proportion des clones mais également de leur localisation. En effet, aux jours 2 et 4 de culture, les clones V41-TRα1-Normal composent majoritairement les structures et sont situés sans distinction au centre comme en périphérie des sphères, tandis que les quelques populations R45-TRα1-Augmenté sont localisées en périphérie. Après sept jours, la plus grande partie des structures est rouge, soulignant une expansion préférentielle des clones où TRα1 est surexprimé, en accord avec les travaux précèdent de l'équipe [6], [50], [51]. A ce stade, les populations vertes sont localisées plutôt au centre des sphères. On peut supposer que les clones R45-TRα1-Augmenté présents dans la zone proliférative/cellules souches en bordure, ayant un statut hautement prolifératif, se développent au détriment des clones V41-TRα1-Normal qui sont « poussés » vers la lumière correspondant à la zone différenciée. Il est important de souligner que dans cette expérience, les clones bleus (B7-TRa1-Diminué) ne sont pas retrouvés dans les sphéroïdes aux différents temps analysés. Leur statut peu prolifératif empêche probablement l'expansion dans les conditions expérimentales de culture *in vitro*.

En résumé, ces résultats suggèrent fortement que les niveaux de TRα1 déterminent la croissance et la hiérarchisation cellulaire des sphéroïdes, puisque la composition clonale évolue clairement au cours du temps.

Pour analyser plus en détail l'évolution et les caractéristiques des clones RVB composant les sphéroïdes, des marquages en IF des cellules non différenciées (CK18), différenciées (CK20), en mitose (phospho-Histone H3) et des cellules souches cancéreuses (ALDH1A1) ont été effectués (Figure 46, A). Nous avons pu montrer qu'au cours de la croissance, le nombre de cellules non différenciées CK18 positives diminue, alors que celui des cellules différenciées exprimant la CK20 augmente. Ce patron se superpose avec la diminution des CSC exprimant le marqueur ALDH1A1. Par contre, les cellules en prolifération phospho-Histone H3-positives restent assez stables au cours du temps avec une diminution plus nette au dernier temps analysé. Les cellules Caco-2 sont connues pour se différencier lorsqu'elles arrivent à confluence dans les cultures en monocouche [87]. Ce même processus semble avoir eu lieu dans le cas des cellules CK20-positives formant le contour du lumen des sphères.

Nous avons aussi pu observer que les cellules en prolifération phospho-Histone H3-positives, sont localisées en bordure externe des sphéroïdes, comme les cellules non différenciées CK18-positives et les CSC ALDH1A1-positives (Figure 46, A). Ce statut non différencié et prolifératif semble d'abord corréler avec le clone TRα1-Normal dans les sphères de 2 ou 4 jours. L'expansion des clones rouges TRα1-Augmenté et l'éloignement des clones verts de la zone prolifération/souche aux temps plus tardifs, restreignent l'expression de ces marqueurs aux clones rouges. Il est intéressant de noter que les clones TRα1-Augmenté sont les premiers à exprimer le marqueur de différenciation CK20 au jour 4, dans les zones internes des structures, tandis que les zones périphériques sont non différenciées. Ces résultats nous laissent supposer que les cellules TRα1-Augmenté ont des capacités prolifératives accrues. Elles sont localisées en périphérie des structures tandis que les cellules en zone intermédiaire sont en voie de différenciation et dérivent des clones actifs [106]. Il semble donc que TRα1-Normal et Augmenté soient impliqués dans la formation des sphères et que c'est TRα1-Augmenté qui est responsable de l'expansion et de la zonation tumorale (Figure 46, B). Ces résultats concordent avec les observations des travaux précédents de l'équipe, avec une induction d'une hyper-prolifération des cryptes par une surexpression de TRα1 dans le modèle murin *vil*-TRα1 [50].

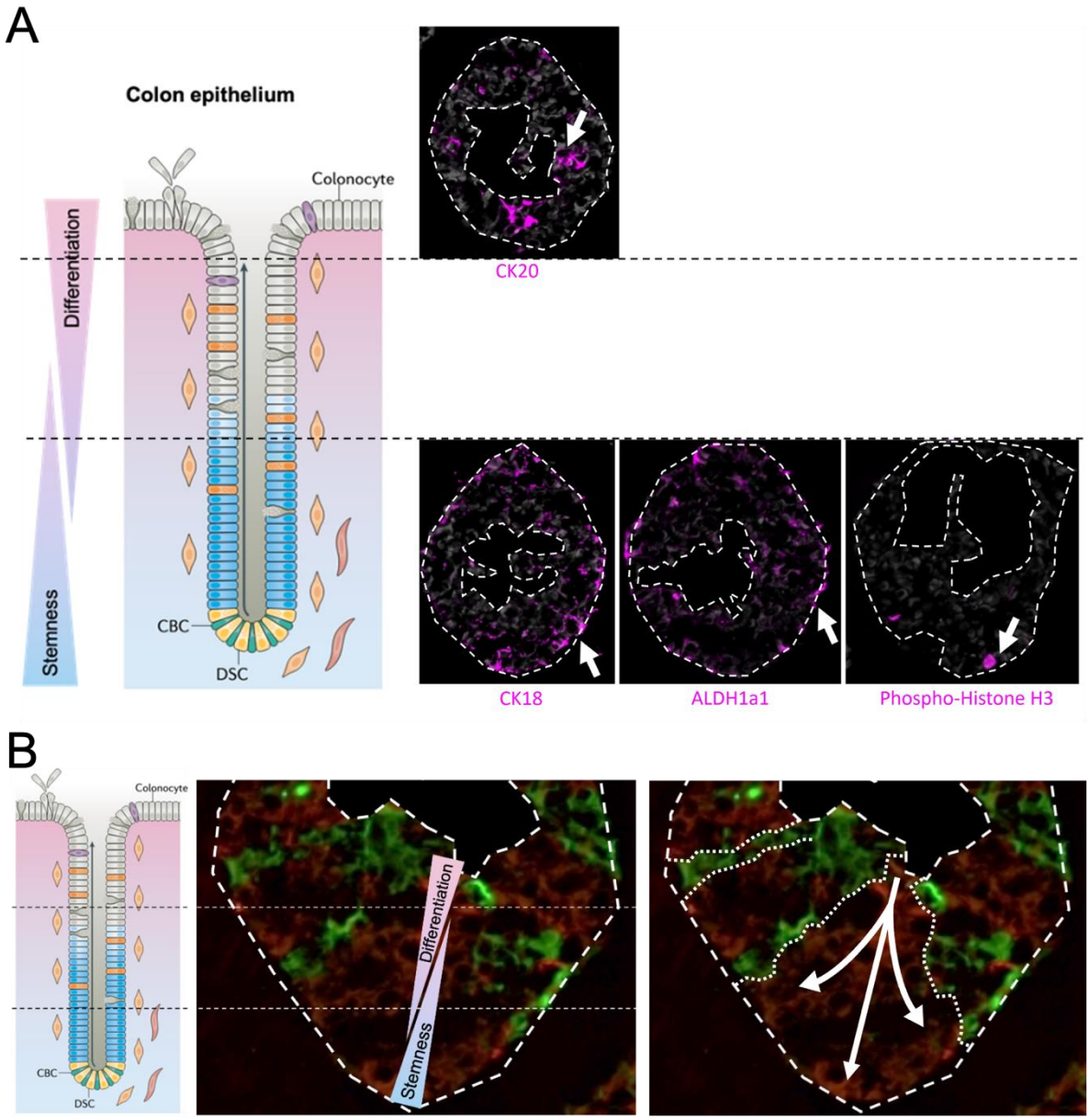


Figure 46 : Les sphéroïdes de Caco-2/TC-7 reproduisent la hiérarchie de l'épithélium intestinal avec l'expression d'un gradient de prolifération et de différenciation.
(A) Les sphéroïdes de Caco-2-RVb-TRα1 modulé montrent au cours du temps l'apparition d'une hiérarchisation cellulaire avec en bordure des marqueurs (marquages magenta indiqué par les flèches) de cellules non différenciées (CK18), prolifératif (phospho-Histone H3) et CSC (ALDH1A1). Cette zonation rappelle l'axe vertical de l'épithélium avec les cryptes intestinales et au centre un lumen (pointillés internes) bordé par des cellules différenciées (CK20) qui sont retrouvées en haut de l'axe. Les noyaux sont marqués au DAPI (gris). (B) Comme dans l'épithélium intestinal, un gradient de différenciation et du statut souche se forme donc, suivant l'expansion des clones RVB. Le clone vert montre une expansion verticale du lumen vers l'extérieur, tandis que les clones rouges plus prolifératifs s'organisent en éventail. Le schéma de l'épithélium est issu de [21].

Nous avons noté au sein des sphéroïdes de 4 jours, un pic du nombre de cellules exprimant ALDH1A1, le marqueur des CSC. Ces cellules sont également réparties dans les clones TRα1-Normal et TRα1-Augmenté. Cette augmentation soudaine et courte dans le temps est peut-être à l'origine de la réorganisation des clones RVB des sphéroïdes. Les clones verts, induits à se différencier, vont perdre l'expression d'ALDH1A1 qui restera limitée par la suite aux cellules non différenciées des clones rouges.

L'absence des clones bleus TRα1-Diminué dans les sphéroïdes suggère que ces clones ne sont pas impliqués dans la formation des sphères. Comme observé lors des mesures de la confluence en Incucyte, ces clones semblent perdre complètement leurs propriétés prolifératives et en test d'expansion clonale (vitesse de prolifération des clones) sont fortement désavantagés. Il est possible que les cellules sous-exprimant TRα1 atteignent un statut de dormance ou de quiescence. Dans ce contexte, il sera intéressant d'enquêter plus en profondeur sur le rôle de ces clones TRα1-Diminué. Ils pourraient être impliqués dans la résistance aux traitements et à une prolifération tardive après une thérapie, provoquant la rechute des patients [9], [11], [68]. Le suivi précoce de ces clones lors de la formation des sphères et des analyses complémentaires permettront de mieux comprendre leur comportement.

Cette étude de la répartition spatio-temporelle des clones en fonction de leur niveau de TRα1 et des différents marqueurs exprimés est importante pour le suivi du processus dynamique de la compétition clonale et l'établissement d'une hiérarchie cellulaire dans des sphères. Cette expérimentation a été menée en trois réplicats mais toutes les données n'ont pas encore été analysées. Pour une modélisation mathématique de nos données, visant à quantifier les proportion RVB et l'expression des marqueurs au cours du temps, nous avons établi une collaboration avec le Professeur Emmanuel Grenier et le Docteur David Coulette (Département de Mathématiques Pures et Appliquées, ENS de Lyon).

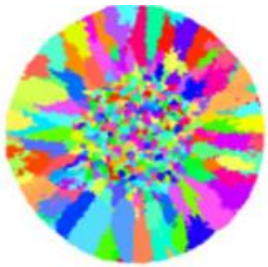


Figure 47 : Exemple de modélisation spatiotemporelle de l'expansion clonale dans une tumeur.
Le modèle de suivi RVB permet le développement de modélisations numériques qui quantifient et récapitulent l'expansion d'une structure cellulaire. Issu de [106].

C) Effets de la modulation TRα1 dans les xénogreffes de sphéroïdes

L'analyse de l'expansion et de la caractérisation des clones selon l'expression de TRα1 a aussi été abordée en xénogreffes des sphéroïdes RVB-TRα1-modulé. Les résultats ont été obtenus à un seul temps après implantation sous-cutanée, relativement long (90 jours). Cette limitation ne permet pas dans le cadre de ce mémoire une analyse dynamique. Nous restreindrons donc la discussion aux résultats les plus marquants et aux similarités/différences avec les sphéroïdes.

Après avoir modulé l'expression du récepteur nucléaire TRα1 par infection lentivirale dans les clones Caco-2/TC-7 mCherry R54-TRα1-Augmenté, Venus V41-TRα1-Normal, et Cerulean B7-TRα1-Diminué, des sphéroïdes ont été générés puis greffés entiers ou dissociés en sous-cutané dans le flanc droit de souris immunodéficientes NOD-scid. Nous avons utilisé ces deux types de xénogreffes car dans le premier cas, nous nous sommes intéressés à la prise et la croissance tumorale. Dans le deuxième cas, nous avons suivi l'expansion d'une tumeur déjà formée. Comme dans le cas des sphéroïdes, nous avons mené des études histologiques et des marquages en immunofluorescence.

Les marquages histologiques à l'hématoxyline/éosine des tumeurs issues des sphères greffées dissociées ou implantées en entier, montrent deux organisations différentes. Tout d'abord, dans le cas des greffes de sphères dissociées, les échantillons sont composés de plusieurs tumeurs de forme sphérique présentant un lumen et délimitées par une monocouche cellulaire compacte et resserrée. Un tissu moins dense et plus lâche englobe ces tumeurs. Dans les échantillons formés de sphères non dissociées, ces tumeurs sont moins nombreuses, plus grandes, peu arrondies et moins délimitées. Elles sont formées de structures « alvéolaires » et d'un tissu lâche. De manière intéressante, des marquages en immunofluorescence ont permis de confirmer que le tissu alvéolé délimitant les cavités est le siège de l'expression de la protéine membranaire EpCAM, spécifique des cellules épithéliales. De plus, toutes ces cellules EpCAM-positives expriment les protéines mCherry/Venus/Cerulean, nous confirmant ainsi que ces structures sont formées par les clones Caco-2/TC-7-RVB dans lesquels l'expression de TRα1 a été modulée. Le tissu lâche ne montre ni l'expression de EpCAM, ni celles des protéines RVB. Ce tissu n'étant pas d'origine épithéliale, il s'agit très probablement d'autres tissus (fibroblastes, adipocytes, cellules musculaires…) de l'animal receveur de la greffe.

Il est intéressant de remarquer que les tumeurs étant différentes selon le mode d'implantation (dissocié *vs* non dissocié), les mécanismes impliqués dans la prise de greffe sont différents. Les tumeurs de sphéroïdes entiers montrent bien un accroissement des sphères, correspondant ainsi au maintien et à l'expansion des clones présents au sein de la tumeur, tandis que les sphères dissociées vont former *de novo* des tumeurs organisées essentiellement en monocouche, rappelant fortement l'organisation de l'épithélium intestinal avec la présence du lumen [2].

La composition majoritaire mCherry-TRα1-Augmenté, similaire à celle observée dans les sphéroïdes, prouve une implication conséquente de TRα1 dans la prise et l'expansion tumorale alors qu'à l'inverse, les cellules Cerulean-TRα1-Diminué ne sont pas maintenues dans la condition dissociée et ne se développent pas dans la condition d'implantation des sphères entières. Il est important de souligner que, contrairement aux sphéroïdes, les xénogreffes permettent d'apprécier la présence des clones bleus. Cela suggère fortement que les cellules sous-exprimant TRα1 sont quiescentes et qu'elles sont fortement désavantagées dans un modèle complètement *in vitro*.

Puisque, dans l'épithélium intestinal et dans le CCR, la prolifération est corrélée au statut indifférencié et souche des cellules, nous nous sommes intéressés au niveau de différenciation des tumeurs. L'expression très étendue de la protéine CK18 dans les clones RVB et EpCAM-positifs nous a permis d'apprécier l'aspect peu ou pas différencié des tumeurs, quel que soit le type de greffe. Ce résultat a été confirmé par l'analyse des cellules différenciées CK20-positives montrant un faible nombre de cellules exprimant ce marqueur. Dans ce cas, les greffes issues de sphéroïdes entiers, sont moins différenciées que celles issues de sphéroïdes dissociés. Finalement, nous avons observé de manière générale peu de cellules en prolifération ou exprimant le marqueur des CSC ALDH1A1. Cela est probablement dû au temps de greffe long. Les analyses de greffes récupérées après 20 et 40 jours, nous permettront d'apprécier davantage la corrélation entre la prolifération, le statut souche et les clones RVB.

