

RESUME

ABSTRACT

INTRODUCTION

I- L'épithélium intestinal et le contrôle de son homéostasie

1) Ontogénèse de l'intestin grêle	1
2) Structure de l'intestin grêle adulte.....	2
3) Les cellules souches intestinales	5
4) Dynamique des cellules souches intestinales et voies de signalisation.....	7
5) Choix, engagement dans un lignage et différenciation en cellules spécialisées	10
a) Rôle des voies de signalisation.....	10
b) Les facteurs de transcription.....	14
6) Plasticité du tissu.....	18
7) Modèle d'homéostasie : les organoïdes.....	21

II- La Chromatine

1) Une structure dynamique et collaborative.....	24
a) Remodelages ATP-dépendants de la chromatine et modifications post-traductionnelles des histones	25
b) Interdépendance des modificateurs et/ou modifications de la chromatine	26
c) Rôle de la dynamique chromatinienne dans la transcription	27
d) Rôle de la dynamique chromatinienne dans le devenir cellulaire	28
2) Dynamique des marques chromatinienne dans l'épithélium intestinal : destin cellulaire vs plasticité cellulaire.....	30
a) La dynamique chromatinienne au sein de l'épithélium intestinal normal.....	30
b) Rôle de la dynamique de la chromatine dans le choix et la mise en place d'un destin cellulaire	33
- H3K27me3 et le complexe PRC2	33
- Les HDAC et l'acétylation des histones.....	35
- La méthylation de l'ADN	36
- Les complexes de remodelage de la chromatine.....	37

c) Rôle de la dynamique de la chromatine dans la conservation de la plasticité cellulaire	38
3) Le variant d’histone H2A.Z	41
a) Rôle de H2A.Z et de ses modifications post-traductionnelles dans la transcription	43
b) Dynamique d’enrichissement en H2A.Z et devenir cellulaire.....	46
c) Dynamique d’incorporation de H2A.Z	47
d) Différences ou redondances fonctionnelles entre les isoformes de H2A.Z	49

RESULTATS

I- H2A.Z1 contrôle l’homéostasie de l’épithélium intestinal	53
1) Contexte	53
2) Résultats	54
3) Conclusion	92
II- H2A.Z1 et H2A.Z2 ont des rôles redondants et spécifiques dans le contrôle de l’identité des cellules intestinales	93
1) Contexte	93
2) Résultats	93
3) Conclusion	124

DISCUSSION

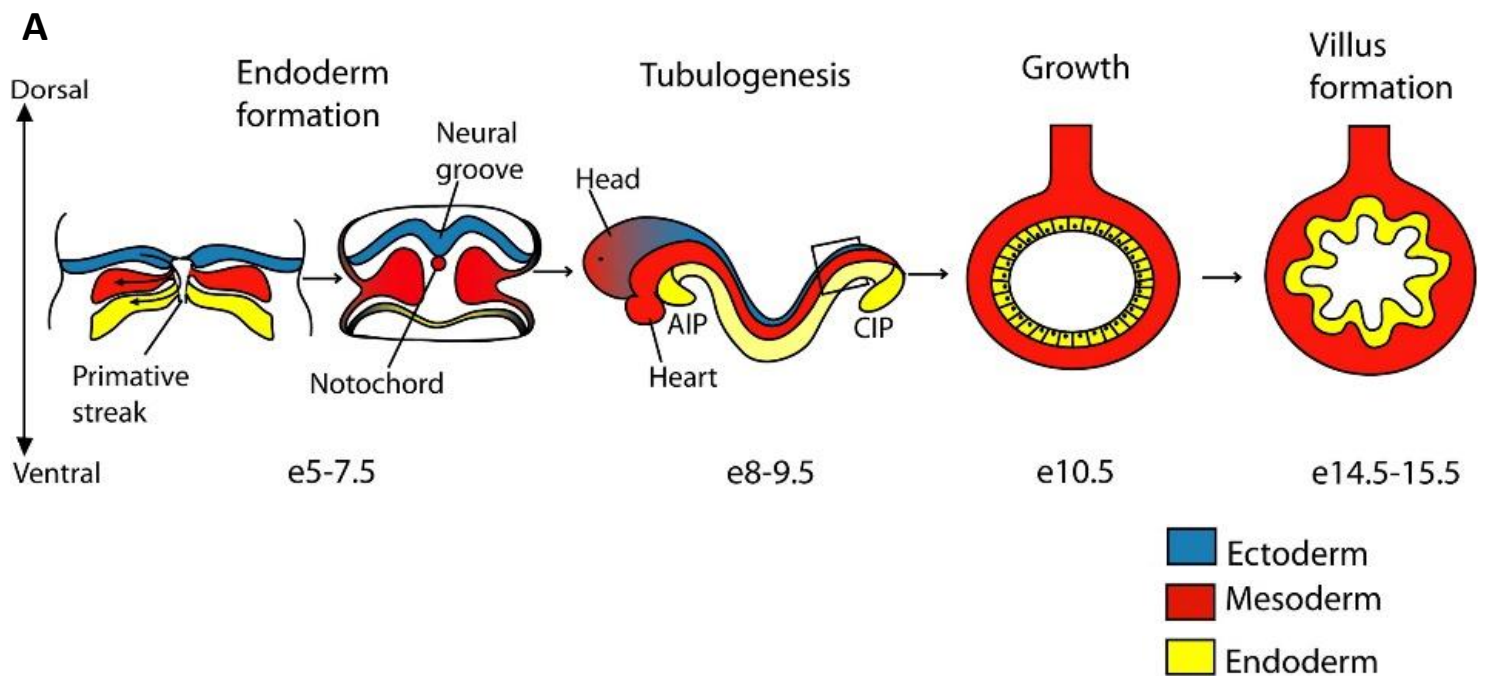
I- La dynamique du variant d’histone H2A.Z1 contrôle l’identité des cellules intestinales	125
a) H2A.Z1 contrôle la dynamique du facteur de transcription CDX2	125
b) H2A.Z1 et paysage chromatinien dans le contrôle de l’homéostasie	126
II- Rôles redondants ou spécifiques des 2 isoformes de H2A.Z	128
1) Rôles redondants	128
a) Les isoformes de H2A.Z assurent la robustesse du renouvellement de l’épithélium intestinal	128

b) Lien étroit entre H2A.Z et MATH1 dans le contrôle de l'identité des cellules progénitrices	129
2) Rôles spécifiques	131
a) Rôle spécifique dû aux modifications post-traductionnelles ?	131
b) Rôle spécifique dû à la dynamique du nucléosome ?	132
c) Rôle spécifique dû à l'interactome ?	132
III- Régulation de la dynamique de H2A.Z et de ses isoformes au sein de l'épithélium intestinal	133
1) Dynamique de H2A.Z total	133
a) Rôle des voies de signalisation	133
b) Rôle des complexes responsables de son incorporation et/ou éviction.....	134
c) Rôle des modifications post-traductionnelles	135
2) Dynamique spécifique de H2A.Z1 et H2A.Z2	135
IV- H2A.Z contrôle l'identité intestinale au cours du développement ?... 136	
V- H2A.Z et pathologies intestinales..... 138	
1) H2A.Z et cancers.....	138
2) H2A.Z et maladies inflammatoires de l'intestin	139
VI- H2A.Z dans la réponse à l'environnement extérieur	140

ANNEXE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION



B

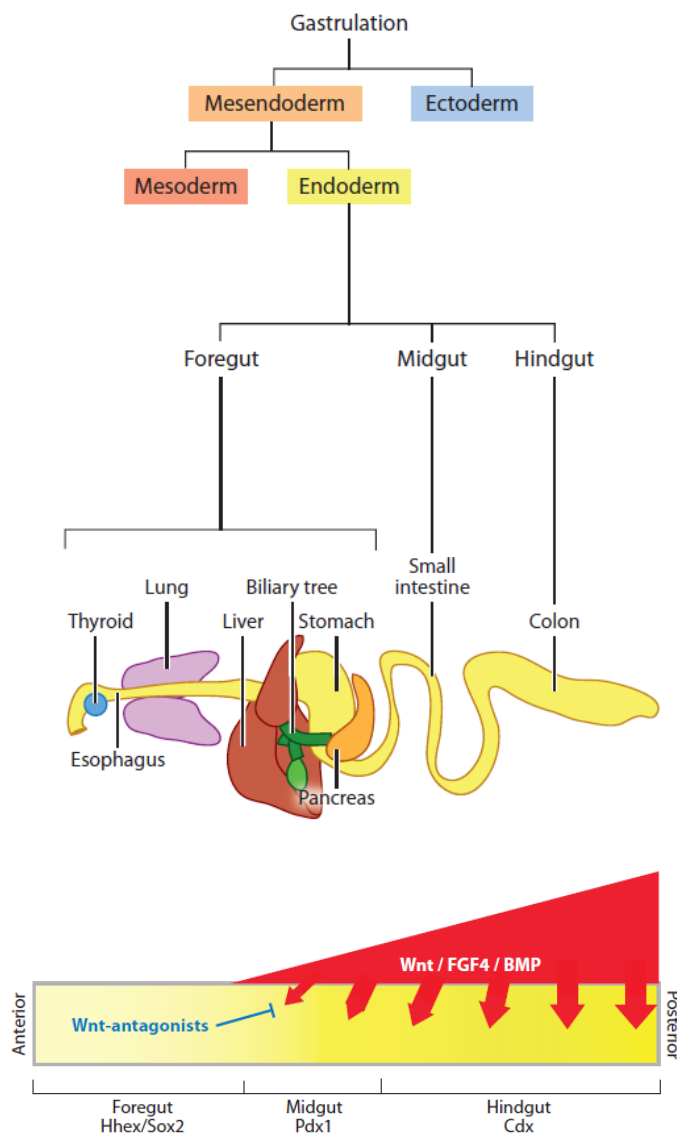


Figure 1 : Développement de l'intestin

A : La gastrulation survient entre E5 et E7.5 chez la souris pour donner naissance aux 3 feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme). Ensuite, la tubulogénèse endodermale se produit entre E8 et E9.5 jours de développement, puis le mésoderme entoure ce tube. Les 2 dernières figures représentent une coupe transversale de ce tube à E10.5 où l'endoderme est un épithélium pseudostratifié, et à E14.5 où la formation des villosités débute. D'après Noah et al., 2011. **B :** Le panel du haut représente les parties de l'intestin primitif et les segments de l'intestin adulte qui en découlent. Le panel du bas représente les patrons d'activation des voies de signalisation et des facteurs de transcription impliqués dans la régionalisation antéro-postérieure de l'intestin primitif. D'après Zorn and Wells, 2009.