Ainsi, une cinétique *in vivo* est actuellement en cours, présentant des points temporels plus précoces, dans le but de suivre plus précisément l'expansion des clones et leurs caractéristiques.

III) Mise en place des organoïdes tumoraux humains RVB

Afin d'étudier plus en détail l'hétérogénéité intra-tumorale et l'implication de TRα1 dans les différents processus tumoraux, nous avons utilisé l'approche de code-barres RVB dans un modèle plus complexe et physiologiquement représentatif des CCR que la culture de lignée cellulaire : les organoïdes tumoraux humains.

Dans le but de déterminer les conditions d'infection RVB optimales des tumoroïdes humains, une gamme d'infection a été réalisée. Pour obtenir une intensité fluorescente satisfaisante et pour éviter d'induire de la toxicité dans les cellules, le milieu de la gamme de dilution a été retenue, conformément à la procédure déjà décrite dans les travaux de Frau [82], atteignant une concentration de $1{,}4x10^7$ UI/mL. De manière générale, la fluorescence verte est moins visible que les deux autres bien, que l'on soit sur le même titre viral. De ce fait, soit le vecteur Venus possède une efficacité moins importante que les deux autres vecteurs, soit l'intensité de fluorecence de la protéine Venus est plus faible que Cerulean et mCherry. Les séquences génomique et les structures des trois protéines RVB étant très similaires, il semble peu probable que l'efficacité d'infection du vecteur Venus soit plus faible que celle de ses deux homologues rouge et bleu. Néanmoins, les analyses de cytométrie ne semblent pas révéler une intensité plus faible de la protéine Venus. En conséquence, nous mesureront à nouveau le titre de la suspension virale codant pour cette protéine. De plus, cette procédure devra être répétée afin de confirmer statistiquement si ce tritre est bien optimal.

Nous avons remarqué que les organoïdes tumoraux sont plus difficiles à infecter que les lignées cellulaires, et pour des résultats similaires doivent recevoir environ cent fois plus de particules virales (de l'ordre de 10^5 UI/mL dans les lignées Caco-2/TC-7 contre 10^7 UI/mL dans les tumoroïdes). Ceci n'est pas surprenant et des observations similaires ont déjà été effectuées dans la littérature [66].

De manière théorique, une équipartition des probabilités d'infection de chaque vecteur et donc une équipartition de l'ordre de 1/7 de chaque fluorescence est attendue (rouge, vert, bleu, cyan, jaune, magenta, blanc). Nous avons d'ailleurs pu observer lors des infections au titre optimal une répartition qui s'en rapproche, validant notre expérience.

Cette infection a permis une étude préliminaire de tri cellulaire afin de générer des cultures de tumoroïdes à partir uniquement de cellules fluorescentes. Il sera intéressant par la suite de déterminer après le tri cellulaire le rendement de remise en culture (nombre de tumoroïdes RVB qui se forment par rapport au nombre de cellules triées et réensemencées).

Enfin, il faudra également déterminer les sites d'insertion des vecteurs LeGO dans les tumoroïdes. En fonction du nombre de clones générés, l'identification des sites d'insertion risque d'être beaucoup plus lourde à mettre en place que dans la génération de la banque cellulaire de Caco-2/TC-7. Le remplacement du modèle LeGO par le modèle inductible Brainbow serait une solution pour faciliter ce point en ne sélectionnant qu'un seul clone Brainbow et en induisant par la suite plusieurs séries de recombinaisons pour générer

plusieurs sous-clones distincts. Toutefois, l'utilisation d'un seul clone d'origine présente l'inconvénient de restreindre l'hétérogénéité et donc le suivi du lignage cellulaire des tumoroïdes humains dérivés des CCR.

Conclusion

Nous avons pu mettre en évidence l'implication du récepteur nucléaire aux hormones thyroïdiennes TRα1 dans la mise en place et l'expansion de clones cellulaires selon ses niveaux d'expression, avec une approche *in vitro* et *in vivo*. Des sphéroïdes tumoraux de Caco-2/TC-7 dont l'expression de TRα1 a été modulée (surexprimée ou sous exprimée) ont été suivis en culture au cours de plusieurs temps ou greffés pendant 90 jours dans le modèle murin. Ces expériences nous ont permis de prouver que les cellules exprimant le plus haut niveau de TRα1 sont majoritairement à l'origine de la formation, de l'expansion, du maintien et du développement de l'hétérogénéité. Des populations TRα1-Augmenté découlent plusieurs sous-types cellulaires : (i) non différenciés, exprimant la cytokératine 18 avec certaines cellules positives au marqueur de CSC ALDH1a1, mais également (ii) un sous-type différencié, plus rare, exprimant la cytokératine 20.

Cependant, nous n'avons pas encore caractérisé plus précisément la nature des sous-types cellulaires non différenciés et différenciés. Des analyses complémentaires, telles que des cinétiques *in vivo* avec des temps de développement de tumeurs greffées plus précoces seront effectuées et permettront d'élucider plus en détail la mise en place et l'acquisition du caractère différencié ou le maintien du statut souche. De plus, le rôle des cellules au plus faible niveau de TRα1 sera également mis en avant car, bien que non impliquées dans le développement des tumeurs, elles peuvent jouer un autre rôle notamment lors de la résistance aux traitements du CCR.

Parallèlement à cela, nous avons développé le modèle de code-barres RVB fluorescent dans un modèle de culture cellulaire plus complexe et représentatif de la physiopathologie du CCR : les organoïdes dérivés de tumeurs coliques de patients. Nous sommes parvenus à générer différents clones, d'intensités et d'assemblages de couleurs (R/V/B) différents, de manière stable au cours du temps. Bien que des travaux complémentaires de mise au point soient nécessaires, une expérience de tri cellulaire nous a permis d'isoler les clones multi-fluorescents. Ces cellules ont été utilisées pour effectuer une étude pilote de xénogreffes de tumoroïdes RVB en sous-cutané dans le modèle murin de souris NOD-Scid. À terme, les tumoroïdes RVB seront greffés dans des animaux qui seront traités ou non à l'hormone thyroïdienne T3 et la caractérisation des sous-populations intra-tumorales sera déterminée par une analyse en single cell-RNA-sequencing.

Nos travaux à court-terme consisteront dans un premier temps à caractériser les sites d'insertion des vecteurs dans les clones puis à finaliser l'analyse en cinétique *in vitro* des sphéroïdes RVB. Le développement d'un modèle mathématique quantitatif de la dynamique clonale et de la mise en place de l'hétérogénéité sera particulièrement important. Les mêmes travaux seront effectués *in vivo* à partir de greffes de sphères RVB-Caco-2/TC-7-TRα1-modulé. Dans une perspective à plus long-terme, des greffes de tumoroïdes en sous-cutané, intra-veineuse et en intra-caecale seront réalisées. Le but sera d'investiguer l'efficacité de la prise en greffes des différents types d'implantations pour choisir le plus pertinent à l'analyse des effets de la T3 sur la biologie tumorale. Enfin, pour une analyse plus large, nous développerons des tumoroïdes RVB à partir de plusieurs CCR ayant des caractéristiques moléculaires, des capacités de croissance et de réponse à la chimiothérapie différentes [82].

Bibliographie

[1] J. Guinney *et al.*, « The consensus molecular subtypes of colorectal cancer », *Nat. Med.*, vol. 21, nº 11, p. 1350-1356, nov. 2015, doi: 10.1038/nm.3967.

[2] H. Gehart et H. Clevers, « Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells », *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 16, nº 1, p. 19-34, 2019, doi: 10.1038/s41575-018-0081-y.

[3] L. Ricci-Vitiani, A. Pagliuca, E. Palio, A. Zeuner, et R. De Maria, « Colon cancer stem cells », *Gut*, vol. 57, nº 4, p. 538-548, avr. 2008, doi: 10.1136/gut.2007.127837.

[4] M. V. Giolito *et al.*, « Regulation of the THRA gene, encoding the thyroid hormone nuclear receptor TRα1, in intestinal lesions », *Molecular Oncology*, vol. n/a, nº n/a, juill. 2022, doi: 10.1002/1878-0261.13298.

[5] M. Sirakov, E. Kress, J. Nadjar, et M. Plateroti, « Thyroid hormones and their nuclear receptors: new players in intestinal epithelium stem cell biology? », *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 71, nº 15, p. 2897-2907, août 2014, doi: 10.1007/s00018-014-1586-3.

[6] M. Godart *et al.*, « Murine intestinal stem cells are highly sensitive to modulation of the T3/TRα1-dependent pathway », *Development*, vol. 148, nº 8, p. dev194357, avr. 2021, doi: 10.1242/dev.194357.

[7] M. Sirakov *et al.*, « The thyroid hormone nuclear receptor TR 1 controls the Notch signaling pathway and cell fate in murine intestine », *Development*, vol. 142, nº 16, p. 2764-2774, août 2015, doi: 10.1242/dev.121962.

[8] J. Uchuya-Castillo *et al.*, « Increased expression of the thyroid hormone nuclear receptor TRα1 characterizes intestinal tumors with high Wnt activity », *Oncotarget*, vol. 9, nº 57, p. 30979-30996, juill. 2018, doi: 10.18632/oncotarget.25741.

[9] S. M. Dieter *et al.*, « Distinct Types of Tumor-Initiating Cells Form Human Colon Cancer Tumors and Metastases », *Cell Stem Cell*, vol. 9, nº 4, p. 357-365, oct. 2011, doi: 10.1016/j.stem.2011.08.010.

[10] D. J. Huels et O. J. Sansom, « Stem vs non-stem cell origin of colorectal cancer », *Br. J. Cancer*, vol. 113, nº 1, p. 1-5, juin 2015, doi: 10.1038/bjc.2015.214.

[11] A. Kreso *et al.*, « Variable Clonal Repopulation Dynamics Influence Chemotherapy Response in Colorectal Cancer », *Science*, vol. 339, nº 6119, p. 543-548, févr. 2013, doi: 10.1126/science.1227670.

[12] L. Laplane, « Cellule souche cancéreuse : réflexions épistémologiques », *Sociétés*, vol. 105, nº 3, p. 45-55, 2009, doi: 10.3917/soc.105.0045.

[13] L. G. van der Flier et H. Clevers, « Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium », *Annu Rev Physiol*, vol. 71, p. 241-260, 2009, doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163145.

[14] H. F. Helander et L. Fändriks, « Surface area of the digestive tract - revisited », *Scand J Gastroenterol*, vol. 49, nº 6, p. 681-689, juin 2014, doi: 10.3109/00365521.2014.898326.

[15] B.-K. Koo et H. Clevers, « Stem cells marked by the R-spondin receptor LGR5 », *Gastroenterology*, vol. 147, nº 2, p. 289-302, août 2014, doi: 10.1053/j.gastro.2014.05.007.

[16] T. S. Stappenbeck, M. H. Wong, J. R. Saam, I. U. Mysorekar, et J. I. Gordon, « Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 10, nº 6, p. 702-709, déc. 1998, doi: 10.1016/s0955-0674(98)80110-5.

[17] N. Barker *et al.*, « Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5 », *Nature*, vol. 449, nº 7165, p. 1003-1007, oct. 2007, doi: 10.1038/nature06196.

[18] J. H. van Es *et al.*, « Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage », *Nat. Cell Biol.*, vol. 14, nº 10, p. 1099-1104, 2012, doi: 10.1038/ncb2581.

[19] P. W. Tetteh *et al.*, « Replacement of Lost Lgr5-Positive Stem Cells through Plasticity of Their Enterocyte-Lineage Daughters », *Cell Stem Cell*, vol. 18, nº 2, p. 203-213, févr. 2016, doi: 10.1016/j.stem.2016.01.001.

[20] K. Murata *et al.*, « Ascl2-Dependent Cell Dedifferentiation Drives Regeneration of Ablated Intestinal Stem Cells », *Cell Stem Cell*, vol. 26, nº 3, p. 377-390.e6, mars 2020, doi: 10.1016/j.stem.2019.12.011.
[21] J. Beumer et H. Clevers, « Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 22, nº 1, p. 39-53, janv. 2021, doi: 10.1038/s41580-020-0278-0.
[22] A. Baulies, N. Angelis, et V. S. W. Li, « Hallmarks of intestinal stem cells », *Development*, vol. 147, nº 15, août 2020, doi: 10.1242/dev.182675.
[23] A. Gregorieff et H. Clevers, « Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer », *Genes Dev*, vol. 19, nº 8, p. 877-890, avr. 2005, doi: 10.1101/gad.1295405.
[24] Z. Steinhart et S. Angers, « Wnt signaling in development and tissue homeostasis », *Development*, vol. 145, nº 11, p. dev146589, juin 2018, doi: 10.1242/dev.146589.
[25] K. Kretzschmar et H. Clevers, « Wnt/β-catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells », *Dev Biol*, vol. 428, nº 2, p. 273-282, août 2017, doi: 10.1016/j.ydbio.2017.05.015.
[26] G. M. Collu, A. Hidalgo-Sastre, et K. Brennan, « Wnt-Notch signalling crosstalk in development and disease », *Cell Mol Life Sci*, vol. 71, nº 18, p. 3553-3567, sept. 2014, doi: 10.1007/s00018-014-1644-x.
[27] B. Zhou *et al.*, « Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics », *Sig Transduct Target Ther*, vol. 7, nº 1, Art. nº 1, mars 2022, doi: 10.1038/s41392-022-00934-y.
[28] K. A. O'Brien, A. J. Murray, et T. S. Simonson, « Notch Signaling and Cross-Talk in Hypoxia: A Candidate Pathway for High-Altitude Adaptation », *Life*, vol. 12, nº 3, Art. nº 3, mars 2022, doi: 10.3390/life12030437.
[29] « OMS 2020, Website ». https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer (consulté le 17 mai 2021).
[30] « Cancer colorectal : les traitements | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer », *Fondation ARC 2021, Website.* https://www.fondation-arc.org/cancer/cancer-colorectal/traitement-cancer (consulté le 22 juin 2021).
[31] E. R. Fearon et B. Vogelstein, « A genetic model for colorectal tumorigenesis », *Cell*, vol. 61, nº 5, p. 759-767, juin 1990, doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-i.
[32] W. M. Grady et S. D. Markowitz, « The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening », *Dig Dis Sci*, vol. 60, nº 3, p. 762-772, mars 2015, doi: 10.1007/s10620-014-3444-4.
[33] F. Bosman et P. Yan, « Molecular pathology of colorectal cancer », *Pol J Pathol*, vol. 65, nº 4, p. 257-266, déc. 2014, doi: 10.5114/pjp.2014.48094.
[34] S. Hamilton, B. Vogelstein, et S. Kudo, *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. WHO Classification of Tumours.* Lyon: IARC Press, 2000.
[35] N. Barker *et al.*, « Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer », *Nature*, vol. 457, nº 7229, p. 608-611, janv. 2009, doi: 10.1038/nature07602.
[36] M. Sirakov et M. Plateroti, « The thyroid hormones and their nuclear receptors in the gut: from developmental biology to cancer », *Biochim Biophys Acta*, vol. 1812, nº 8, p. 938-946, août 2011, doi: 10.1016/j.bbadis.2010.12.020.
[37] M. A. Shahid, M. A. Ashraf, et S. Sharma, « Physiology, Thyroid Hormone », in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. Consulté le: 19 juillet 2022. [En ligne]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500006/
[38] D. P. Carvalho et C. Dupuy, « Thyroid hormone biosynthesis and release », *Mol Cell Endocrinol*, vol. 458, p. 6-15, déc. 2017, doi: 10.1016/j.mce.2017.01.038.
[39] V. Laudet, C. Hänni, J. Coll, F. Catzeflis, et D. Stéhelin, « Evolution of the nuclear receptor gene superfamily », *EMBO J*, vol. 11, nº 3, p. 1003-1013, mars 1992, doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05139.x.
[40] A. Pascual et A. Aranda, « Thyroid hormone receptors, cell growth and