I- L'épithélium intestinal et le contrôle de son homéostasie

1) Ontogénèse de l'intestin grêle

Le développement des organismes dépend de la spécialisation de cellules souches totipotentes en différents lignages cellulaires avec leurs caractéristiques spécifiques. Le premier événement nécessitant un choix de destinée cellulaire survient durant la gastrulation. Cette étape du développement permet l'apparition des 3 feuillets embryonnaires : l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme (Figure 1A). Chaque feuillet donne des tissus spécifiques, par exemple l'endoderme donne naissance aux systèmes respiratoires et digestifs, l'ectoderme à la peau et au système nerveux et le mésoderme aux systèmes sanguins, osseux et musculaires. Ce processus développemental est régulé par des gradients de facteurs de croissance solubles (WNT, FGF, TGF β ...). Ces facteurs se fixent sur leurs récepteurs à la surface des cellules pour induire l'activation des voies de signalisation intracellulaires et ainsi dicter leurs destins.

Par la suite, à partir du jour de développement embryonnaire 8,5 (E8.5) chez la souris, l'endoderme se replie pour former le tube digestif primitif (Figure 1A). Les mécanismes moléculaires de ce repliement sont encore peu connus, mais l'interaction avec le mésoderme qui entoure l'endoderme semble primordiale (Noah et al., 2011). Ce tube est alors régionalisé, notamment dans l'axe antéropostérieur (AP), en 3 parties : l'intestin primitif antérieur, moyen et postérieur. La partie antérieure donne naissance à l'œsophage, l'estomac ou encore le duodénum, la partie médiane au jéjunum et à l'iléon et la partie postérieure au cæcum et au colon. Cette régionalisation est également contrôlée par des gradients d'activation des voies de signalisation (WNT, BMP, FGF) mais aussi par des gradients d'expression de facteurs de transcription (*Cdx2*, *Foxa2*, *Sox2*) qui contrôlent la mise en place du programme transcriptionnel spécifique de chaque segment (revue Zorn and Wells, 2009) (Figure 1B). Par exemple, le facteur de transcription CDX2 est essentiel à la mise en place de l'identité postérieure de l'intestin primitif (Gao et al., 2009). La délétion du gène (KO) codant pour la protéine CDX2 spécifiquement dans l'endoderme à E8.5 entraîne, dans l'intestin adulte, une perte du colon ainsi qu'une modification de l'identité des cellules intestinales postérieures. Ces cellules, qui ont une identité iléale dans les souris sauvages, ont un transcriptome très similaire à celui de cellules d'œsophage dans le KO *Cdx2*, avec notamment l'expression des marqueurs de cellules squameuses de l'œsophage (*Krt13*,

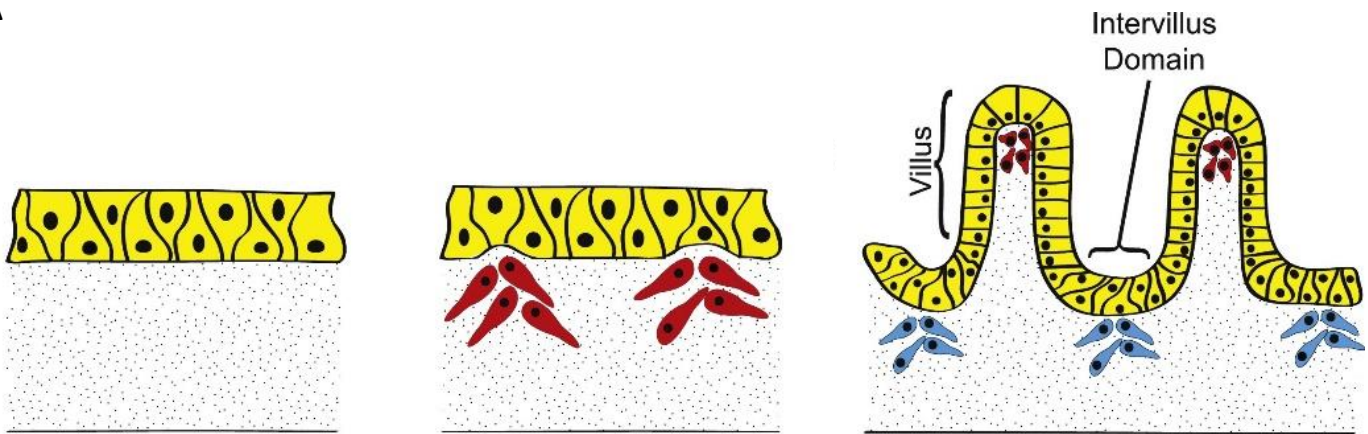
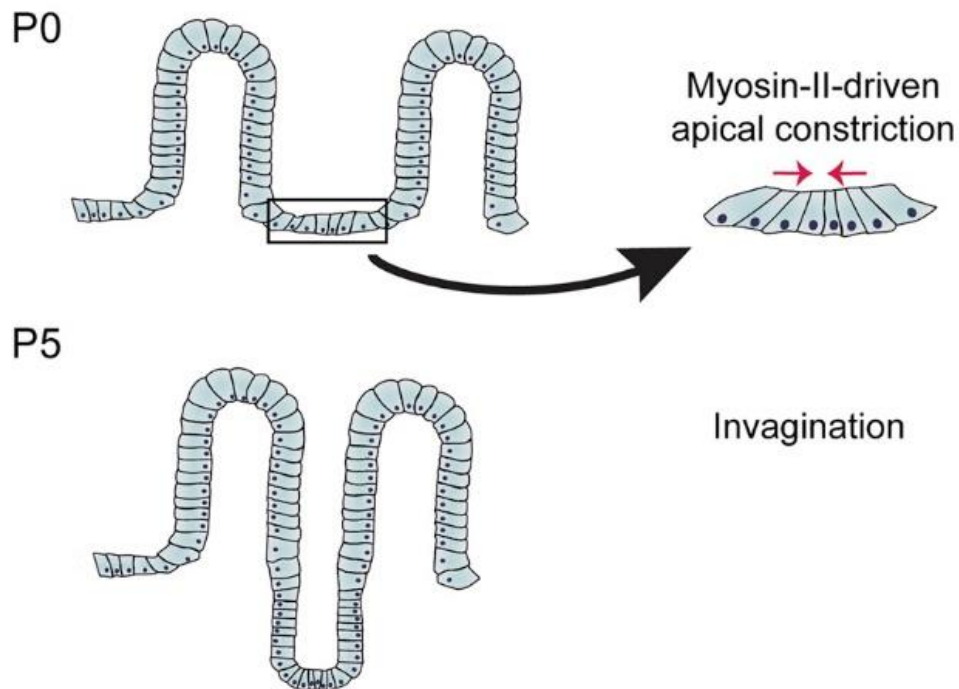
A**B**

Figure 2 : Morphogénèse de l'épithélium intestinal

A : Entre E9.5 et E13.5, l'épithélium pseudostratifié est plat. A E14.5 des cellules mésenchymateuses se regroupent en dessous de cet épithélium pour former les villosités. D'après Chin et al., 2017. **B** : Après la naissance, la constriction apicale des cellules entre les villosités permet l'invagination du tissu pour former les cryptes. D'après Sumigra y et al., 2018.

p63...) ainsi que l'expression du facteur de transcription antérieur *Sox2* (Gao et al., 2009). Ces résultats montrent l'importance du gradient d'expression de *Cdx2*, qui est plus exprimé dans la partie postérieure de l'intestin que dans la partie antérieure, dans la régionalisation antéro-postérieure de l'intestin en développement.

L'épithélium pseudostratifié du tube intestinal primitif se réorganise alors en épithélium colonnaire monostratifié avec l'émergence des villosités à E14-E15 (Figure 1A), qui seront le compartiment différencié de l'intestin grêle adulte. Pour ce processus, les cellules du mésenchyme qui soutiennent l'épithélium se regroupent, ce qui entraîne la formation de protubérances, qui seront les futures villosités (Figure 2A). L'émergence de ces villosités est contrôlée notamment par la voie de signalisation BMP. L'ajout de ligand de cette voie, par exemple BMP2, inhibe la formation des regroupements des cellules du mésenchyme et donc la formation de villosités. Ce contrôle négatif s'effectue au niveau des cellules mésenchymateuses puisque le KO du récepteur de la voie BMP (*Bmp1r*) dans ces cellules chez la souris, et pas dans les cellules épithéliales, entraîne l'augmentation de la taille des futures villosités (Walton et al., 2016). Entre chacune de ces futures villosités, l'espace est d'environ 60-70 μm et semble finement contrôlé. Dans cet espace, les cryptes, futurs compartiments prolifératifs, émergent dans les jours suivants la naissance (Noah et al., 2011) par invagination de l'épithélium entre les villosités, grâce à la constriction de la surface apicale de ces cellules (Sumigra et al., 2018) (Figure 2B). Cette morphogénèse des cryptes est dépendante de plusieurs mécanismes propres aux cellules épithéliales mais également de la communication avec le mésenchyme sous-jacent. Par exemple, elle requiert la Myosine II à l'intérieur des cellules épithéliales pour la constriction apicale (Sumigra et al., 2018), mais aussi le gradient de BMP dû aux cellules mésenchymateuses pour limiter cette morphogénèse (Haramis et al., 2004).

Tout ceci montre toute la richesse et la complexité des mécanismes mis en jeu pour le développement normal de l'intestin grêle et de sa muqueuse, essentielle à sa fonction.

2) Structure de l'intestin grêle adulte

L'intestin grêle a pour fonction principale de participer à la digestion des aliments en permettant l'absorption de nutriments, tout en ayant un rôle de barrière contre les multiples

A

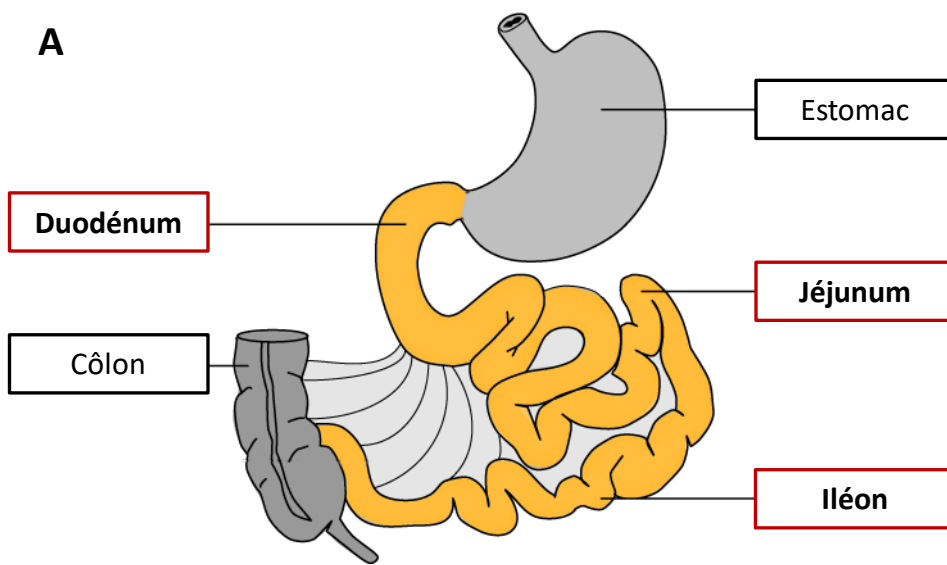


Figure 3 : Structure de l'intestin

A : L'intestin est localisé entre l'estomac et le côlon, et est composé de 3 parties fonctionnellement différentes : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Modifié d'après référence supplémentaire A. **B** : Schéma d'une coupe transversale avec les 4 couches de l'intestin : la séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse. Modifié d'après référence supplémentaire B.