differentiation », *Biochim Biophys Acta*, vol. 1830, nº 7, p. 3908-3916, juill. 2013, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.03.012.
[41] S. Y. Cheng, « Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors », *Rev Endocr Metab Disord*, vol. 1, nº 1-2, p. 9-18, janv. 2000, doi: 10.1023/a:1010052101214.
[42] M. Plateroti *et al.*, « Involvement of T3Ralpha- and beta-receptor subtypes in mediation of T3 functions during postnatal murine intestinal development », *Gastroenterology*, vol. 116, nº 6, p. 1367-1378, juin 1999, doi: 10.1016/s0016-5085(99)70501-9.
[43] C. Frau, M. Godart, et M. Plateroti, « Thyroid hormone regulation of intestinal epithelial stem cell biology », *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 459, p. 90-97, déc. 2017, doi: 10.1016/j.mce.2017.03.002.
[44] F. Flamant et L. Quignodon, « Use of a new model of transgenic mice to clarify the respective functions of thyroid hormone receptors in vivo », *Heart Fail Rev*, vol. 15, nº 2, p. 117-120, mars 2010, doi: 10.1007/s10741-008-9121-y.
[45] Y.-B. Shi, « Life Without Thyroid Hormone Receptor », *Endocrinology*, vol. 162, nº 4, p. bqab028, févr. 2021, doi: 10.1210/endocr/bqab028.
[46] D. R. Buchholz, R. A. Heimeier, B. Das, T. Washington, et Y.-B. Shi, « Pairing morphology with gene expression in thyroid hormone-induced intestinal remodeling and identification of a core set of TH-induced genes across tadpole tissues », *Dev Biol*, vol. 303, nº 2, p. 576-590, mars 2007, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.11.037.
[47] A. Ishizuya-Oka, T. Hasebe, D. R. Buchholz, M. Kajita, L. Fu, et Y.-B. Shi, « Origin of the adult intestinal stem cells induced by thyroid hormone in Xenopus laevis », *FASEB J*, vol. 23, nº 8, p. 2568-2575, août 2009, doi: 10.1096/fj.08-128124.
[48] E. Kress, A. Rezza, J. Nadjar, J. Samarut, et M. Plateroti, « The Frizzled-related sFRP2 Gene Is a Target of Thyroid Hormone Receptor α1 and Activates β-Catenin Signaling in Mouse Intestine », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, nº 2, p. 1234-1241, janv. 2009, doi: 10.1074/jbc.M806548200.
[49] M. Plateroti, E. Kress, J. I. Mori, et J. Samarut, « Thyroid hormone receptor alpha1 directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells », *Mol Cell Biol*, vol. 26, nº 8, p. 3204-3214, avr. 2006, doi: 10.1128/MCB.26.8.3204-3214.2006.
[50] E. Kress *et al.*, « Cooperation Between the Thyroid Hormone Receptor TRα1 and the WNT Pathway in the Induction of Intestinal Tumorigenesis », *Gastroenterology*, vol. 138, nº 5, p. 1863-1874.e1, mai 2010, doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.041.
[51] M. Sirakov, L. Claret, et M. Plateroti, « Thyroid Hormone Nuclear Receptor TRα1 and Canonical WNT Pathway Cross-Regulation in Normal Intestine and Cancer », *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 12, p. 725708, 2021, doi: 10.3389/fendo.2021.725708.
[52] S. Fre *et al.*, « Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, nº 15, p. 6309-6314, avr. 2009, doi: 10.1073/pnas.0900427106.
[53] T. W. Parker et K. L. Neufeld, « APC controls Wnt-induced β-catenin destruction complex recruitment in human colonocytes », *Scientific Reports*, vol. 10, nº 1, Art. nº 1, févr. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-59899-z.
[54] M. E. Beildeck, E. P. Gelmann, et S. W. Byers, « Cross-regulation of signaling pathways: an example of nuclear hormone receptors and the canonical Wnt pathway », *Exp Cell Res*, vol. 316, nº 11, p. 1763-1772, juill. 2010, doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.001.
[55] D. J. Mulholland, S. Dedhar, G. A. Coetzee, et C. C. Nelson, « Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? », *Endocr Rev*, vol. 26, nº 7, p. 898-915, déc. 2005, doi: 10.1210/er.2003-0034.
[56] P. B. Gupta *et al.*, « Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening », *Cell*, vol. 138, nº 4, p. 645-659, août 2009, doi:

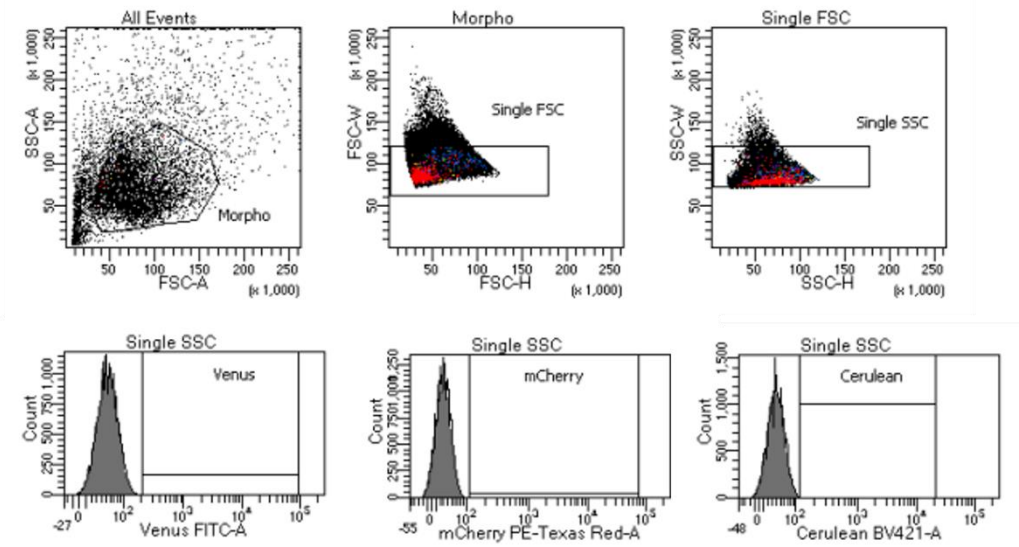
10.1016/j.cell.2009.06.034.
[57] L. T. H. Phi *et al.*, « Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment », *Stem Cells Int*, vol. 2018, p. 5416923, 2018, doi: 10.1155/2018/5416923.
[58] A. O. Perekatt *et al.*, « SMAD4 Suppresses WNT-Driven Dedifferentiation and Oncogenesis in the Differentiated Gut Epithelium », *Cancer Res.*, vol. 78, nº 17, p. 4878-4890, 01 2018, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0043.
[59] S. Schwitalla *et al.*, « Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties », *Cell*, vol. 152, nº 1-2, p. 25-38, janv. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2012.12.012.
[60] H. Shaked *et al.*, « Chronic epithelial NF-κB activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 109, nº 35, p. 14007-14012, août 2012, doi: 10.1073/pnas.1211509109.
[61] M. B. Woodworth, K. M. Girskis, et C. A. Walsh, « Building a lineage from single cells: genetic techniques for cell lineage tracking », *Nat Rev Genet*, vol. 18, nº 4, Art. nº 4, avr. 2017, doi: 10.1038/nrg.2016.159.
[62] C. S. Baron et A. van Oudenaarden, « Unravelling cellular relationships during development and regeneration using genetic lineage tracing », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 20, nº 12, p. 753-765, déc. 2019, doi: 10.1038/s41580-019-0186-3.
[63] I. Querques *et al.*, « A highly soluble Sleeping Beauty transposase improves control of gene insertion », *Nat Biotechnol*, vol. 37, nº 12, p. 1502-1512, déc. 2019, doi: 10.1038/s41587-019-0291-z.
[64] M. D. Schertzer *et al.*, « A piggyBac-based toolkit for inducible genome editing in mammalian cells », *RNA*, vol. 25, nº 8, p. 1047-1058, août 2019, doi: 10.1261/rna.068932.118.
[65] A. Tashiro, C. Zhao, H. Suh, et F. H. Gage, « Purification and Injection of Retroviral Vectors », *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2015, nº 10, p. 925-931, oct. 2015, doi: 10.1101/pdb.prot086371.
[66] K. Weber *et al.*, « RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking », *Nat. Med.*, vol. 17, nº 4, p. 504-509, avr. 2011, doi: 10.1038/nm.2338.
[67] W. J. Kress et D. L. Erickson, « DNA barcodes: methods and protocols », *Methods Mol Biol*, vol. 858, p. 3-8, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-591-6_1.
[68] S. K. Rehman *et al.*, « Colorectal Cancer Cells Enter a Diapause-like DTP State to Survive Chemotherapy », *Cell*, vol. 184, nº 1, p. 226-242.e21, janv. 2021, doi: 10.1016/j.cell.2020.11.018.
[69] C. Ye, Z. Chen, Z. Liu, F. Wang, et X. He, « Defining endogenous barcoding sites for CRISPR/Cas9-based cell lineage tracing in zebrafish », *J Genet Genomics*, vol. 47, nº 2, p. 85-91, févr. 2020, doi: 10.1016/j.jgg.2019.11.012.
[70] J. Kristianto, M. G. Johnson, R. K. Zastrow, A. B. Radcliff, et R. D. Blank, « Spontaneous recombinase activity of Cre-ERT2 in vivo », *Transgenic Res*, vol. 26, nº 3, p. 411-417, juin 2017, doi: 10.1007/s11248-017-0018-1.
[71] H. Bouabe et K. Okkenhaug, « Gene targeting in mice: a review », *Methods Mol Biol*, vol. 1064, p. 315-336, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-601-6_23.
[72] D. Cai, K. B. Cohen, T. Luo, J. W. Lichtman, et J. R. Sanes, « Improved tools for the Brainbow toolbox », *Nature Methods*, vol. 10, nº 6, Art. nº 6, juin 2013, doi: 10.1038/nmeth.2450.
[73] T. A. Weissman et Y. A. Pan, « Brainbow: New Resources and Emerging Biological Applications for Multicolor Genetic Labeling and Analysis », *Genetics*, vol. 199, nº 2, p. 293-306, févr. 2015, doi: 10.1534/genetics.114.172510.
[74] M. Janiszewska et K. Polyak, « A confetti trail of tumour evolution », *Nat Cell Biol*, vol. 20, nº 6, p. 639-641, juin 2018, doi: 10.1038/s41556-018-0110-7.

[75] D. Metzger et P. Chambon, « Generation of Spatio-Temporally Controlled Targeted Somatic Mutations in the Mouse », *Curr Protoc Mouse Biol*, vol. 1, nº 1, p. 55-70, mars 2011, doi: 10.1002/9780470942390.mo100128.
[76] K. Cornils *et al.*, « Multiplexing clonality: combining RGB marking and genetic barcoding », *Nucleic Acids Res*, vol. 42, nº 7, p. e56, avr. 2014, doi: 10.1093/nar/gku081.
[77] J. R. Tata, « Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone », *Mol Cell Endocrinol*, vol. 246, nº 1-2, p. 10-20, févr. 2006, doi: 10.1016/j.mce.2005.11.024.
[78] K. Venkatesh, L. Srikanth, B. Vengamma, C. Chandrasekhar, B. C. M. Prasad, et P. V. G. K. Sarma, « In vitro transdifferentiation of human cultured CD34+ stem cells into oligodendrocyte precursors using thyroid hormones », *Neurosci Lett*, vol. 588, p. 36-41, févr. 2015, doi: 10.1016/j.neulet.2014.12.050.
[79] S. Mukhi et D. D. Brown, « Transdifferentiation of tadpole pancreatic acinar cells to duct cells mediated by Notch and stromelysin-3 », *Dev Biol*, vol. 351, nº 2, p. 311-317, mars 2011, doi: 10.1016/j.ydbio.2010.12.020.
[80] K. Weber, M. Thomaschewski, D. Benten, et B. Fehse, « RGB marking with lentiviral vectors for multicolor clonal cell tracking », *Nat Protoc*, vol. 7, nº 5, p. 839-849, avr. 2012, doi: 10.1038/nprot.2012.026.
[81] M. V. Giolito, L. Claret, C. Frau, et M. Plateroti, « A Three-dimensional Model of Spheroids to Study Colon Cancer Stem Cells », *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, nº 167, p. e61783, janv. 2021, doi: 10.3791/61783.
[82] C. Frau *et al.*, « Deciphering the Role of Intestinal Crypt Cell Populations in Resistance to Chemotherapy », *Cancer Res*, vol. 81, nº 10, p. 2730-2744, mai 2021, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-2450.
[83] O. Gires, « EpCAM, une protéine versatile impliquée dans l'oncogenèse », *Med Sci (Paris)*, vol. 25, nº 5, p. 449-450, mai 2009, doi: 10.1051/medsci/2009255449.
[84] D. Calnek et A. Quaroni, « Differential localization by in situ hybridization of distinct keratin mRNA species during intestinal epithelial cell development and differentiation », *Differentiation*, vol. 53, nº 2, p. 95-104, juin 1993, doi: 10.1111/j.1432-0436.1993.tb00649.x.
[85] A. Koshino *et al.*, « High phospho-histone H3 expression uniquely predicts favorable survival among four markers of cellular proliferation in colorectal cancer », *Pathol Int*, vol. 71, nº 5, p. 316-324, mai 2021, doi: 10.1111/pin.13084.
[86] Y. Zhou *et al.*, « Cancer stem cells in progression of colorectal cancer », *Oncotarget*, vol. 9, nº 70, p. 33403-33415, sept. 2018, doi: 10.18632/oncotarget.23607.
[87] D. Calnek et A. Quaroni, « Differential localization by in situ hybridization of distinct keratin mRNA species during intestinal epithelial cell development and differentiation », *Differentiation*, vol. 53, nº 2, p. 95-104, juin 1993, doi: 10.1111/j.1432-0436.1993.tb00649.x.
[88] O. Gires, « EpCAM, une protéine versatile impliquée dans l'oncogenèse », *Med Sci (Paris)*, vol. 25, nº 5, Art. nº 5, mai 2009, doi: 10.1051/medsci/2009255449.
[89] W. Liu, C. Yu, J. Li, et J. Fang, « The Roles of EphB2 in Cancer », *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 10, 2022, Consulté le: 4 août 2022. [En ligne]. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.788587
[90] F. I. Montalto et F. De Amicis, « Cyclin D1 in Cancer: A Molecular Connection for Cell Cycle Control, Adhesion and Invasion in Tumor and Stroma », *Cells*, vol. 9, nº 12, p. 2648, déc. 2020, doi: 10.3390/cells9122648.
[91] M. E. V. Johansson, J. M. H. Larsson, et G. C. Hansson, « The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, nº supplement_1, p. 4659-4665, mars 2011, doi: 10.1073/pnas.1006451107.
[92] Z. Herold, M. Dank, M. Herold, P. Nagy, K. Rosta, et A. Somogyi, « Histopathological