B

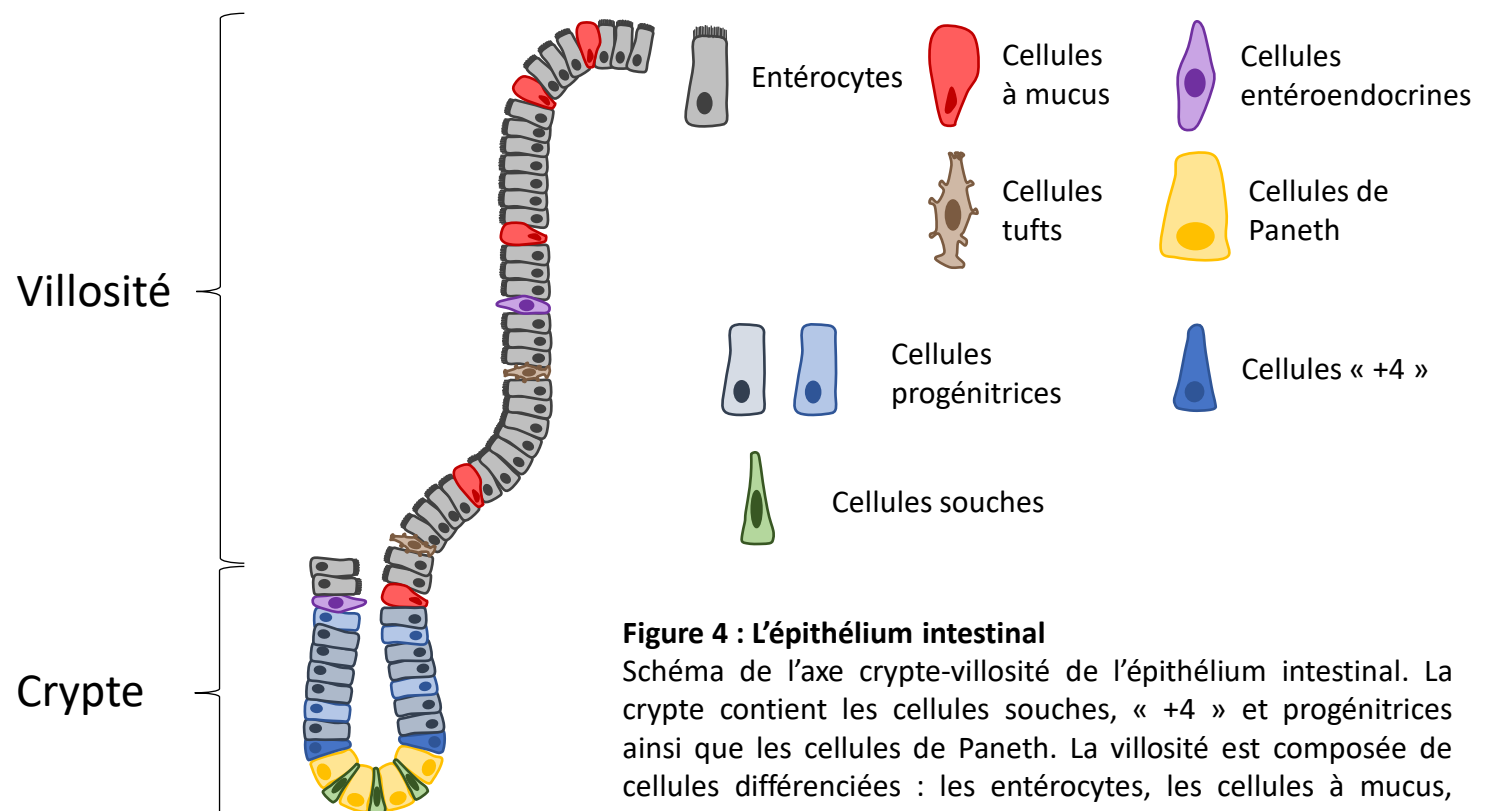
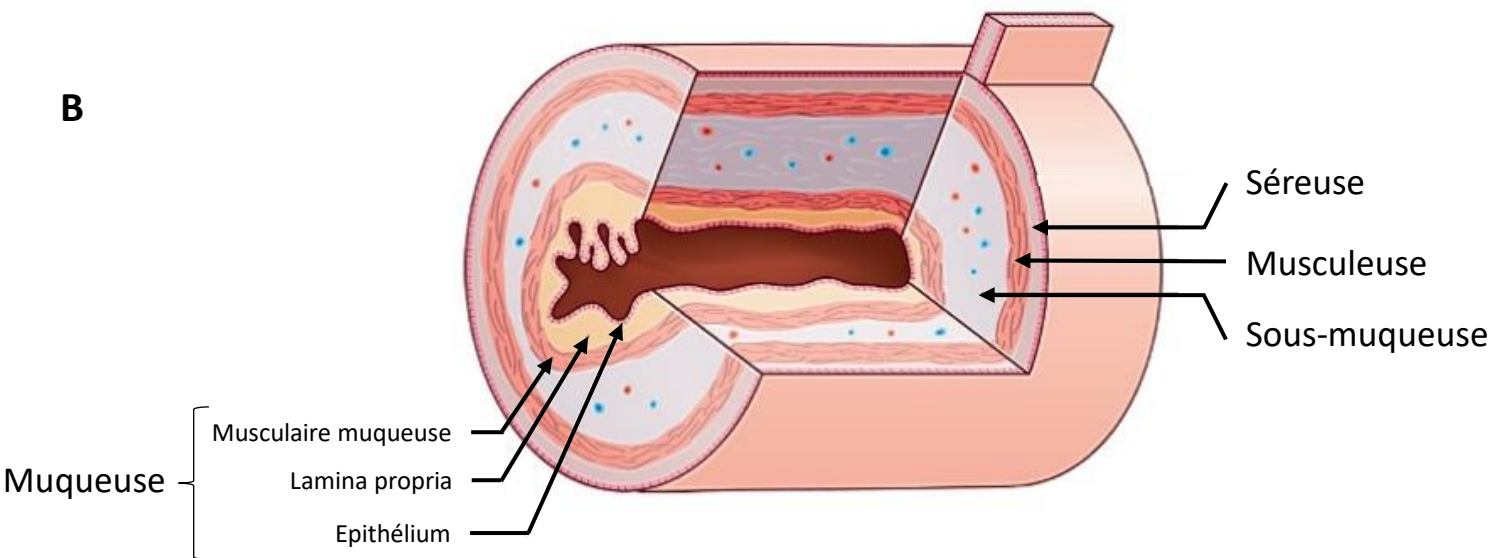


Figure 4 : L'épithélium intestinal

Schéma de l'axe crypte-villosité de l'épithélium intestinal. La crypte contient les cellules souches, « +4 » et progénitrices ainsi que les cellules de Paneth. La villosité est composée de cellules différenciées : les entérocytes, les cellules à mucus, entéroendocrines et tufts.

INTRODUCTION

agressions. Il mesure environ 6m de long chez l'homme et est divisé en 3 parties fonctionnellement distinctes (Figure 3A). La première partie, appelée duodénum, est adjacente à l'estomac et a plusieurs rôles fondamentaux. Le duodénum est le lieu de mélange du bol alimentaire avec les sels biliaires et pancréatiques, essentiels pour la digestion. Il permet également l'absorption de glucides et, dans une moindre mesure, celle des lipides et des acides aminés. Enfin il est également impliqué dans la neutralisation, au moins partielle, du pH du contenu digestif très acide à sa sortie de l'estomac (Sjöblom, 2011). La deuxième partie, appelée Jéjunum, est impliquée dans l'absorption de l'eau et des électrolytes mais aussi des glucides, des lipides et des acides aminés restants. Enfin, juste avant le colon, se trouve l'iléon qui permet l'absorption des nutriments restants.

L'intestin grêle est composé de 4 couches tissulaires différentes (Figure 3B). La plus interne à l'organisme, la séreuse, permet l'accroche du tube intestinal au péritoine et permet également d'éviter les frottements avec les autres organes. La deuxième, appelée la musculuse, est composée de muscles lisses qui permettent le péristaltisme intestinal et donc l'avancée du bol alimentaire le long de l'intestin. La troisième, la sous-muqueuse, est un tissu conjonctif de soutien qui comporte également des vaisseaux sanguins, lymphatiques et des nerfs. Enfin la couche la plus externe à l'organisme, en contact direct avec le milieu extérieur, est la muqueuse, qui comporte une fine couche musculaire, la lamina propria et l'épithélium intestinal.