Chromogranin A-Positivity Is Associated with Right-Sided Colorectal Cancers and Worse Prognosis », *Cancers*, vol. 13, nº 1, Art. nº 1, janv. 2021, doi: 10.3390/cancers13010067.
[93] Y. Nakanishi *et al.*, « Control of Paneth Cell Fate, Intestinal Inflammation, and Tumorigenesis by PKCλ/ι », *Cell Reports*, vol. 16, nº 12, p. 3297-3310, sept. 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.054.
[94] Z. Cao, N. Weygant, P. Chandrakesan, C. W. Houchen, J. Peng, et D. Qu, « Tuft and Cancer Stem Cell Marker DCLK1: A New Target to Enhance Anti-Tumor Immunity in the Tumor Microenvironment », *Cancers (Basel)*, vol. 12, nº 12, p. 3801, déc. 2020, doi: 10.3390/cancers12123801.
[95] P. Bu *et al.*, « Aldolase B-Mediated Fructose Metabolism Drives Metabolic Reprogramming of Colon Cancer Liver Metastasis », *Cell Metabolism*, vol. 27, nº 6, p. 1249-1262.e4, juin 2018, doi: 10.1016/j.cmet.2018.04.003.
[96] T. Sato *et al.*, « Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium », *Gastroenterology*, vol. 141, nº 5, p. 1762-1772, nov. 2011, doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.050.
[97] N. Gödecke, H. Hauser, et D. Wirth, « Stable Expression by Lentiviral Transduction of Cells », *Methods Mol Biol*, vol. 1850, p. 43-55, 2018, doi: 10.1007/978-1-4939-8730-6_4.
[98] P. R. Mueller, B. Wold, et P. A. Garrity, « Ligation-Mediated PCR for Genomic Sequencing and Footprinting », in *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, et K. Struhl, Éd. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001, p. mb1503s56. doi: 10.1002/0471142727.mb1503s56.
[99] B. Yin et D. A. Largaespada, « PCR-based procedures to isolate insertion sites of DNA elements », *BioTechniques*, vol. 43, nº 1, p. 79-84, juill. 2007, doi: 10.2144/000112474.
[100] N. Wang et E. A. Ozer, « A Method for Bioinformatic Analysis of Transposon Insertion Sequencing (INSeq) Results for Identification of Microbial Fitness Determinants », *Methods Mol Biol*, vol. 1498, p. 243-253, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6472-7_16.
[101] B. Fehse, O. S. Kustikova, M. Bubenheim, et C. Baum, « Pois(s)on – It's a Question of Dose… », *Gene Therapy*, vol. 11, nº 11, Art. nº 11, juin 2004, doi: 10.1038/sj.gt.3302270.
[102] Y. Yao et W. Dai, « Genomic Instability and Cancer », *J Carcinog Mutagen*, vol. 5, p. 1000165, 2014, doi: 10.4172/2157-2518.1000165.
[103] C. Baum *et al.*, « Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells », *Blood*, vol. 101, nº 6, p. 2099-2114, mars 2003, doi: 10.1182/blood-2002-07-2314.
[104] T. Lea, « Caco-2 Cell Line », in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, et H. Wichers, Éd. Cham (CH): Springer, 2015. Consulté le: 5 octobre 2022. [En ligne]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500149/
[105] L.-B. Weiswald *et al.*, « A short-term colorectal cancer sphere culture as a relevant tool for human cancer biology investigation », *Br J Cancer*, vol. 108, nº 8, p. 1720-1731, avr. 2013, doi: 10.1038/bjc.2013.132.
[106] M. van der Heijden *et al.*, « Spatiotemporal regulation of clonogenicity in colorectal cancer xenografts », *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 116, nº 13, p. 6140-6145, mars 2019, doi: 10.1073/pnas.1813417116.

Annexes

1) Stratégie de gating pour quantifier la répartition des populations RVB en cytométrie en flux.



Le gating des populations RVB Caco-2 ou tumoroïdes s'effectue en séparant d'abord les débris cellulaires et les évènements de trop grande taille (« Morpho »). Ensuite les doublets sont éliminés (« Single ») et les gates Venus, mCherry et Cerulean sont disposés sur les graphiques en analysant un échantillon non marqué de référence.

2) Récapitulatif des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les marquages en immunofluorescence.

Anticorps primaire	Espèce	Dilution	Fournisseur	Référence
EpCAM	Lapin	1/200	Abcam	ab71916
EphB2(2H9)	Souris	1/100	BD Pharmingen	BD564698
CK18	Chèvre	1/100	Abcam	Ab219271
CK20	Lapin	1/800	Cell Signalling	13063
PCNA (PC10)	Souris	1/1000	Dako	MO879
Ki67 (SP6)	Lapin	1/500	Thermo	RM-9106-S
Muc2 (H-300)	Lapin	1/100	SantaCruz	Sc-15334
Phospho Histone H3	Lapin	1/1000	Merck	06-570
Lysozyme	Souris	1/100	Abcam	36362
DCAMKL1	Lapin	1/100	Abgent	AP7219b
ALDH1a1	Lapin	1/400	Cell Signaling	D9J7R
Cyclin D1	Lapin	1/100	ThermoFisher	Ma39546
Aldolase B + C	Lapin	1/500	Abcam	Ab75751
Chromogranin A	Lapin	1/200	ImmunoStar	20086

Anticorps secondaires	Fluorochrome	Dilution	Fournisseur	Référence
Anti-Lapin	AF647	1/1000	Invitrogen	A21244
Anti-Souris	AF647	1/1000	Invitrogen	A21235

Anticorps secondaires biotinylé	Dilution	Fournisseur	Référence
Cheval-AntiChèvre	1/200	Vector-Laboratories	BA-9500
Chèvre-AntiSouris	1/200	Vector-Lavoratories	BA-9200
Cheval-AntiLapin	1/200	Vector-Laboratories	BA-1100

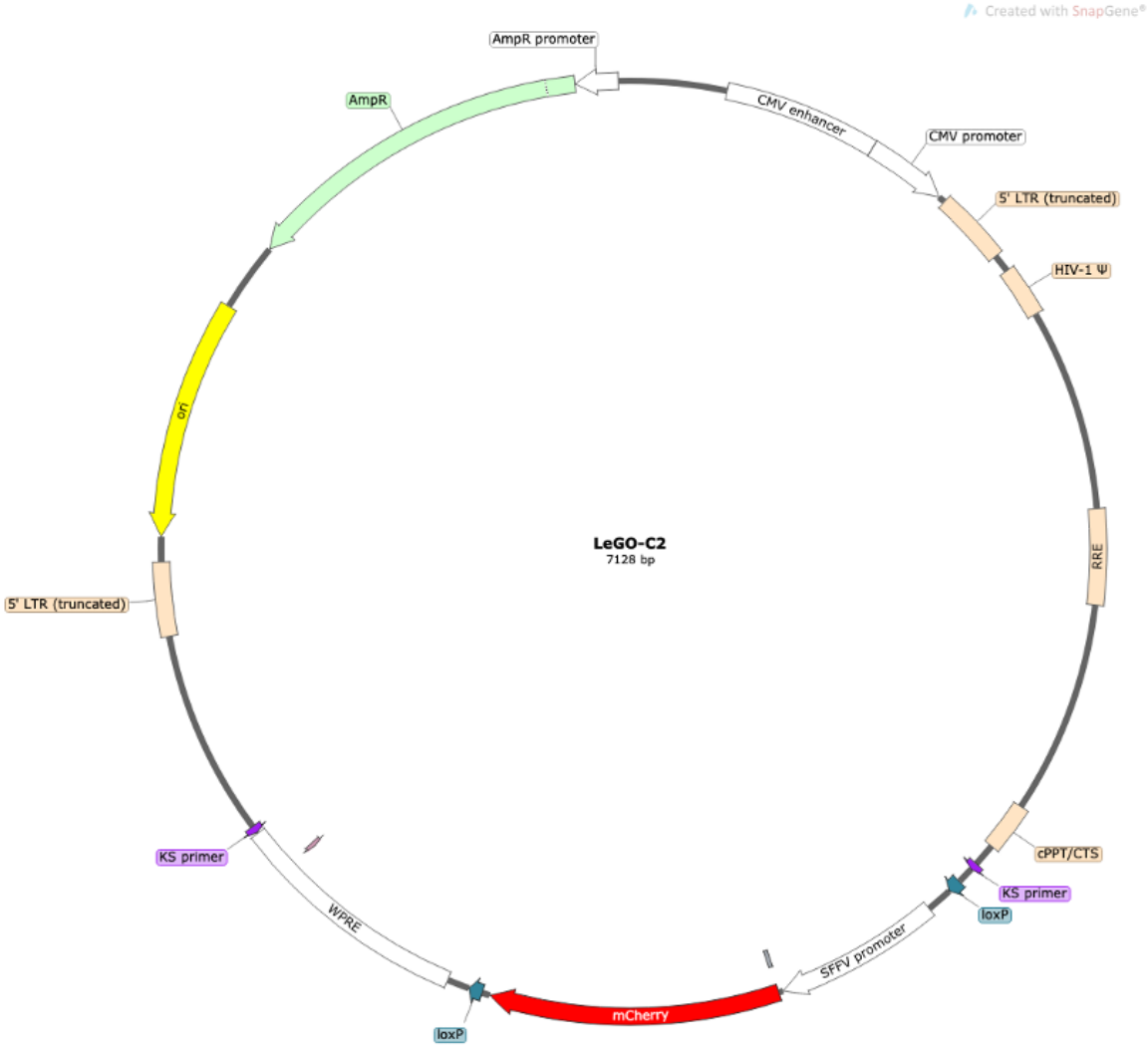
Amplification	Fluorochrome	Dilution	Fournisseur	Référence
TSA-Cy5 Reagent	Cy5	1/100	Akoya	TS-000103

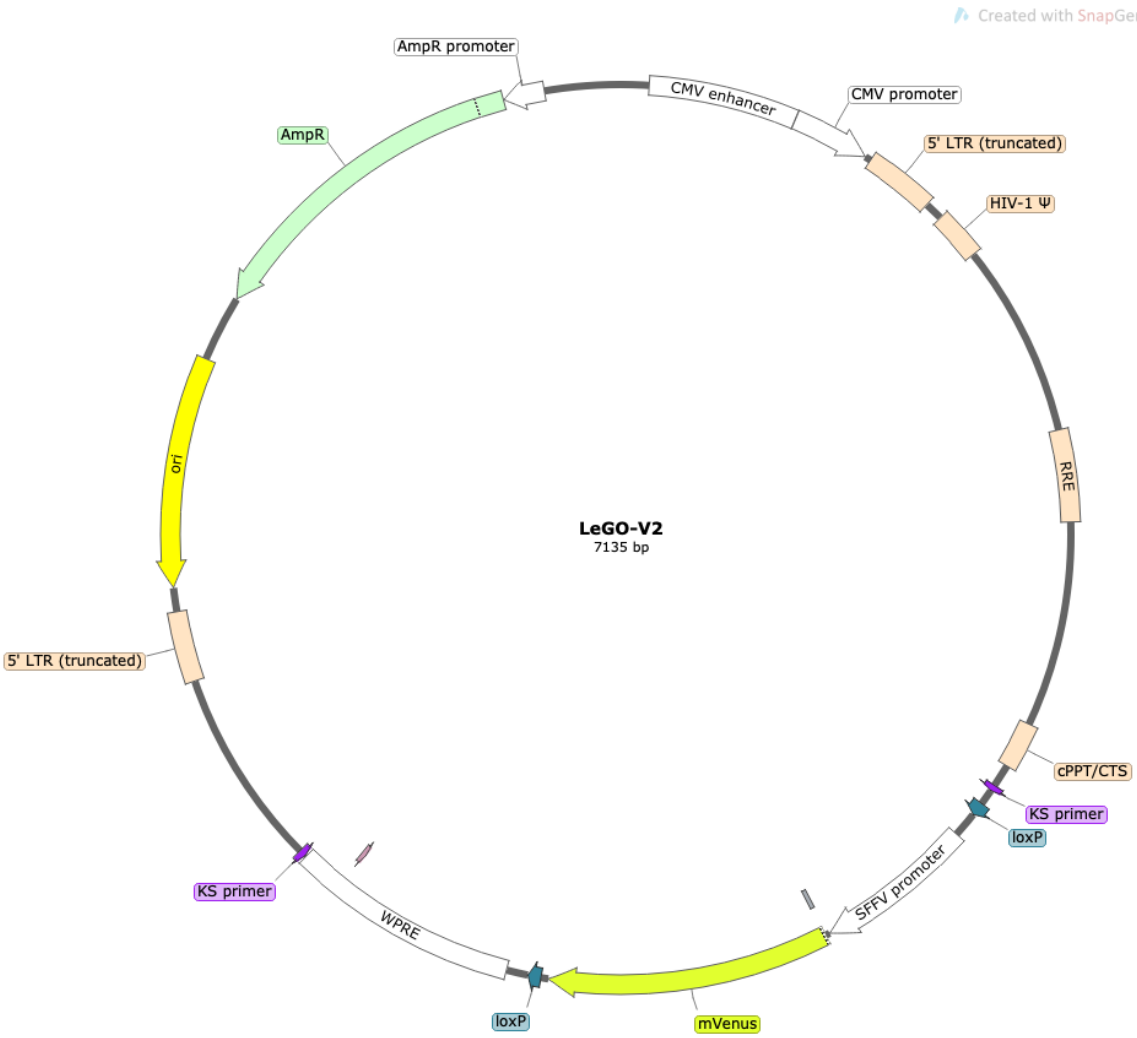
3) Caractéristiques de protéines fluorescentes RVB du système LeGO.

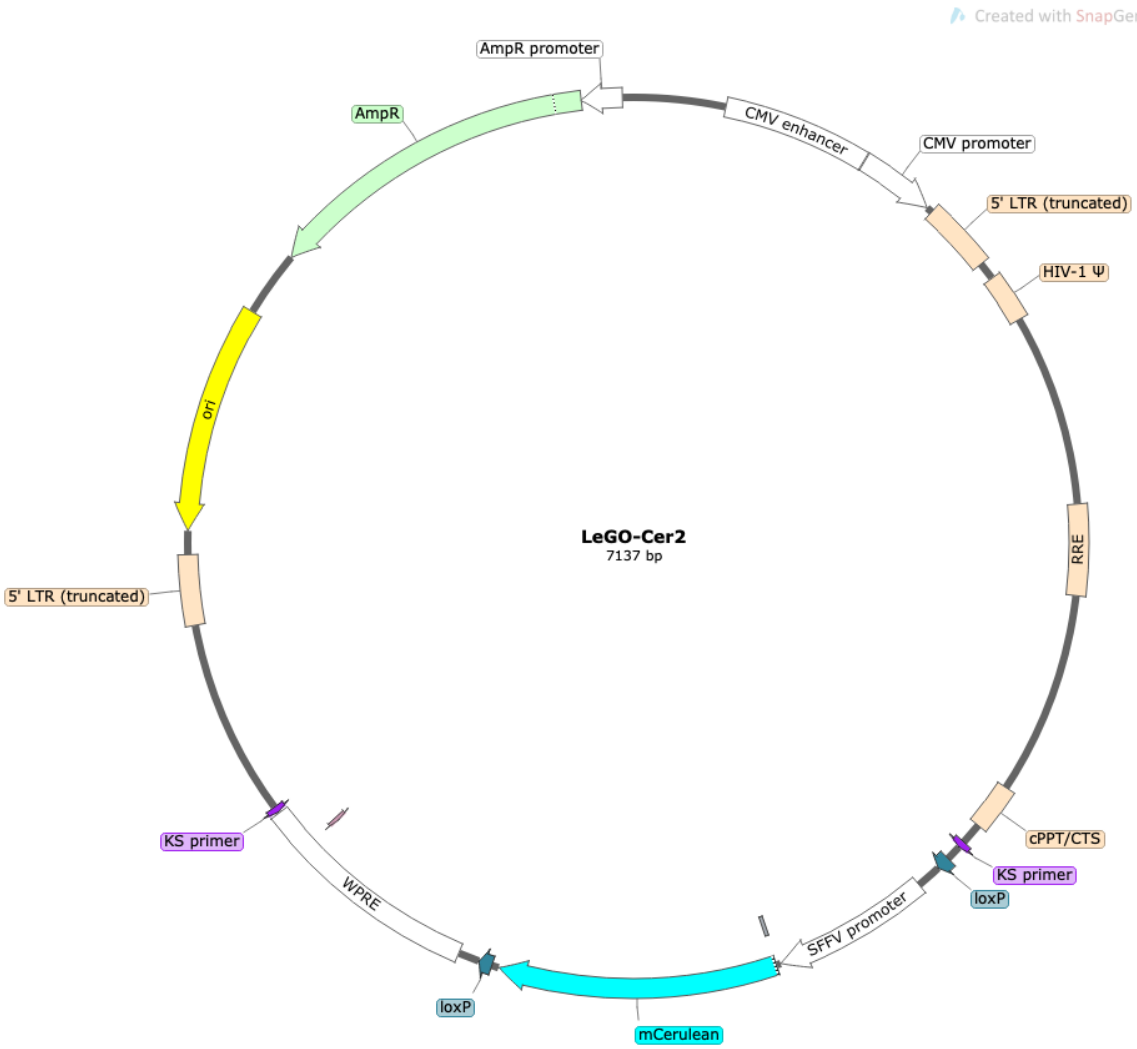
	Fluorescence des protéines		Filtre	
Protéine	Excitation	Émission	Excitation	Émission
Cerulean	433nm	475nm	438/24nm	483/32nm
Venus	515nm	528nm	480/20nm	530/40nm
mCherry	587nm	610nm	535/30nm	580nm

Ce tableau récapitule les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission ainsi que les filtres de microscopie utilisés pour l'observation des protéines rouge (mCherry), vert (Venus) et bleu (Cerulean).