L'épithélium monostratifié de l'intestin grêle est composé de 2 compartiments : les cryptes, qui constituent le compartiment prolifératif, et les villosités qui représentent le compartiment différencié constitué de plusieurs types de cellules non prolifératives (Figure 4). Le renouvellement de l'épithélium est médié par les cellules prolifératives de la crypte. En effet, les cryptes sont composées de cellules souches multipotentes, localisées à la base des cryptes, qui peuvent donner naissance à tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal. Ces cellules s'auto-renouvellent, pour conserver le stock de cellules souches, mais également donnent naissance aux cellules progénitrices (Figure 5). Ces cellules prolifèrent très rapidement avant de s'engager dans la différenciation. Cette différenciation en cellules spécialisées survient dans les villosités. Ces dernières sont composées de plusieurs types cellulaires divisés en 2 lignages : absorbant et sécrétoire. Le lignage absorbant est composé des cellules permettant l'absorption des nutriments : les entérocytes (Figure 5). Les entérocytes sont les cellules les plus représentées dans les villosités intestinales,

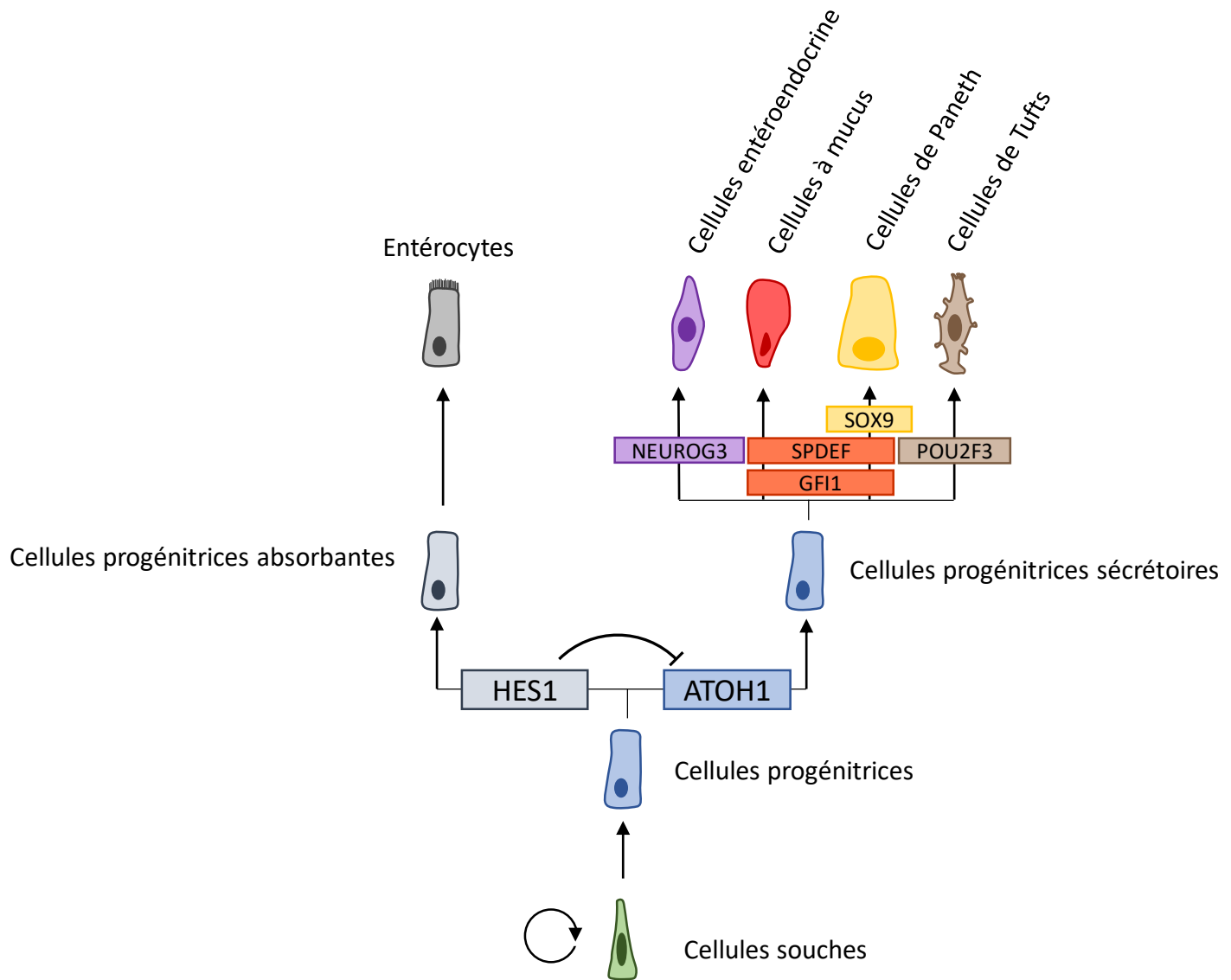


Figure 5 : Renouveau de l'épithélium intestinal

Les cellules souches s'auto-renouvellent (division symétrique) ou donnent naissance à des cellules progénitrices (division asymétrique). Les cellules progénitrices s'engagent ensuite dans le lignage absorbant ou le lignage sécrétoire grâce aux facteurs de transcription HES1 et ATOH1 respectivement. Enfin, la différenciation terminale des cellules survient grâce à l'action de facteurs de transcription spécifiques de chaque type cellulaire. Réalisée à partir de Gerbe et al., 2011.

représentant plus de 90% des cellules de l'épithélium intestinal (Barker et al., 2007). Ces cellules sont spécialisées dans l'absorption grâce notamment à la sécrétion d'enzymes protéolytiques (lactase, sucrase, ...) qui digèrent les aliments et à la présence, au pôle apical, de microvillosités qui permettent d'augmenter la surface d'absorption des nutriments ainsi issus du bol alimentaire. Le lignage sécrétoire comporte, lui, plusieurs types cellulaires (Figure 5). Les cellules caliciformes à mucus sont les cellules les plus représentées de ce lignage (4% de l'épithélium total, Barker et al., 2007). Elles sécrètent le mucus qui tapisse les villosités pour les protéger contre les agressions extérieures. Les cellules entéro-endocrines sont une sous-population très diversifiée dans l'intestin, et sécrètent un large panel de peptides et hormones qui sont essentiels à la physiologie de l'intestin (digestion et protection). Les cellules tufts représentent seulement 0,4% des cellules de l'épithélium intestinal, mais elles ont un rôle majeur dans la réponse immunitaire. En effet, le nombre de ces cellules augmente drastiquement en réponse à une infection parasitaire et permet également l'hyperplasie des cellules à mucus, processus essentiel à la réponse immunitaire et à l'expulsion du parasite (Gerbe et al., 2016). Enfin le dernier type cellulaire de ce lignage : les cellules de Paneth, sont, quant à elles, localisées dans la crypte (cf Figure 4). Ces cellules, qui ont une durée de vie supérieure aux autres cellules différenciées (environ 1 mois) sont placées à la base des cryptes, intercalées entre les cellules souches, et sont importantes pour la réponse immunitaire et le maintien des cellules souches (voir chapitre I-4 ci-après).

Grâce aux entérocytes, les villosités ont une grande capacité d'absorption mais elles sont également très vulnérables au milieu extérieur. La présence de bactéries, l'acidité provenant de l'estomac ou encore l'abrasion due aux mouvements du bol alimentaire et au péristaltisme sont très délétères pour les cellules des villosités. Pour pallier à cela, l'épithélium intestinal doit être constamment renouvelé, la régénération complète de l'épithélium prenant 3 à 5 jours. La balance entre le renouvellement de l'épithélium, via les cellules prolifératives de la crypte, et la différenciation en cellules spécialisées, au sein des villosités, est donc essentielle au maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal, et a fait l'objet d'intense recherches depuis plusieurs décennies.

3) Les cellules souches intestinales

Le renouvellement de l'épithélium intestinal dépend des cellules souches intestinales qui possèdent 2 caractéristiques principales : s'auto-renouveler durablement et pouvoir donner naissance à toutes les cellules de l'épithélium intestinal mature (Figure 5).

Historiquement, la localisation des cellules souches intestinales fut un sujet d'intenses débats. En 1974, Cheng et Leblond ont décrit les cellules colonnaires de la base de la crypte (CBC) comme étant des cellules souches. Pour cela, ils ont injecté de la thymidine radioactive à des souris ce qui entraînait la mort de certaines cellules de la crypte, probablement à cause des radiations. Les auteurs ont également observé que les cellules de la base de la crypte restantes phagocytèrent, au moins en partie, les cellules mortes, créant ainsi des phagosomes radiomarqués dans les CBC. Ce marquage des phagosomes a donc permis aux auteurs de suivre l'évolution de ces cellules. Quelques jours après le marquage des CBC, ils ont pu observer des cellules marquées dans tout l'épithélium intestinal, qui représentaient tous les types cellulaires différenciés. Les auteurs ont donc conclu que ces cellules à la base de la crypte pouvaient donner naissance à toutes les cellules de l'épithélium et pouvaient donc être considérées comme les cellules souches de l'épithélium intestinal (Cheng and Leblond, 1974). Potten et ses collaborateurs font, eux, l'hypothèse que les cellules souches conservent les brins d'ADN parentaux lors des mitoses successives pour éviter les mutations dues aux erreurs de réplication. Pour tester cette hypothèse, ils ont irradié (aux rayons X) des souris pour analyser le renouvellement de l'épithélium, et leurs ont injecté de la thymidine tritiée, plusieurs fois, pour marquer les cellules prolifératives. Quarante minutes après la dernière injection de thymidine tritiée, la quasi-totalité des cellules de la crypte est marquée. Cependant, 28 jours après la dernière injection, seules quelques cellules sont encore fortement marquées. Ils ont donc conclu que ces cellules qui retiennent ce marquage à long terme, placées au-dessus des cellules de Paneth (en position +4), étaient probablement des cellules souches (Potten et al., 1978). Cependant, cette méthode est basée sur une technique indirecte et dépendante de l'hypothèse des brins d'ADN parentaux conservés. Ces cellules pourraient aussi être des cellules différenciées à longue durée de vie. En 1999, Bjerknes et Cheng ont montré, grâce au suivi de clones mutés aléatoirement, que les cellules en positions 1 à 5 sont responsables du renouvellement de tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal et présentent également une longue durée de vie

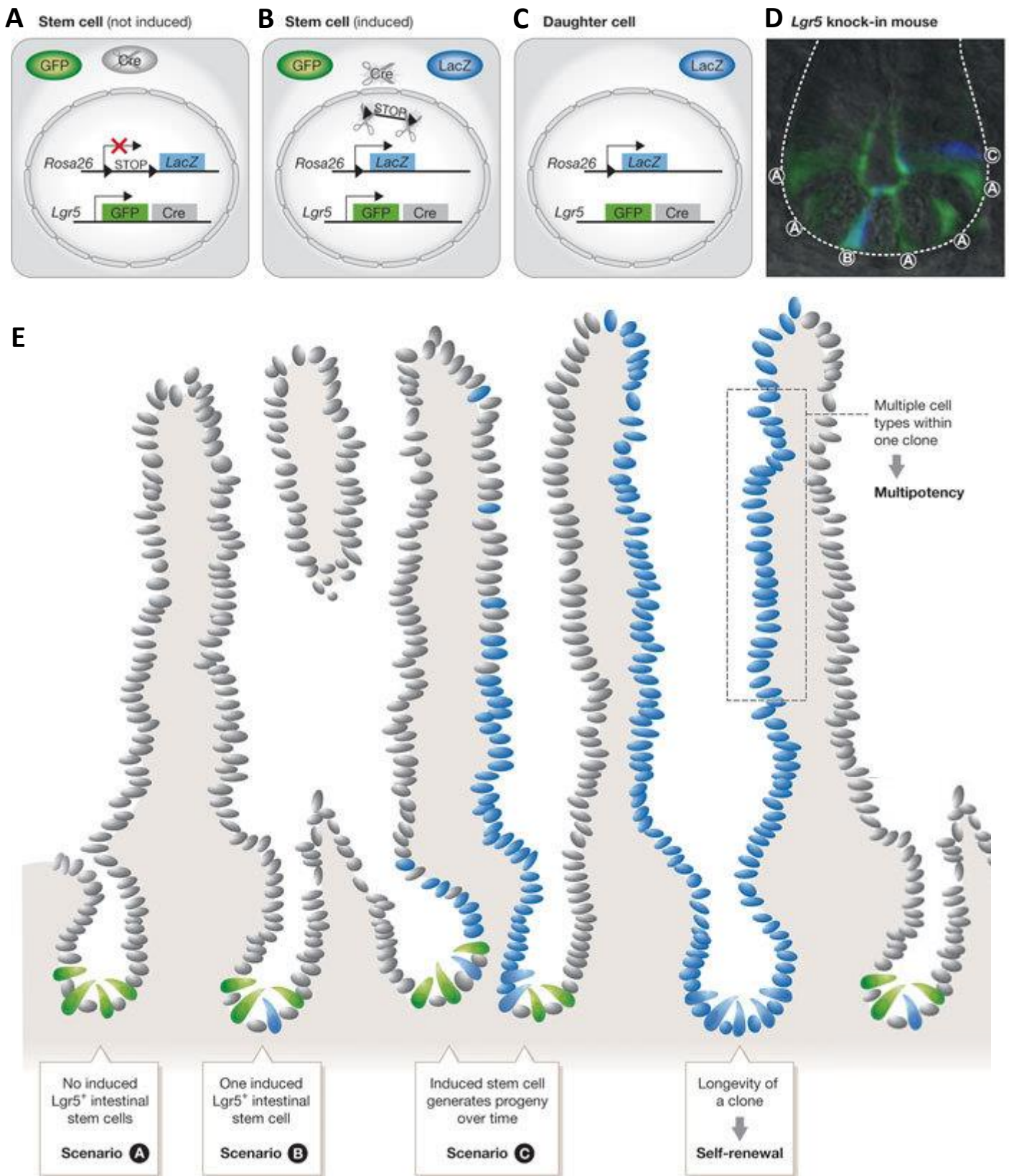


Figure 6 : Suivi du lignage *in vivo*

La GFP et la CRE sont exprimées sous la dépendance du promoteur du gène marqueur des cellules souches putatives (ici Lgr5). Ces cellules sont donc GFP⁺ en absence d'induction de la CRE (A), et deviennent aussi LacZ⁺ lors de l'induction de la translocation nucléaire de la CRE (B). Les cellules filles provenant d'une cellule souches induites sont alors LacZ⁺ et GFP⁻ (C). Le panel D montre *in vivo* les 3 différents scénarios cellulaires. E : Schéma du suivi du lignage à différents stades à partir de cellules souches Lgr5⁺, montrant la génération de clones à longue durée de vie et contenant tous les types cellulaires différenciés. D'après Snippert and Clevers, 2011.

(Bjerknes and Cheng, 1999). Cette étude confirme le caractère souche des cellules présentes à la base des cryptes.

L'avancée majeure dans la caractérisation des cellules souches intestinales a été la découverte des gènes marqueurs de ces cellules. La découverte de ces marqueurs spécifiques permet d'analyser les 2 grandes caractéristiques des cellules souches : l'auto-renouvellement et la multipotence. Pour cela, la technique du suivi de descendance des cellules souches, basée sur celle de Cheng et Leblond, a été mise au point. Dans cette technique, une cassette contenant les séquences de la *Gfp* et de la *Cre* recombinase (dont la translocation nucléaire est inductible grâce au tamoxifène) est insérée sous la dépendance du promoteur du gène marqueur putatif des cellules souches, de manière hétérozygote. Puis ces souris sont croisées avec des animaux contenant, dans le locus Rosa26, une séquence codant pour *LacZ* et qui ne s'exprime que lorsque la CRE recombinase est active. La révélation de la β -galactosidase permet ainsi de visualiser toutes les cellules qui ont exprimé la *Cre* durant leur vie (donc dans lesquelles le promoteur du gène marqueur putatif des cellules souches a été actif) et de suivre les cellules (descendantes) ayant héritées de la recombinaison (Figure 6). Le laboratoire de Hans Clevers a été le premier à utiliser cette technique pour la découverte du marqueur spécifique des CBC : *Lgr5* (Barker et al., 2007). Ils ont observé que, plusieurs jours après l'induction de la recombinaison, tous les types cellulaires expriment *LacZ*, ce qui confirme les observations de Cheng, Leblond et Bjerknes sur le caractère souche des CBC. Les auteurs ont également observé que les cellules souches du colon sont également *Lgr5*⁺ (Barker et al., 2007). Quant aux cellules en position « +4 », de nombreuses études ont été menées pour les caractériser. Les marqueurs *Bmi* (Sangiorgi and Capecchi, 2008), *mTert* (Montgomery et al., 2011), *Hopx* (Takeda et al., 2011) et *Lrig1* (Powell et al., 2012) ont été caractérisés comme permettant d'identifier des cellules préférentiellement en position +4, qui sont distinctes des cellules *Lgr5*⁺. Grâce à ces marqueurs, il a pu être mis en évidence la capacité de ces cellules à renouveler l'épithélium. Les auteurs ont observé que ces différents types cellulaires prolifèrent très faiblement par rapport aux cellules *Lgr5*⁺. Cependant, après irradiation, leur prolifération est stimulée, ce qui leur permet de renouveler l'épithélium rapidement. Les auteurs ont donc fait l'hypothèse que ces cellules permettraient le renouvellement du tissu en cas de lésion de celui-ci. Néanmoins, la spécificité des marqueurs de ces cellules +4 ainsi que la distinction

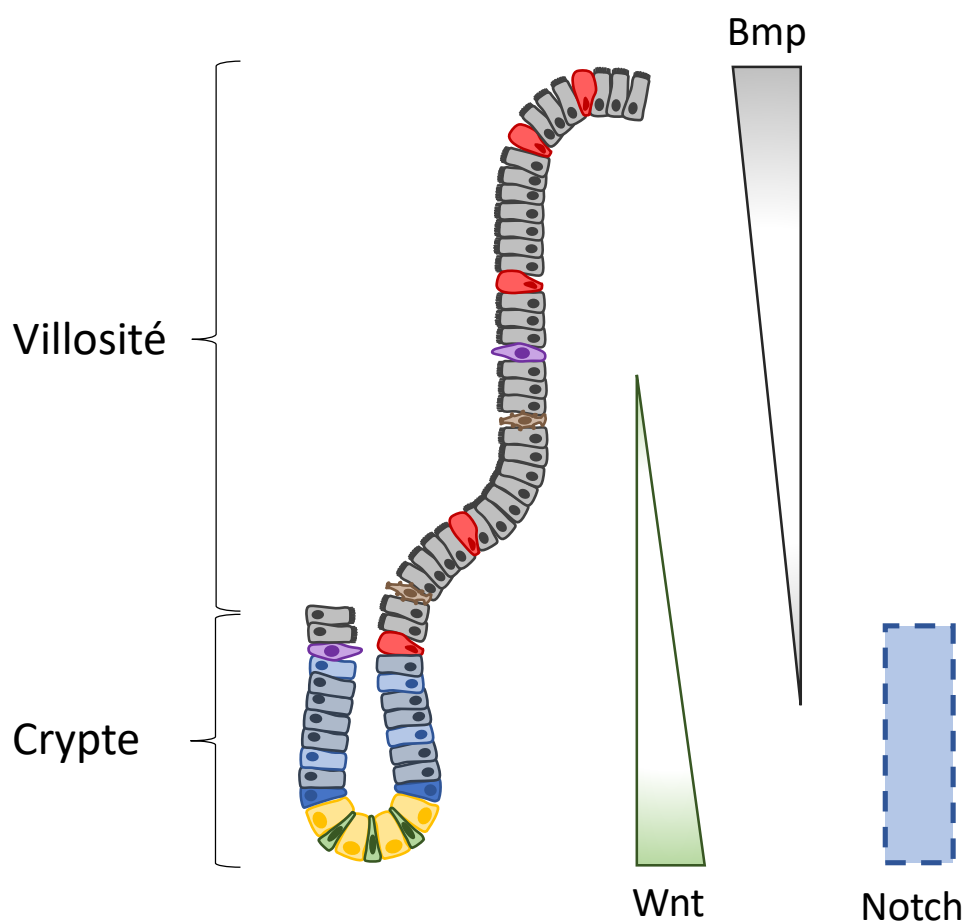


Figure 7 : Patron d'activation des voies de signalisation

La voie Wnt est fortement active dans les cryptes et favorise la prolifération et le maintien des cellules prolifératives. La voie Bmp est active dans les villosités et permet la différenciation des cellules. La voie Notch est active dans les cryptes au niveau des cellules progénitrices absorbantes et des cellules souches et permet notamment le choix du lignage de différenciation et le maintien de la prolifération.