4) Carte des vecteurs LeGO codants pour les protéines mCherry, Venus et Cerulean.




Created with SnapGene®
AmpR promoter
CMV enhancer
CMV promoter
5' LTR (truncated)
HIV-1 Ψ
AmpR
ori
RRE
LeGO-V2
7135 bp
5' LTR (truncated)
cPPT/CTS
KS primer
loxP
SFFV promoter
KS primer
WPRE
loxP
mVenus



Les cartes ont été éditées sur SnapGene.

5) Banques cellulaires Caco-2/TC-7-RVB créées à partir du système LeGO.

Caco2 Red (mCherry)				Caco2 Green (Venus)				Caco2 Blue (Cerulean)		
n°	Well	610-20		n°	Well	FITC		n°	Well	BV421
1	A06	18466		5	B05	300		3	B09	3726
2	A11	8202		6	C01	105		4	C02	571
4	B09	7241		7	C02	285		5	C03	989
8	C04	3135		8	C03	195		6	C04	316
9	C09	14627		9	C05	181		7	D01	3442
10	C12	4415		10	C10	1222		8	D03	2559
11	D05	2120		11	C11	951		9	E02	545
12	D08	11134		12	D02	318		11	E07	1465
13	D09	30315		13	D07	447		12	E09	595
18	F07	7712		14	D11	84		14	F03	800
24	B10	7632		16	E09	205		15	F04	816
25	C07	16313		17	F06	285		16	G02	1164
27	D02	3413		20	G11	177		17	G04	407
29	D12	10775		23	A03	477		18	H01	753
30	E06	47349		25	A06	582		19	H02	746
31	F02	26636		26	A08	150		20	H03	596
33	F12	4884		28	B11	68		21	H04	2619
36	H08	26917		30	C04	104		23	H06	2559
37	H09	19027		34	D08	233		24	H07	575
38	H11	38303		35	D11	370		25	H11	6495
39	A09	13374		36	E08	90		26	A07	728
41	A12	28050		41	F09	725		28	B01	289
45	C08	37525		42	F12	152		29	B07	10726
49	D12	7771		43	G05	159		30	B11	416
50	E01	11444		44	G07	89		32	D02	2010
51	E10	6899		45	G09	127		37	G02	2665
52	F04	17077		46	H03	172		38	G05	416
53	F05	15593		48	A02	339		39	G06	1411
54	F07	20979		50	A08	281		40	H01	378
58	G06	4466		51	B05	100		41	H07	532
59	H03	12087		52	C06	228		42	H09	6295
60	H04	17974		53	C11	361		43	H10	473
61	H05	23414		54	D03	122		45	A08	479
62	H10	52064		56	E03	321		46	A09	830
109	F09	7759		58	E11	80		48	B10	344
				59	F02	73		49	B11	832
				60	F05	123		52	C03	636
35 clones				61	F08	229		53	C05	3572
				62	F10	145		55	D06	1400
				63	F11	259		56	D11	784
				67	H05	203		57	E02	578
				68	H08	78		58	E12	620
				69	H11	184		60	F08	480
				70	H12	156		64	G05	996
				74	C09	744		66	H03	2477
								105	G09	327
				45 clones						
								46 clones		

Les infections avec les particules virales codantes pour les protéines mCherry (filtre 610/20nm), Venus (filtre FITC) et Cerulean (filtre BV421) permettent la génération après un tri cellulaire de trois banques composées d'environ quarante clones, de couleurs et d'intensités différentes (mesurées en cytométrie, unité arbitraire). Chaque clone dispose d'un numéro, déterminé à partir de son puits de plaque 96 d'origine (well). Les intensités sont mises en forme avec en vert un niveau faible, en jaune un niveau intermédiaire et en rouge un niveau fort.

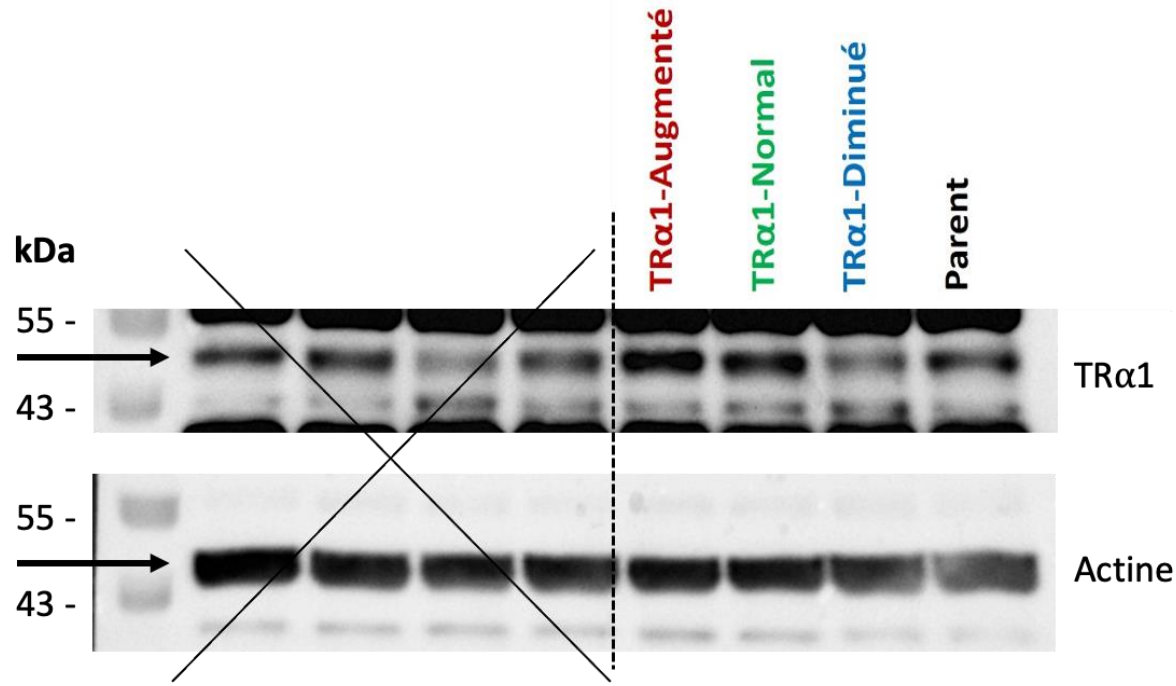
6) Comparaison de l'expansion des clones Caco-2/TC-7 R45, V41 et B7 par le calcul de l'aire sous chacune des courbes de croissance.

AUC	A	B	C
	R45	V41	B7
	Y	Y	Y
Baseline	0	0	0
Total Area	5293	5394	5361
Std. Error	46.28	41.98	55.59
95% Confidence Interval	5202 to 5383	5312 to 5476	5252 to 5470
Total Peak Area	5293	5394	5361
Std. Error	46.28	41.98	55.59
95% Confidence Interval	5202 to 5383	5312 to 5476	5252 to 5470

AUC	A	B	C	D
	TRa1-Augmenté	TRa1-Normal	TRa1-Diminué	Parent
	Y	Y	Y	Y
Baseline	0	0	0	0
Total Area	8190	4772	608.4	6823
Std. Error	79.98	28.37	7.667	37.44
95% Confidence Interval	8034 to 8347	4716 to 4828	593.4 to 623.4	6750 to 6897
Total Peak Area	8190	4772	608.4	6823
Std. Error	79.98	28.37	7.667	37.44
95% Confidence Interval	8034 to 8347	4716 to 4828	593.4 to 623.4	6749 to 6896

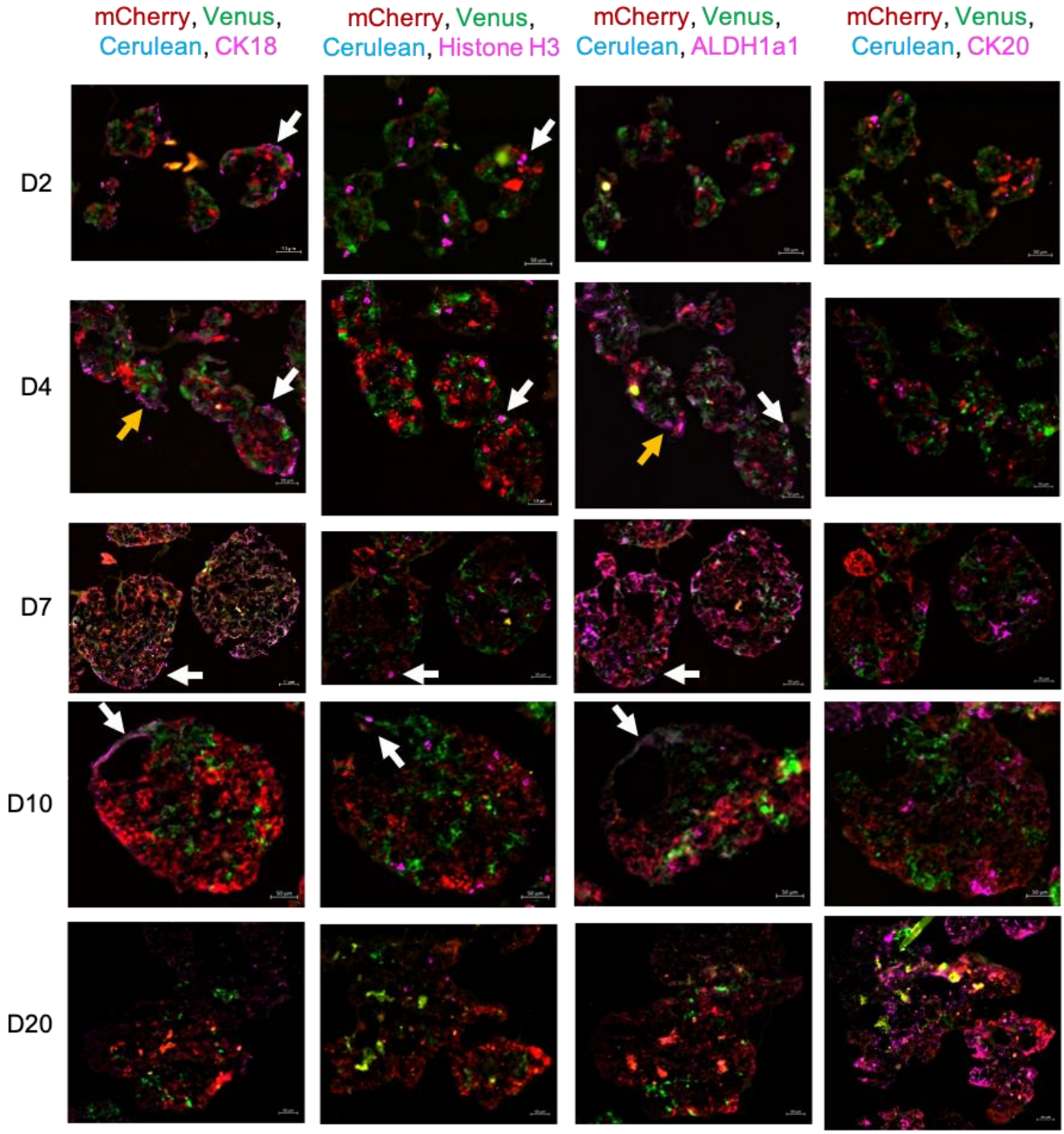
Les aires sous chaque courbe (Total Area) ainsi que l'erreur standard (Std. Error) et l'intervalle de confiance (95% Confidence Interval) ont été calculés avec GraphPad Prism pour les clones RVB avant (Tableau de gauche) et après modulation d'expression de TRα1 (Tableau de droite). Dans le second cas, un contrôle avec une lignée de Caco-2/TC-7 sauvage non infectée a été ajouté et est nommé Parent. Les population TRα1 augmentées sont les clones R45, TRα1-Normal sont V41 et TRα1 diminué sont B7.

7) Analyse par Western Blot des niveaux deTRα1 dans les cellules infectées ou parentales.



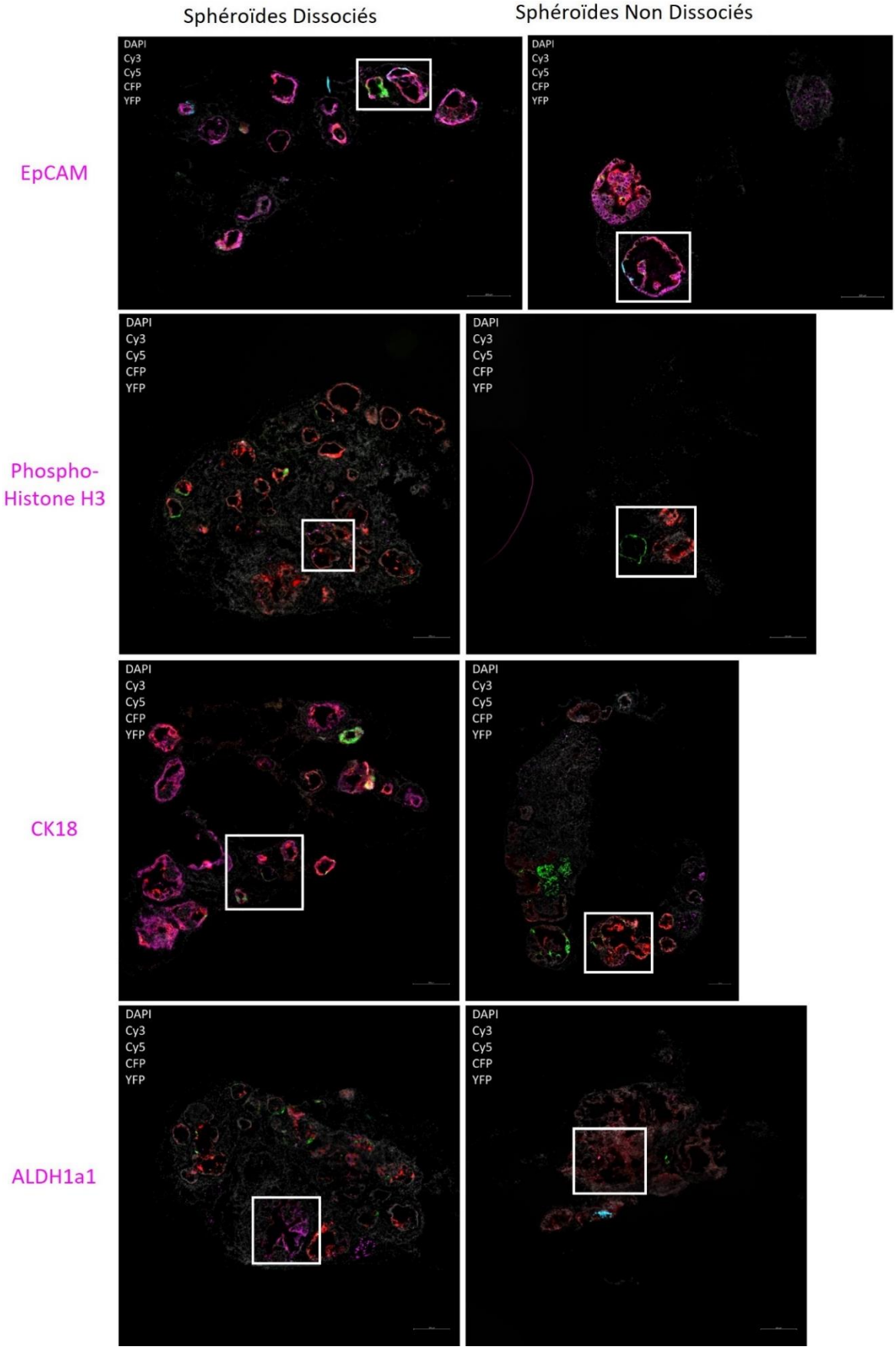
L'analyse en Western blot permet de quantifier le niveau d'expression de la protéine TRα1 (48kDa). La bande spécifique (flèche noire) a une taille de 48 kDa. Un anticorps anti-actine a été utilisé pour contrôler la charge totale de protéines dans chaque puits. La bande spécifique (flèche noire) a une taille de 43 kDa. La ligne en pointillés noirs délimite le résultat illustré en Figure 26, par rapport à la partie non illustrée (barrée).

8) Les sphéroïdes de Caco-2/TC-7 RVB reproduisent la mise en place de l'hétérogénéité intra-tumorale.



Aux jours 2, 4, 7, 10 et 20, des marquages en IF sur coupes congelées sériées de la CK18, phospho-Histone H3, ALDH1A1 et de la CK20 ont été réalisés (magenta). mCherry (rouge), Venus (vert), Cerulean (bleu). A chaque temps d'intérêt, les flèches représentent des zones positives à plusieurs marquages. Grossissement 20X, barre d'échelle 50 µm.

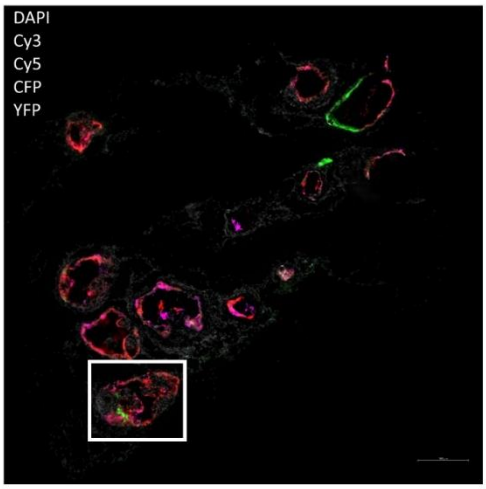
9) Caractérisation de l'hétérogénéité intra-tumorale après 90 jours de greffe des sphéroïdes RVB Caco-2/TC-7.