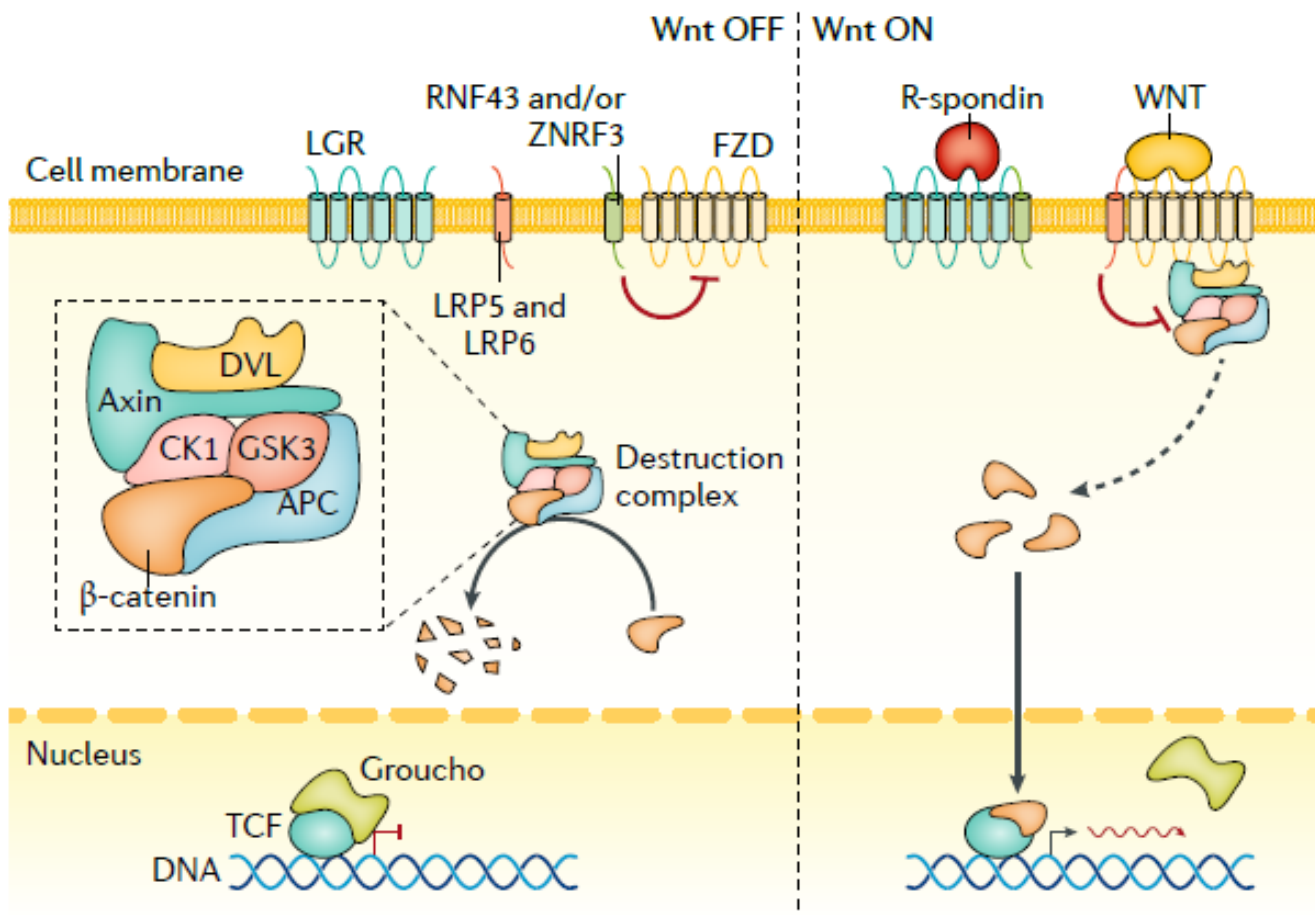


Figure 8 : La voie de signalisation Wnt

En absence de ligand, le complexe de destruction dégrade la β -caténine, et l'absence de R-spondine entraîne également la destruction du récepteur de la voie : Frizzled (FZD). En présence de ligand et de R-spondin, le complexe de destruction est inhibé, la β -caténine s'accumule et entre dans le noyau. La β -caténine se fixe alors à ses cibles avec les facteurs de transcription TCF pour permettre d'activer la transcription des gènes cibles de la voie. D'après Gehart and Clevers, 2019.

entre les différents types de cellules souches est encore source de débats (Li et al., 2014; Muñoz et al., 2012). A l'heure actuelle les CBC (*Lgr5*⁺), qui sont très prolifératives et localisées à la base de la crypte entre les cellules de Paneth, sont considérées comme les cellules souches permettant le renouvellement quotidien de l'épithélium. En revanche, les cellules en position +4 (plusieurs marqueurs et peut-être plusieurs types de cellules) sont toujours l'objet de débats pour savoir si ce sont réellement des cellules souches quiescentes qui permettent le renouvellement en cas de lésion du tissu.

4) Dynamique des cellules souches intestinales et voies de signalisation

L'analyse des mécanismes contrôlant le maintien et le renouvellement des cellules souches intestinales (ou ISC pour « Intestinal Stem Cells ») est essentielle pour mieux comprendre l'homéostasie du tissu. De nombreuses analyses ont été faites et ont montré le rôle fondamental de la voie de signalisation Wnt dans ce processus. En effet, le patron d'activation de la voie Wnt canonique corrèle avec les capacités prolifératives des cellules épithéliales intestinales : en effet, cette activité est majoritairement retrouvée dans les cryptes (Gregorieff et al., 2005) (Figure 7). La fixation d'un ligand de Wnt sur son récepteur entraîne la stabilisation du cofacteur de transcription β -CATENINE qui est alors relocalisé dans le noyau et permet l'expression des gènes cibles de Wnt, en association avec les facteurs de transcription TCF/LEF (Figure 8). Ainsi, dans l'épithélium intestinal, le KO du facteur de transcription *Tcf4* chez la souris est létal 1 jour après la naissance (Korinek et al., 1998). De même, le KO conditionnel chez l'adulte entraîne la perte totale de la prolifération 3 jours après le début de l'induction, ainsi que la perte de l'expression des gènes marqueurs des cellules souches CBC, cibles ou non de Wnt (*Lgr5*, *Olfm4*). Enfin, 1 semaine après la délétion de *Tcf4*, la taille des villosités diminue fortement, ce qui prouve le rôle de la voie Wnt dans l'homéostasie de l'épithélium et son renouvellement (van Es et al., 2012a). L'inhibition de la voie Wnt par son inhibiteur physiologique DKK1 entraîne l'apparition du même phénotype (Kuhnert et al., 2004). A l'inverse, l'activation constitutive de la voie Wnt, via la perte d'un autre inhibiteur de la voie : APC, entraîne une augmentation du nombre de cellules prolifératives, dont la localisation n'est alors plus restreinte au compartiment de la crypte (Sansom et al., 2004). Cette perte favorise aussi l'apparition de tumeurs intestinales (Fodde et al., 1994). Enfin la voie Wnt est également importante pour l'inhibition de la

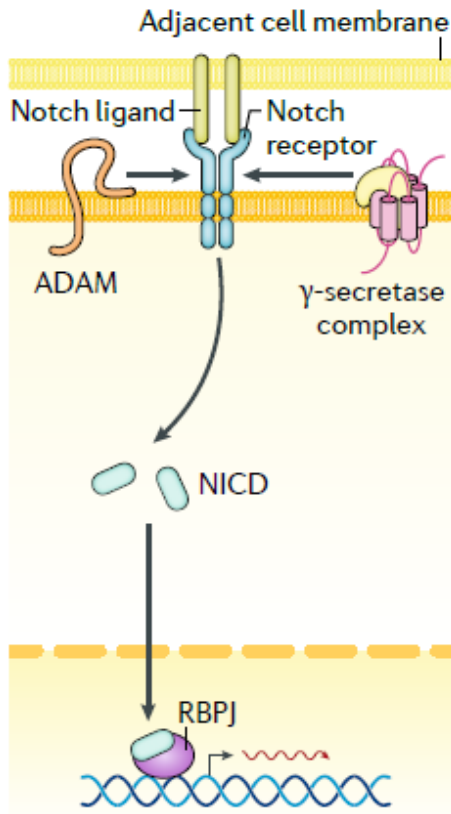
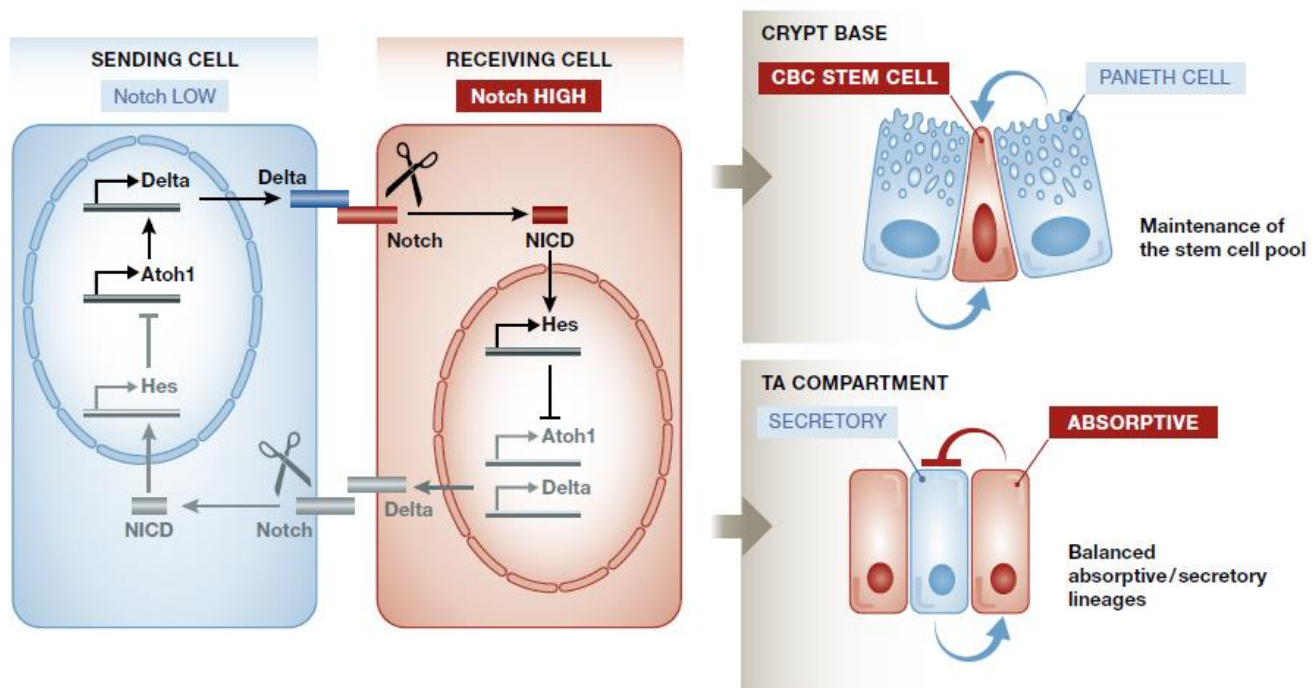
A**B**

Figure 9 : La voie de signalisation Notch

A : La fixation du ligand de Notch au niveau du récepteur de Notch entre 2 cellules adjacentes entraîne le clivage du domaine intracellulaire de Notch (NICD). NICD est alors transloqué dans le noyau où il se lie au facteur de transcription RBPJ pour permettre l'expression des cibles de la voie. D'après Gehart and Clevers, 2019. **B** : Schéma représentant le mécanisme d'inhibition latérale. Une cellule qui exprime les ligands de Notch (Delta) active la voie Notch dans la cellule adjacente. La cellule qui reçoit le message inhibe alors sa production de ligand de Notch, ce qui a pour conséquence d'inhiber la voie Notch dans la première cellule. Les panels de droite montrent ce mécanisme dans le contexte de l'épithélium intestinal entre les cellules de Paneth et les CBC et aussi entre les cellules progénitrices sécrétoires et absorbantes. D'après Sancho et al., 2015.

différenciation dans les cryptes. Pour cela, cette voie inhibe l'expression du facteur de transcription majeur de la différenciation : *Cdx2*, ainsi que sa cible *Muc2* (marqueur des cellules à mucus différenciées), grâce à l'expression dans la crypte du facteur de transcription cible de Wnt : *Sox9* (Blache et al., 2004). Tout ceci montre l'importance de la voie Wnt dans le maintien de la prolifération, de l'identité des cellules de la crypte intestinale et, par conséquent, l'importance de cette voie dans le renouvellement et le maintien de l'épithélium intestinal.