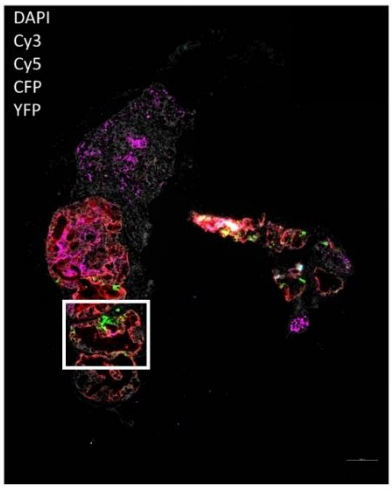


Sphéroïdes Dissociés

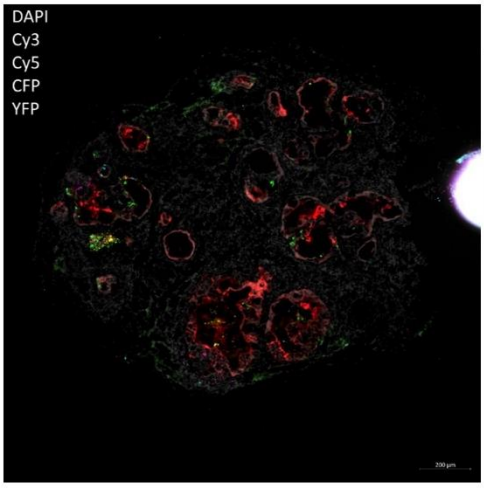
Sphéroïdes Non Dissociés

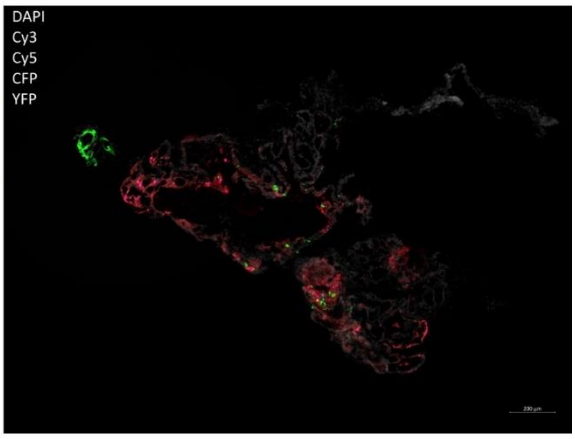
CK20



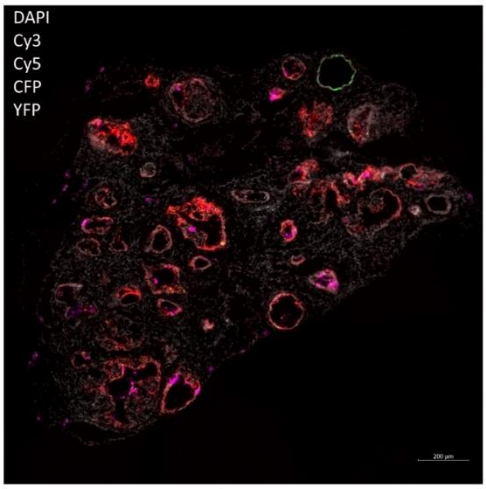


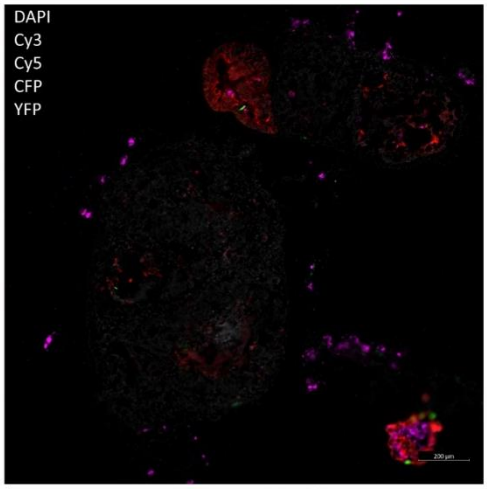
Ccnd1



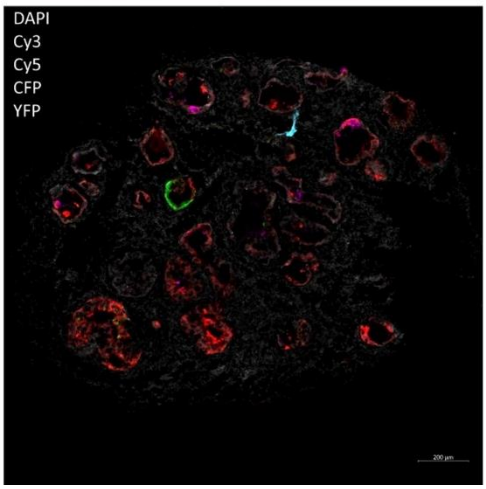


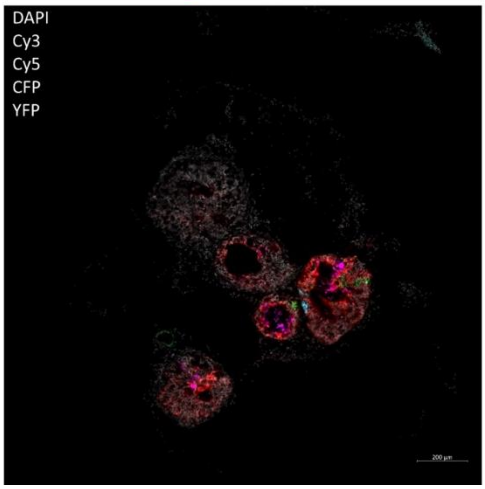
Ephrine B2





Lysozyme

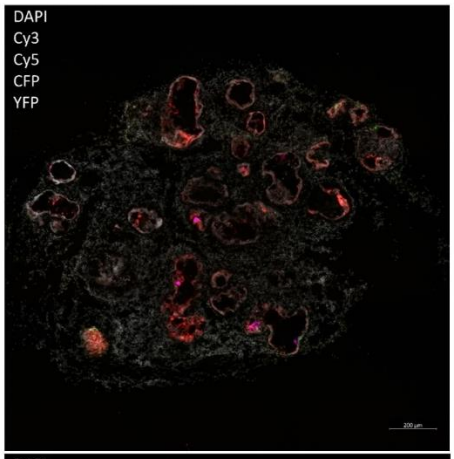


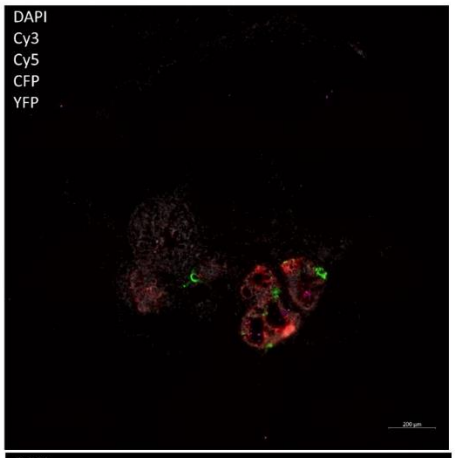


Sphéroïdes Dissociés

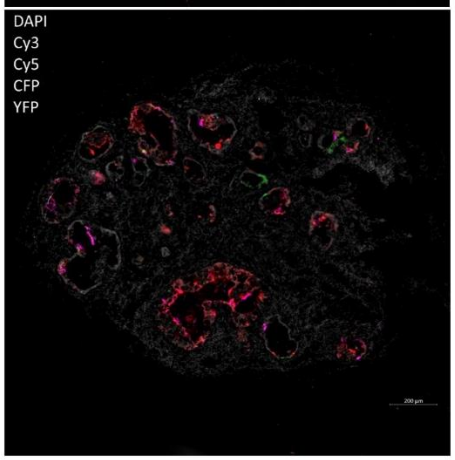
Sphéroïdes Non Dissociés

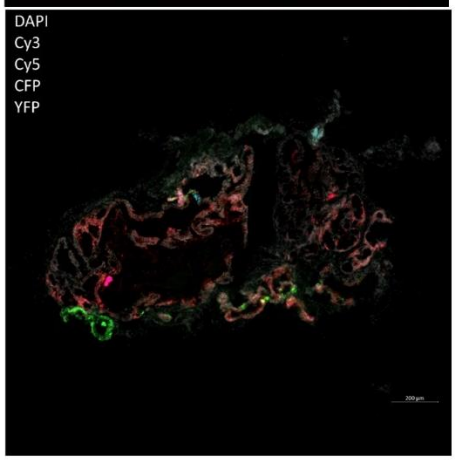
DCAMKL1



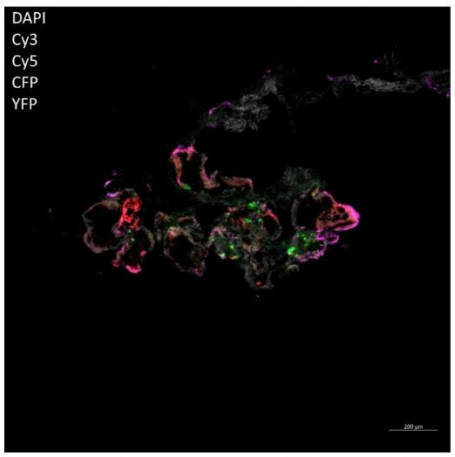


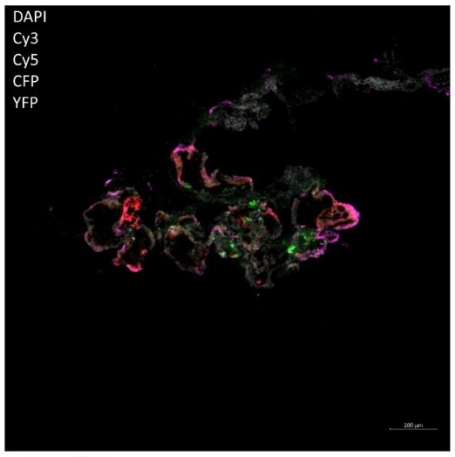
Aldolase B et C



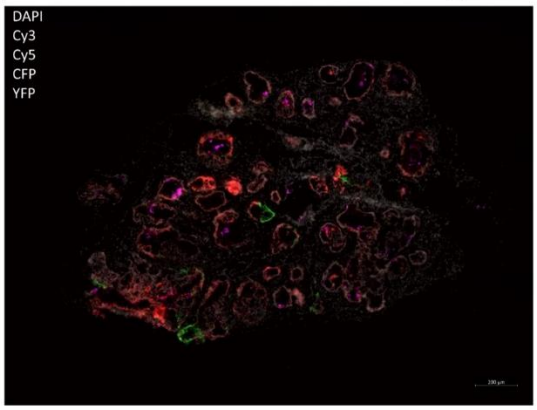


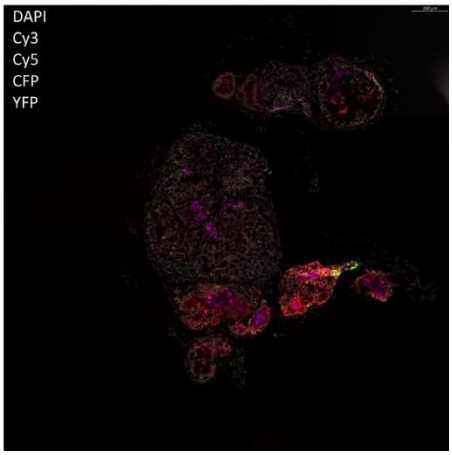
Chromogranine A





Mucine 2

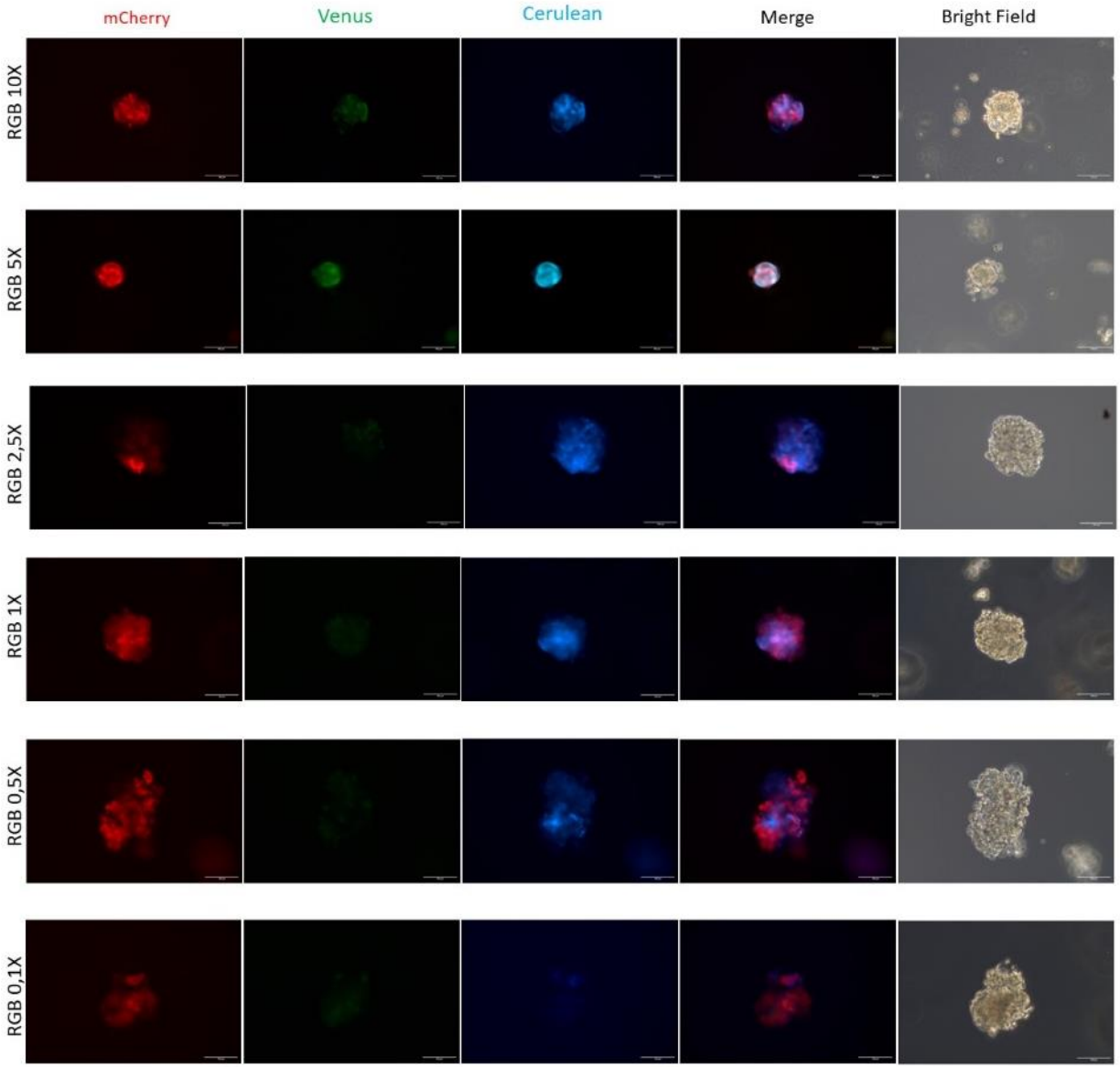




Après avoir été fixées des marquages sur coupes congelées des tumeurs entières ont été réalisées. Les images de gauche représentent les tumeurs issues de l'injection des sphéroïdes dissociés tandis que celles de droite proviennent des implantations des sphéroïdes entiers. Les noyaux sont marqués au DAPI (gris), mCherry (rouge) est détectée avec le filtre Cyanine 3 (Cy3), Cerulean (bleu) avec le filtre Cyan Fluorescent Protein (CFP), Venus avec le filtre Yellow Fluorescent Protein (YFP). Des marquages d'intérêt ont été réalisés en Cyanine 5 (Cy5) et apparaissent sur ces images en magenta. Les images ont été prises à un objectif 20X. Barre d'échelle 200 µm.

10) Analyse de la morphologie et du niveau de fluorescence des tumoroïdes RVB infectés à différents titres viraux.

	10X	5X	2,5X	1X	0,50X	0,10X
Titre viral (UI/mL)	1,4 x 10^8	7 x 10^7	3,5x 10^7	1,4 x 10^7	0,7 x 10^7	1,4 x 10^6



Les organoïdes dérivés de CCR humain sont infectés suivant une gamme de dilution de particules virales RVB (Tableau) et montrent après une semaine de culture différents niveaux de fluorescence et divers aspects morphologiques en fonction des titres d'infection. Observation microscopique effectuée sept jours après l'infection, au grossissement 20X, barre d'échelle 100 µm.

11) Mesure des aires des tumoroïdes pendant une semaine dans cadre des infections RVB.

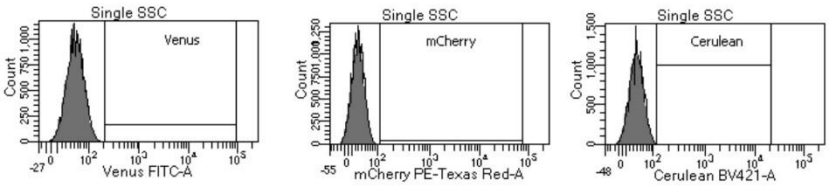
		Entretien			0,5X			0,75X			1X		
		Aire (µm^2)	%	Aire moy	Aire	%	Aire moy	Aire	%	Aire moy	Aire	%	Aire moy
J1	1	4905,33	100,00	2490	2354,05	100,00	2295	2596,18	100,00	1994	2714,82	100,00	3740
	2	1086,73	100,00		3580,74	100,00		2168,91	100,00		3958,54	100,00	
	3	2517,54	100,00		1344,24	100,00		1675,57	100,00		4830,58	100,00	
	4	1448,57	100,00		1899,54	100,00		1537,28	100,00		3456,74	100,00	
J2	1	5045,03	202,65	4749	2750,03	119,85	2977	2639,28	132,33	3172	4992,29	133,48	4389
	2	6186,85	248,51		2547,24	111,01		3854,99	193,28		4535,81	121,27	
	3	4514,65	181,34		4295,90	187,21		2311,22	115,88		4706,24	125,83	
	4	3248,67	130,49		2313,85	100,84		3883,61	194,72		3321,36	88,80	
J3	1	7365,05	295,84	8748	7205,58	314,02	6063	7288,80	365,45	6804	5870,24	156,95	9288
	2	13991,88	562,03		5624,42	245,11		6412,34	321,50		9070,37	242,51	
	3	8947,71	359,41		4751,41	207,07		5878,09	294,72		8181,84	218,76	
	4	4685,79	188,22		6670,36	290,69		7635,38	382,82		14031,36	375,15	
J4	1	9545,20	383,41	12591	5235,13	228,15	9247	10434,92	523,19	8963	11879,09	317,61	11357
	2	12762,14	512,63		7846,24	341,94		6387,37	320,25		10795,42	288,63	
	3	10345,09	415,54		15290,74	666,37		9081,13	455,31		11020,29	294,65	
	4	17713,50	711,52		8616,97	375,53		9950,06	498,88		11731,52	313,66	
J7	1	44838,15	1801,06	43220	23587,05	1027,92	28845	37345,13	1872,42	28929	30233,45	808,34	31026
	2	29189,49	1172,49		31725,86	1382,61		23515,15	1179,01		23934,31	639,93	
	3	55945,90	2247,24		33979,20	1480,81		24661,40	1236,48		32527,70	869,68	
	4	42904,70	1723,40		26088,63	1136,94		30193,21	1513,83		37410,53	1000,24	

Les aires de quatre structures par champ optique ont été mesurées aux jours 1, 2, 3, 4 et 7 dans des tumoroïdes humains infectés à 0,5X ; 0,75X et 1X ainsi que dans des cultures contrôles non infectées. L'aire est mesurée en μm^2, et la moyenne à chaque temps et dans chaque condition a été calculée. Une normalisation en pourcentage a été calculée en normalisant par le jour 1 dans chaque condition d'infection.

12) Titration en cytométrie en flux des tumoroïdes humains RVB.

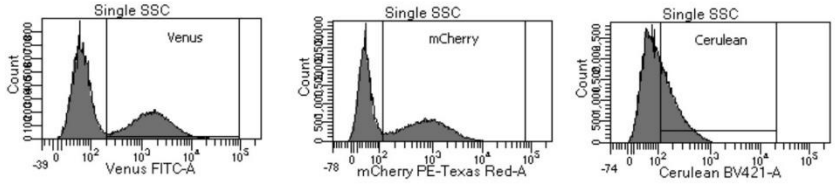
Experiment Name:	220711_Titration_hTum_002
Specimen Name:	Analyses RGB 110722
Tube Name:	Ctrl
Record Date:	Jul 11, 2022 4:17:08 PM
$OP:	PLATEROTI
GUID:	6b9c1e64-4f1e-4aac-be37-3801f6739b1d

Population	#Events	%Parent	%Grand ...	FSC-A Mean	SSC-A Mean
All Events	251,848	####	####	73,852	83,296
Morpho	164,799	65.4	####	79,330	70,706
Single FSC	159,540	96.8	####	79,048	69,796
Single SSC	158,511	99.4	####	79,024	69,761
Venus	371	0.2	####	59,500	97,063
mCherry	883	0.6	####	53,973	88,027
Cerulean	435	0.3	####	71,065	99,032
Venus OR mCherry OR Cerulean	1,000	0.6	####	60,399	90,370
Venus-1	371	37.1	####	59,500	97,063
mCherry-3	359	96.8	####	58,038	96,574
Cerulean-4	269	72.5	####	59,742	98,318
mCherry-3 OR Cerulean-4	361	97.3	####	58,237	96,577
NOT(mCherry-3 OR Cerulean-4)	10	2.7	1.0	105,068	114,594
mCherry-1	883	88.3	####	53,973	88,027
Venus-3	359	40.7	####	58,038	96,574
Cerulean-3	328	37.1	####	58,607	96,290
Venus-3 OR Cerulean-3	420	47.6	####	57,562	95,238
NOT(Venus-3 OR Cerulean-3)	463	52.4	46.3	50,716	81,485
Cerulean-1	435	43.5	####	71,065	99,032
Venus-1-1	269	61.8	####	59,742	98,318
mCherry-1-1	328	75.4	####	58,607	96,290
Venus-1-1 OR mCherry-1-1	330	75.9	####	58,822	96,296
NOT(Venus-1-1 OR mCherry-1-1)	105	24.1	10.5	109,542	107,633
Venus-1 AND mCherry-1	359	35.9	####	58,038	96,574
Cerulean-2	267	74.4	####	59,485	98,327
NOT(Cerulean-2)	92	25.6	9.2	53,838	91,487
mCherry-1 AND Cerulean-1	328	32.8	####	58,607	96,290
Venus-2	267	81.4	####	59,485	98,327
NOT(Venus-2)	61	18.6	6.1	54,764	87,376
Venus-1 AND Cerulean-1	269	26.9	####	59,742	98,318
mCherry-2	267	99.3	####	59,485	98,327
NOT(mCherry-2)	2	0.7	0.2	94,100	97,162
Venus-1 AND mCherry-1 AND Cerulean-1	267	26.7	####	59,485	98,327



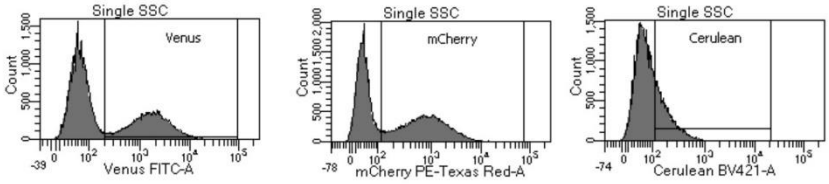
Experiment Name:	220711_Titration_hTum_002
Specimen Name:	Analyses RGB 110722
Tube Name:	0-5 X
Record Date:	Jul 11, 2022 4:36:54 PM
$OP:	PLATEROTI
GUID:	cd395fc5-6967-40e3-a98c-db6f389dbee8

Population	#Events	%Parent	%Grand ...	FSC-A Mean	SSC-A Mean
All Events	87,825	####	####	90,143	89,502
Morpho	58,638	66.8	####	88,876	73,851
Single FSC	56,217	95.9	####	88,267	72,642
Single SSC	55,991	99.6	####	88,202	72,524
Venus	22,785	40.7	####	89,315	73,166
mCherry	26,016	46.5	####	89,015	73,493
Cerulean	20,454	36.5	####	96,360	78,526
Venus OR mCherry OR Cerulean	42,253	75.5	####	89,848	73,691
Venus-1	22,785	53.9	####	89,315	73,166
mCherry-3	12,073	53.0	####	89,750	74,068
Cerulean-4	9,612	42.2	####	96,652	78,965
mCherry-3 OR Cerulean-4	15,982	70.1	####	91,462	75,154
NOT(mCherry-3 OR Cerulean-4)	6,803	29.9	16.1	84,270	68,497
mCherry-1	26,016	61.6	####	89,015	73,493
Venus-3	12,073	46.4	####	89,750	74,068
Cerulean-3	11,020	42.4	####	96,525	78,993
Venus-3 OR Cerulean-3	17,390	66.8	####	91,801	75,480
NOT(Venus-3 OR Cerulean-3)	8,626	33.2	20.4	83,398	69,487
Cerulean-1	20,454	48.4	####	96,360	78,526
Venus-1-1	9,612	47.0	####	96,652	78,965
mCherry-1-1	11,020	53.9	####	96,525	78,993
Venus-1-1 OR mCherry-1-1	14,929	73.0	####	96,583	78,866
NOT(Venus-1-1 OR mCherry-1-1)	5,525	27.0	13.1	95,757	77,607
Venus-1 AND mCherry-1	12,073	28.6	####	89,750	74,068
Cerulean-2	5,703	47.2	####	96,586	79,278
NOT(Cerulean-2)	6,370	52.8	15.1	83,630	69,403
mCherry-1 AND Cerulean-1	11,020	26.1	####	96,525	78,993
Venus-2	5,703	51.8	####	96,586	79,278
NOT(Venus-2)	5,317	48.2	12.6	96,459	78,688
Venus-1 AND Cerulean-1	9,612	22.7	####	96,652	78,965
mCherry-2	5,703	59.3	####	96,586	79,278
NOT(mCherry-2)	3,909	40.7	9.3	96,748	78,507
Venus-1 AND mCherry-1 AND Cerulean-1	5,703	13.5	####	96,586	79,278



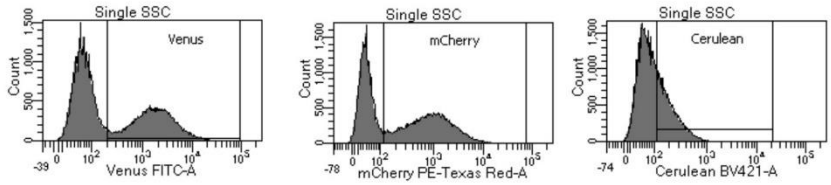
Experiment Name:	220711_Titration_hTum_002
Specimen Name:	Analyses RGB 110722
Tube Name:	0-75 X
Record Date:	Jul 11, 2022 4:42:58 PM
$OP:	PLATEROTI
GUID:	1a2b5ce8-1eac-4196-a5cb-3b7ba16150b8

Population	#Events	%Parent	%Grand ...	FSC-A Mean	SSC-A Mean
All Events	88,834	####	####	87,707	91,291
Morpho	56,062	63.1	####	86,218	73,649
Single FSC	53,535	95.5	####	85,382	72,274
Single SSC	53,208	99.4	####	85,283	72,086
Venus	21,369	40.2	####	86,441	72,832
mCherry	26,260	49.4	####	86,155	72,855
Cerulean	14,346	27.0	####	94,759	79,325
Venus OR mCherry OR Cerulean	38,568	72.5	####	86,828	73,161
Venus-1	21,369	55.4	####	86,441	72,832
mCherry-3	12,387	58.0	####	86,759	73,420
Cerulean-4	7,102	33.2	####	94,578	79,851
mCherry-3 OR Cerulean-4	14,670	68.7	####	88,172	74,452
NOT(mCherry-3 OR Cerulean-4)	6,699	31.3	17.4	82,650	69,285
mCherry-1	26,260	68.1	####	86,155	72,855
Venus-3	12,387	47.2	####	86,759	73,420
Cerulean-3	8,737	33.3	####	94,623	79,390
Venus-3 OR Cerulean-3	16,305	62.1	####	88,839	74,746
NOT(Venus-3 OR Cerulean-3)	9,955	37.9	25.8	81,760	69,757
Cerulean-1	14,346	37.2	####	94,759	79,325
Venus-1-1	7,102	49.5	####	94,578	79,851
mCherry-1-1	8,737	60.9	####	94,623	79,390
Venus-1-1 OR mCherry-1-1	11,020	76.8	####	94,875	79,526
NOT(Venus-1-1 OR mCherry-1-1)	3,326	23.2	8.6	94,374	78,660
Venus-1 AND mCherry-1	12,387	32.1	####	86,759	73,420
Cerulean-2	4,819	38.9	####	93,980	79,758
NOT(Cerulean-2)	7,568	61.1	19.6	82,161	69,385
mCherry-1 AND Cerulean-1	8,737	22.7	####	94,623	79,390
Venus-2	4,819	55.2	####	93,980	79,758
NOT(Venus-2)	3,918	44.8	10.2	95,413	78,938
Venus-1 AND Cerulean-1	7,102	18.4	####	94,578	79,851
mCherry-2	4,819	67.9	####	93,980	79,758
NOT(mCherry-2)	2,283	32.1	5.9	95,838	80,047
Venus-1 AND mCherry-1 AND Cerulean-1	4,819	12.5	####	93,980	79,758



Experiment Name:	220711_Titration_hTum_002
Specimen Name:	Analyses RGB 110722
Tube Name:	1 X
Record Date:	Jul 11, 2022 4:47:31 PM
$OP:	PLATEROTI
GUID:	89755c09-1775-4d4e-a697-09a065baebf4

Population	#Events	%Parent	%Grand ...	FSC-A Mean	SSC-A Mean
All Events	92,588	####	####	85,285	84,319
Morpho	58,041	62.7	####	87,629	69,733
Single FSC	55,210	95.1	####	86,708	68,169
Single SSC	54,801	99.3	####	86,616	67,963
Venus	24,043	43.9	####	87,933	68,633
mCherry	28,999	52.9	####	87,616	69,098
Cerulean	17,979	32.8	####	95,647	74,793
Venus OR mCherry OR Cerulean	41,909	76.5	####	88,170	68,996
Venus-1	24,043	57.4	####	87,933	68,633
mCherry-3	14,724	61.2	####	88,518	69,812
Cerulean-4	9,759	40.6	####	95,360	75,128
mCherry-3 OR Cerulean-4	17,651	73.4	####	89,711	70,432
NOT(mCherry-3 OR Cerulean-4)	6,392	26.6	15.3	83,022	63,666
mCherry-1	28,999	69.2	####	87,616	69,098
Venus-3	14,724	50.8	####	88,518	69,812
Cerulean-3	11,461	39.5	####	95,626	75,376
Venus-3 OR Cerulean-3	19,353	66.7	####	90,365	70,992
NOT(Venus-3 OR Cerulean-3)	9,646	33.3	23.0	82,100	65,299
Cerulean-1	17,979	42.9	####	95,647	74,793
Venus-1-1	9,759	54.3	####	95,360	75,128
mCherry-1-1	11,461	63.7	####	95,626	75,376
Venus-1-1 OR mCherry-1-1	14,388	80.0	####	95,644	75,005
NOT(Venus-1-1 OR mCherry-1-1)	3,591	20.0	8.6	95,659	73,943
Venus-1 AND mCherry-1	14,724	35.1	####	88,518	69,812
Cerulean-2	6,832	46.4	####	95,208	75,803
NOT(Cerulean-2)	7,892	53.6	18.8	82,726	64,625
mCherry-1 AND Cerulean-1	11,461	27.3	####	95,626	75,376
Venus-2	6,832	59.6	####	95,208	75,803
NOT(Venus-2)	4,629	40.4	11.0	96,242	74,745
Venus-1 AND Cerulean-1	9,759	23.3	####	95,360	75,128
mCherry-2	6,832	70.0	####	95,208	75,803
NOT(mCherry-2)	2,927	30.0	7.0	95,715	73,552
Venus-1 AND mCherry-1 AND Cerulean-1	6,832	16.3	####	95,208	75,803

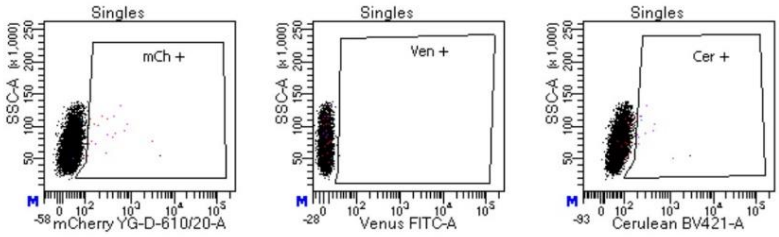


L'infection RVB des tumoroïdes humains a été effectuée aux titres viraux 0,5X ; 0,75X et 1X avec un contrôle non marqué permettant d'effectuer le gating. L'analyse en cytométrie, une semaine après l'infection, permet de déterminer la proportion totale de cellules fluorescentes (« Venus OR mCherry OR Cerulean ») ainsi que la proportion de cellules colorées dans cette population : vert « NOT(mCherry-3 OR Cerulean-4) » ; rouge « NOT(Venus-3 OR Cerulean-3) » ; bleu « NOT(Venus-1-1 OR mCherry-1-1) » ; jaune « NOT(Cerulean-2) » ; magenta « NOT(Venus-2) » ; cyan « NOT(mCherry-2) » et blanc « Venus-1 AND mCherry-1 AND Cerulean-1 ».

13) Le tri cellulaire permet de générer des cultures RVB de tumoroïdes humains.

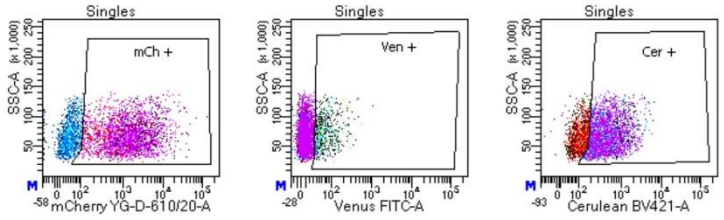
Experiment Name:	220719 Sorting test gating
Specimen Name:	Sorting tumoroides 190722
Tube Name:	Ctrl neg 190722
Record Date:	Jul 19, 2022 2:43:51 PM
GUID:	c0441c70-a786-47ef-9934-a31...
$OP:	EBELPLATEROTI

Population	#Ev...	%P...	%G...	SS... Mean	Cer... Mean
Singles	27,...	99.0	####	68,...	68
mCh +	79	0.3	####	94,...	205
Ven +	1	0.0	####	54,...	2,7...
Cer +	47	0.2	####	100...	316
mCh + OR Ven + OR Cer +	100	0.4	####	96,...	215
Ven +-1	1	1.0	####	54,...	2,7...
mCh +-2	1	100...	####	54,...	2,7...
Cer +-2	1	100...	####	54,...	2,7...
mCh +-2 OR Cer +-2	1	100...	####	54,...	2,7...
NOT(mCh +-2 OR Cer +-2)	0	0.0	0.0	####	####
Cer +-1	47	47.0	####	100...	316
mCh +-3	26	55.3	####	98,...	367
Ven +-2	1	2.1	####	54,...	2,7...
mCh +-3 OR Ven +-2	26	55.3	####	98,...	367
NOT(mCh +-3 OR Ven +-2)	21	44.7	21.0	103...	254
mCh +-1	79	79.0	####	94,...	205
Ven +-3	1	1.3	####	54,...	2,7...
Cer +-3	26	32.9	####	98,...	367
Ven +-3 OR Cer +-3	26	32.9	####	98,...	367
NOT(Ven +-3 OR Cer +-3)	53	67.1	53.0	91,...	125
mCh +-1 AND Ven +-1	1	1.0	####	54,...	2,7...
Cer +-4	1	100...	####	54,...	2,7...
NOT(Cer +-4)	0	0.0	0.0	####	####
mCh +-1 AND Cer +-1	26	26.0	####	98,...	367
Ven +-4	1	3.8	####	54,...	2,7...
NOT(Ven +-4)	25	96.2	25.0	100...	271
Ven +-1 AND Cer +-1	1	1.0	####	54,...	2,7...
mCh +-4	1	100...	####	54,...	2,7...
NOT(mCh +-4)	0	0.0	0.0	####	####
Ven +-1 AND Cer +-1 AND mCh +-1	1	1.0	####	54,...	2,7...

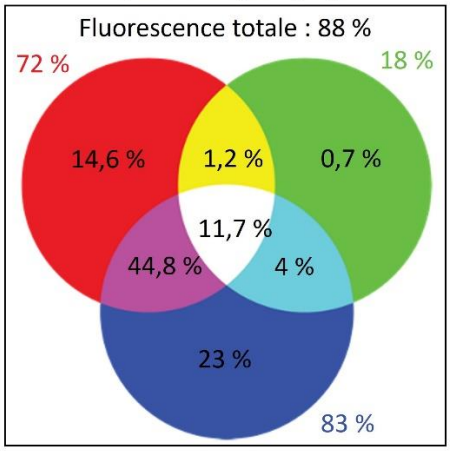


Experiment Name:	220719 Sorting test gating
Specimen Name:	Sorting tumoroides 190722
Tube Name:	RGB 1x 190722
Record Date:	Jul 19, 2022 3:54:11 PM
GUID:	751752fd-f1e3-482b-b2f6-ab45...
$OP:	EBELPLATEROTI

Population	#Ev...	%P...	%G...	SS... Mean	Cer... Mean
Singles	12,...	98.4	####	66,...	490
mCh +	7,9...	63.8	####	67,...	548
Ven +	1,9...	15.6	####	71,...	810
Cer +	9,1...	73.7	####	67,...	628
mCh + OR Ven + OR Cer +	10,...	88.2	####	66,...	542
Ven +-1	1,9...	17.7	####	71,...	810
mCh +-2	1,4...	72.9	####	72,...	890
Cer +-2	1,7...	89.0	####	72,...	897
mCh +-2 OR Cer +-2	1,8...	95.8	####	71,...	841
NOT(mCh +-2 OR Cer +-2)	81	4.2	0.7	69,...	111
Cer +-1	9,1...	83.5	####	67,...	628
mCh +-3	6,2...	67.7	####	68,...	671
Ven +-2	1,7...	18.8	####	72,...	897
mCh +-3 OR Ven +-2	6,6...	72.6	####	68,...	672
NOT(mCh +-3 OR Ven +-2)	2,5...	27.4	22.9	64,...	512
mCh +-1	7,9...	72.3	####	67,...	548
Ven +-3	1,4...	17.8	####	72,...	890
Cer +-3	6,2...	78.2	####	68,...	671
Ven +-3 OR Cer +-3	6,3...	79.9	####	68,...	659
NOT(Ven +-3 OR Cer +-3)	1,5...	20.1	14.6	65,...	110
mCh +-1 AND Ven +-1	1,4...	12.9	####	72,...	890
Cer +-4	1,2...	90.6	####	72,...	970
NOT(Cer +-4)	133	9.4	1.2	67,...	117
mCh +-1 AND Cer +-1	6,2...	56.5	####	68,...	671
Ven +-4	1,2...	20.7	####	72,...	970
NOT(Ven +-4)	4,9...	79.3	44.8	66,...	593
Ven +-1 AND Cer +-1	1,7...	15.7	####	72,...	897
mCh +-4	1,2...	74.3	####	72,...	970
NOT(mCh +-4)	445	25.7	4.0	70,...	686
Ven +-1 AND Cer +-1 AND mCh +-1	1,2...	11.7	####	72,...	970



1,40x10^7 UI/mL (1X)



L'infection RVB des tumoroïdes humains a été effectuée aux titres viraux 1X avec un contrôle non marqué permettant d'effectuer le gating. L'analyse en cytométrie, une semaine après l'infection, permet de déterminer la proportion totale de cellules fluorescentes (« mCh + OR Ven + OR Cer+ ») ainsi que la proportion de cellules colorées dans cette population : vert « NOT(mCh+-2 OR Cer+-2) » ; rouge « NOT(Ven+-3 OR Cer+-3) » ; bleu « NOT(mch +-3 OR Ven +-2) » ; jaune « NOT(Cer +-4) » ; magenta « NOT(Ven +-4) » ; cyan « NOT(mCh +-4) » et blanc « Ven +-1 AND Cer +-1 AND mCh +-1».

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Le code-barres Rouge-Vert-Bleu (RVB) : Un modèle fluorescent de suivi du lignage cellulaire pour déchiffrer la fonction du récepteur nucléaire de l'hormone thyroïdienne TRα1 dans l'hétérogénéité et la hiérarchisation du cancer colorectal.

Claret Léo

Soutenu le 8 décembre 2022

RESUME

Nos études précédentes ont mis en évidence les rôles clés du récepteur nucléaire de l'hormone thyroïdienne TRα1 dans le contrôle de la biologie des cellules souches/progénitrices des cryptes intestinales. Les mécanismes impliqués incluent les régulations des voies WNT et NOTCH et ces mêmes régulations sont présentes dans les cancers colorectaux humains (CCR). Plus particulièrement, nous avons observé un patron d'expression de TRα1 très variable dans les CCR, en accord avec la grande hétérogénéité de ces tumeurs.

Dans le but d'étudier les propriétés des populations cellulaires exprimant différents niveaux de TRα1, nous avons développé une approche de code-barres fluorescents et génétiques, un outil puissant pour générer aléatoirement des cellules traçables.

Pour cela, nous avons utilisé l'approche LeGO qui permet d'exprimer des combinaisons de protéines fluorescentes mCherry (rouge), Venus (vert) et Cerulean (bleu) dans des sphéroïdes de cellules Caco-2/TC-7 et des tumoroïdes dérivés de patients. Ces modèles RVB permettent d'étudier la nature et le comportement des populations de cellules à code-barres.

Pour valider le modèle, nous avons réalisé des expériences *in vitro* de sphéroïdes en culture et *in vivo* de sphéroïdes xénogreffés chez des souris immunodéprimées. Les sphéroïdes RVB avaient été générés en mélangeant un nombre égal de cellules Caco-2 exprimant différents niveaux de TRα1 pour analyser les propriétés de chaque clone et les corréler avec les caractéristiques tumorales. Les premiers résultats obtenus dans les deux modèles *in vitro* et *in vivo*, ont clairement montré une expansion du clone TRα1-Augmenté.

Afin d'analyser le comportement des clones dans un modèle d'oncologie humaine plus intégré et pertinent, nous réalisons actuellement des expériences sur des tumoroïdes dérivés de patients à code-barres RVB, dans un contexte de niveaux endogènes mais naturellement hétérogènes de TRα1.

MOTS-CLES : hétérogénéité intra-tumorale, lignage cellulaire, TH/TRα1, cancer colorectal, cellules souches cancéreuses, organoïdes dérivés de tumeurs humaines.