De manière similaire, la voie de signalisation Notch a également un patron d'activation restreint aux cryptes (cf Figure 7), ce qui suggère là encore un rôle dans le maintien des cellules souches (van Es et al., 2005; Riccio et al., 2008). La voie Notch agit via une signalisation juxtacrine, c'est-à-dire qu'elle nécessite un contact entre des facteurs exprimés par 2 cellules adjacentes : l'une qui exprime le ligand (ex : DLL1 ou 4) et l'autre qui exprime le récepteur (ex : NOTCH 1 ou 2) (Figure 9A). L'activation de la voie Notch dans la cellule réceptrice inhibe l'expression des ligands de Notch dans cette même cellule, qui ne pourra donc pas activer la voie dans ses cellules voisines. Ce mécanisme, appelé inhibition latérale, permet de contrôler l'activation de cette voie de façon binaire (Figure 9B). L'inhibition de cette voie, via le KO d'un facteur de transcription essentiel de la voie : *Rbpj*, ou via le KO des récepteurs *Notch1* et *Notch2*, entraîne une perte de la prolifération des cellules de la crypte. Ces cellules sont remplacées par des cellules post-mitotiques à mucus (van Es et al., 2005; Riccio et al., 2008). Ces études montrent l'importance de la voie Notch pour le maintien de l'identité et de la prolifération des ISC.

La localisation très spécifique de l'activation de ces voies fondamentales pour le maintien des ISC (cf Figure 7), appelée niche des cellules souches, pose la question des types cellulaires capables de générer cette niche. La localisation des cellules de Paneth, intercalées entre les cellules souches, font d'elles de bonnes candidates pour la régulation de la niche et donc le maintien des cellules souches. Une étude en 2011 a montré que ces cellules sont indispensables à la survie des ISC *in vivo* chez la souris, grâce probablement à leur sécrétion de ligands de la voie Wnt (WNT3 et 11) et d'EGF, ainsi qu'à l'expression des ligands de Notch (DLL1 et 4) (Sato et al., 2011). Cependant, 2 études plus récentes ont montré que la perte des cellules de Paneth n'entraînait pas de perte des ISC *in vivo* au cours du développement (Kim et al., 2012), ni durant le renouvellement normal ou après irradiation de l'épithélium

(Durand et al., 2012). La différence majeure entre les 3 études est le modèle d'induction de la perte des cellules de Paneth : dans la première, il s'agit soit d'un KO du facteur répresseur de transcription *Gfi1* qui est impliqué dans la différenciation des cellules de Paneth et des cellules à mucus, soit de l'expression de toxine diphtérique A sous la dépendance du promoteur de la cryptidine (spécifique des cellules de Paneth), ou encore via le KO du facteur de transcription *Sox9* (Sato et al., 2011). Dans les 2 autres études, la déplétion des cellules de Paneth est obtenue par le KO du facteur de transcription spécifique du lignage sécrétoire : *Math1* (*ATOH1* chez l'homme) (Durand et al., 2012; Kim et al., 2012). Une étude récente montre que le phénomène d'inhibition latérale survient entre les cellules de Paneth et les ISC (Chen et al., 2017) (Figure 9B), les cellules de Paneth exprimant les ligands de Notch (DLL1 et 4), ce qui active la voie Notch dans les ISC et a pour conséquence le maintien des ISC, mais aussi la diminution de l'expression de *Math1* dans ces cellules. On peut donc émettre l'hypothèse que la diminution de l'expression de *Math1* dans les ISC est importante pour leur maintien. L'augmentation de la prolifération dans les cryptes des souris sous l'effet d'une suractivation de Notch, et donc d'une diminution de l'expression de *Math1*, est en accord avec cette hypothèse (Fre et al., 2005), de même que l'augmentation de l'expression de certains marqueurs des ISC dans le KO *Math1* (Durand et al., 2012). Cette hypothèse permettrait de réconcilier les 2 hypothèses sur le caractère indispensable ou non des cellules de Paneth pour la niche des ISC, où les cellules de Paneth seraient indispensables pour activer la voie Notch dans les ISC, et notamment pour diminuer l'expression de *Math1* (Chen et al., 2017; Durand et al., 2012; Sato et al., 2011). Cependant les cellules de Paneth ne semblent pas indispensables pour la production des autres signaux de la niche souche (WNT, EGF...), comme en témoigne l'intégrité des ISC, même sans cellules de Paneth dans le KO *Math1* (Durand et al., 2012; Kim et al., 2012). De plus, une étude a montré que la sécrétion des ligands de Wnt, par les cellules épithéliales, n'est pas indispensable au maintien de l'épithélium (San Roman et al., 2014), ce qui confirme le caractère non indispensable de la sécrétion de WNT par les cellules de Paneth. La localisation spécifique des cellules de Paneth est également cohérente avec le mode de signalisation juxtacrine de la voie Notch. De plus, dans le colon, où il n'y a pas de cellules de Paneth, il a été montré qu'une sous-famille de cellules à mucus exprime les ligands de Notch (DLL1 et 4) et est localisée entre les cellules souches du colon (Rothenberg et al., 2012). Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, il semble intéressant d'analyser le maintien des ISC, et donc le renouvellement de

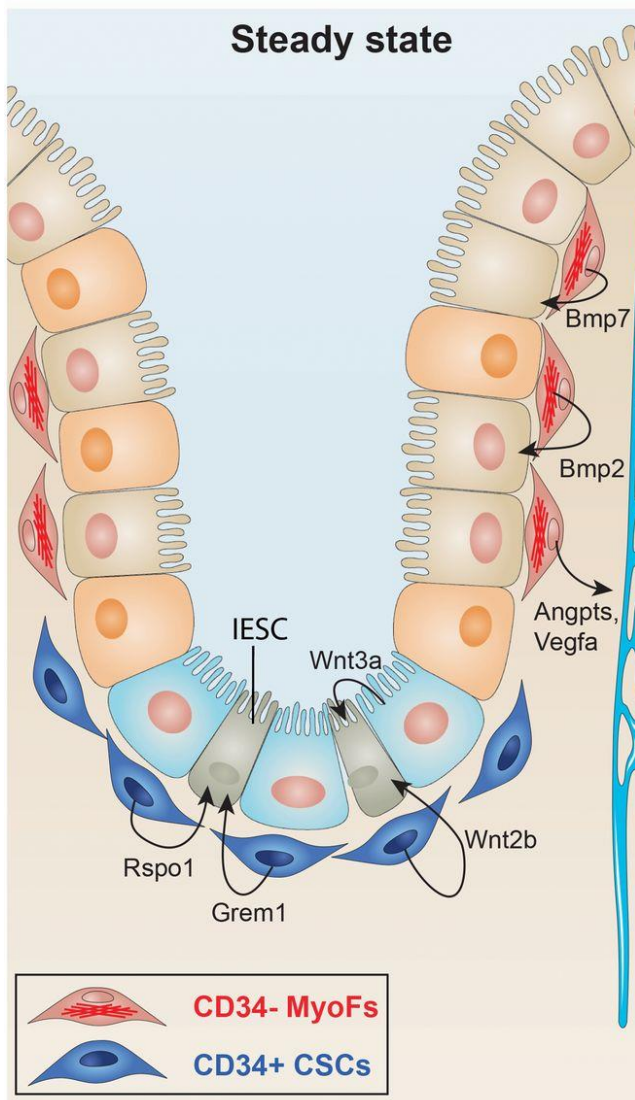


Figure 10 : Modèle du rôle des cellules mésenchymateuses dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal

Les cellules mésenchymateuses CD34+ présentes en dessous de la crypte sécrètent les facteurs importants pour le maintien des cellules souches (Rspo1, Grm1 et Wnt2b). Les cellules mésenchymateuses CD34- sont localisées en dessous des cellules épithéliales de la villosité et sécrètent des facteurs permettant notamment l'activation de la voie Bmp. D'après Stzepourginski et al., 2017.

l'épithélium, après inhibition de l'expression des ligands de ces voies de signalisation spécifiquement dans les cellules de Paneth.

Au vu de ces résultats, la présence d'un autre type de cellule capable de sécréter les facteurs essentiels à la niche des ISC semble requise. Les cellules mésenchymateuses localisées en dessous de l'épithélium intestinal semblent jouer ce rôle. Il a été montré, par de nombreux travaux, que les cellules mésenchymateuses proches des cryptes expriment et sécrètent les facteurs essentiels au maintien des ISC de l'épithélium (Stzepourginski et al., 2017) (Figure 10). Par exemple, il a été montré que l'ablation d'une sous-population de ces cellules, les fibroblastes *Foxl1*⁺ entraîne la perte des ISC de l'épithélium (Aoki et al., 2016). Ces cellules produisent les facteurs WNT2b, WNT5a, RSPO3 et GREM1 et 2, et ont pour fonction d'activer la voie Wnt et d'inhiber la voie Bmp. Cependant, une autre étude a montré que l'inhibition de la sécrétion des ligands de Wnt dans un autre type de cellules mésenchymateuses, les myofibroblastes, grâce au KO de *Porcn* (gène codant pour la protéine PORCN qui permet la sécrétion des ligands de WNT) n'a pas d'effet sur la signalisation Wnt dans l'épithélium et le maintien des ISC (San Roman et al., 2014). De plus, lorsque *Porcn* est délété à la fois dans ces myofibroblastes et dans l'épithélium, il n'y a, là non plus, pas d'effet sur le maintien des ISC. L'absence d'effet de ces délétions sur les cibles de la signalisation Wnt dans ces souris suggère que d'autres cellules mésenchymateuses sont capables de produire les ligands de Wnt (San Roman et al., 2014).

Tous ces résultats montrent la complexité de la régulation de la niche des ISC. Certains types cellulaires semblent indispensables à la production de certains signaux spécifiques, alors que d'autres semblent plutôt être impliqués dans la robustesse des signaux de la niche des ISC.

5) Choix, engagement dans un lignage et différenciation en cellules spécialisées

a) Rôle des voies de signalisation

Les ISC s'auto-renouvellent mais aussi se divisent en cellules progénitrices ; pour cela, elles se divisent soit de manière symétrique (une cellule souche qui donne 2 cellules souches), soit de manière asymétrique (une cellule souche qui donne 1 cellule souche et une cellule progénitrice). Les cellules progénitrices sont localisées au-dessus de la zone des ISC dans les cryptes. Elles prolifèrent de manière très active et s'engagent ensuite vers la différenciation

d'un des 2 lignages (cf Figure 4 et 5). Pour le maintien de la prolifération et de l'identité de ces cellules, les voies de signalisation Notch et Wnt sont essentielles, comme le montre la perte du marquage de cellules prolifératives KI67 dans les cryptes lors de l'inhibition de ces voies (van Es et al., 2005, 2012a).

Le choix de l'engagement dans le lignage sécrétoire ou absorbant est principalement contrôlé par la voie de signalisation Notch, via le contrôle du ratio entre les facteurs de transcription HES1 (favorisant le lignage absorbant) et MATH1 (favorisant le lignage sécrétoire ; appelé ATOH1 chez l'Homme) (voir Figure 5). Il a été montré que l'activation constitutive de la voie Notch, via l'expression de la forme constitutivement active du récepteur NOTCH1 dans l'épithélium intestinal, entraîne la perte de tous les types cellulaires du lignage sécrétoire. De plus, les entérocytes présentent des microvillosités moins nombreuses et moins rigides à leur pôle apical, comme pour les cellules moins différenciées, confirmant le rôle de Notch dans le maintien de l'identité des cellules progénitrices peu différenciées (Fre et al., 2005). Lors de l'inhibition de Notch, par le KO du facteur de transcription *Rbpj* ou par inhibition pharmacologique, le phénotype inverse apparaît avec la perte des entérocytes au profit du lignage sécrétoire, et notamment des cellules à mucus (van Es et al., 2005). Dans ces 2 cas, les expressions des facteurs de transcription *Hes1* et *Math1* sont dérégulées de manière opposée et l'étude du rôle de ces facteurs dans le contrôle du choix du lignage a donc été menée. Le KO de *Math1* entraîne la perte des cellules du lignage sécrétoire, alors que les entérocytes ainsi que l'expression de *Hes1* semblent non affectés (Shroyer et al., 2007; Yang et al., 2001). Le KO de *Hes1* a peu d'effet sur l'épithélium intestinal, avec seulement une légère augmentation du nombre de cellules du lignage sécrétoire, une absence d'effet majeur qui peut être expliquée par la compensation par d'autres facteurs de transcription de la même famille : HES3 et 5. D'ailleurs, le KO des 3 engendre une plus forte augmentation du nombre des cellules sécrétoires et une augmentation de l'expression de *Math1* (Ueo et al., 2012). Enfin Kim et ses collaborateurs ont étudié l'épistasie entre ces facteurs. Le KO *Rbpj*, comme dans les études précédentes, entraîne l'augmentation du lignage sécrétoire et la perte des entérocytes avec la diminution de l'expression de *Hes1* et l'augmentation de l'expression de *Math1*. Le KO de *Math1*, additionné à celui de *Rbpj*, reverse le phénotype avec une perte du lignage sécrétoire et une différenciation des entérocytes qui paraît normale (Kim and

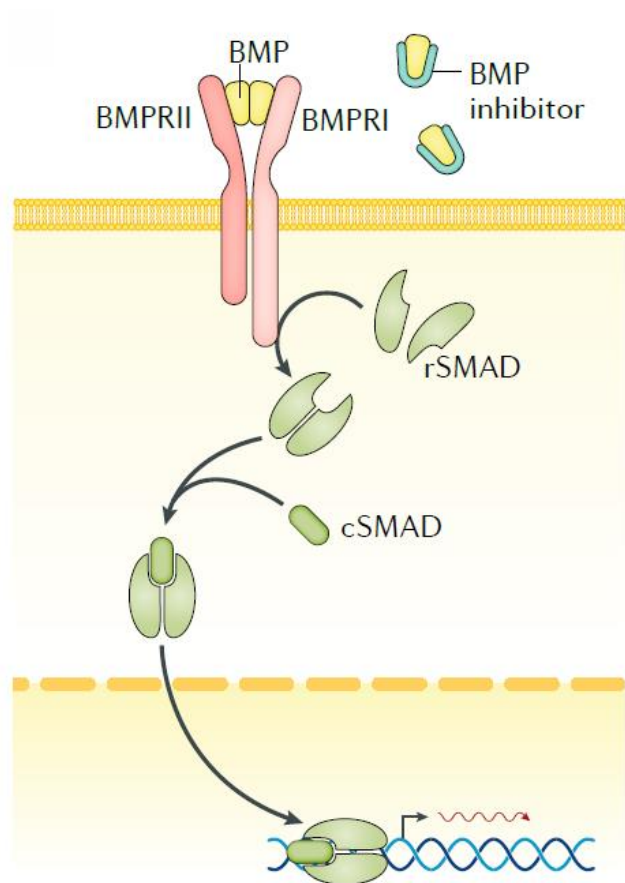


Figure 11 : La voie de signalisation Bmp

La liaison d'un ligand de la voie Bmp au récepteur BMPRII entraîne le recrutement du récepteur BMPRI. La dimérisation des récepteurs engendre la phosphorylation et la dimérisation des protéines rSMADs. Le dimère de protéines rSMADs se lie alors à la protéine SMAD4 (cSMAD), ce complexe entre alors dans le noyau pour réguler l'expression des cibles de la voie. D'après Gehart and Clevers, 2019.

Shivdasani, 2011). Ces résultats confirment l'épistasie entre la voie Notch et le facteur de transcription MATH1 dans le contrôle du choix du lignage. Cela confirme également le rôle fondamental de MATH1 dans le choix du lignage sécrétoire, et suggère que la perte des entérocytes dans le KO *Rbpj* n'est pas directement dû à l'inhibition de la voie Notch, mais plutôt à la très forte augmentation des cellules sécrétoires grâce à la dé-répression de *Math1*. Cette hypothèse est corroborée par la présence, dans les KO *Hes1/3/5*, d'entérocytes qui semblent fonctionnels (Ueo et al., 2012). La présence ou non du facteur de transcription MATH1 est donc essentielle au choix du lignage dans l'épithélium intestinal, et la voie Notch contrôle cette présence via le facteur de transcription HES1. Enfin, l'inhibition latérale médiée par la voie Notch permet de favoriser le lignage absorbant par rapport au lignage sécrétoire. En effet, lors du choix du lignage, une cellule progénitrice active pour la voie Notch, qui sera un futur entérocyte, inhibe la voie Notch de sa cellule voisine, qui sera une future cellule sécrétoire. Or la première continue de proliférer et donne donc plusieurs précurseurs d'entérocytes, alors que la seconde arrête rapidement. Ceci montre comment, à partir de 2 cellules progénitrices, la voie Notch, via l'inhibition latérale, permet la prédominance des cellules absorbantes au sein de l'épithélium intestinal (Sancho et al., 2015).

Pour terminer la différenciation des cellules, un changement d'activité des voies de signalisation est nécessaire. Comme développé précédemment, l'activité des voies Wnt et Notch est restreinte aux cryptes grâce à l'action des cellules de la niche des cellules souches (Stzepourginski et al., 2017), ce qui autorise la différenciation des cellules ayant migré dans les compartiments supérieurs (cf Figure 7). Cependant, l'activation d'autres mécanismes est également requise pour la différenciation terminale des cellules de l'épithélium intestinal. Ainsi, la voie Bmp est essentielle à la réalisation de ce processus : pour cela, les ligands (BMP 2, 4...) se lient aux récepteurs de type II (BMPRII) qui recrutent alors les récepteurs de type I (BMPRI), et ceci amorce la cascade de signalisation qui aboutit à l'activation (par phosphorylation) des facteurs de transcription SMAD (Figure 11). La voie Bmp est fortement active dans les villosités, suggérant un rôle dans la différenciation des cellules. Ce gradient est permis par une légère augmentation de la sécrétion des ligands (BMP 1, 2, 5 et 7) proche des cellules différenciées (Kosinski et al., 2007), mais également par la présence d'inhibiteur de cette voie (NOGGIN, GREMLIN 1 et 2) exclusivement aux abords des ISC et qui sont

sécrétés par les cellules mésenchymateuses sous-jacentes aux cryptes (He et al., 2004; Kosinski et al., 2007; Li et al., 2007b). Les KO du récepteur *Bmpr1a* ou celui du facteur de transcription *Smad4* dans l'épithélium intestinal entraînent l'apparition de structures, au sein des villosités, contenant des cellules prolifératives, ce qui confirme son rôle dans l'inhibition de la prolifération dans les villosités ainsi que dans la compartimentalisation de l'épithélium intestinal (Auclair et al., 2007; He et al., 2004; Qi et al., 2017). De plus, l'inhibition de cette voie entraîne l'augmentation du nombre d'ISC, et donc leur localisation plus haute dans la crypte, mais également l'augmentation de l'expression des gènes importants pour l'identité des ISC (*Lgr5*, *Olfm4*...), montrant le rôle de cette voie dans l'inhibition du caractère souche (Qi et al., 2017). Enfin, les cellules à mucus sont plus petites, les marqueurs de cellules de Paneth sont moins exprimés, le nombre de cellules entéroendocrines diminue fortement (Auclair et al., 2007) et l'expression des gènes spécifiques aux entérocytes est également compromise (Chen et al., 2019) dans ces souris, montrant le rôle fondamental de la voie Bmp dans la différenciation terminale des cellules intestinales des différents lignages. Ces études suggèrent qu'un simple changement de position des cellules au sein de l'axe crypte-villosité change leur identité cellulaire grâce notamment à ces gradients d'activation des voies de signalisation.

Dans le même ordre d'idée, l'interaction entre les cellules épithéliales et une matrice extracellulaire dont la composition est différente le long de l'axe crypte-villosité joue également un rôle important dans le changement d'identité des cellules au cours de la différenciation, participant là aussi à cet effet de position. Par exemple, la laminine5 α , qui est un des constituants de la matrice extracellulaire présents au contact des cellules épithéliales, est impliquée dans l'inhibition de la différenciation et de la polarisation des entérocytes (Lepage et al., 2018). L'étude complexe de la composition en laminine de la matrice extracellulaire le long de l'axe crypte-villosité, et des mécanismes de signalisation intracellulaires mis en jeu dans les interactions cellules/matrice, est donc un autre champ d'investigation essentiel à la compréhension des mécanismes d'homéostasie de l'épithélium intestinal (Beaulieu, 1999).

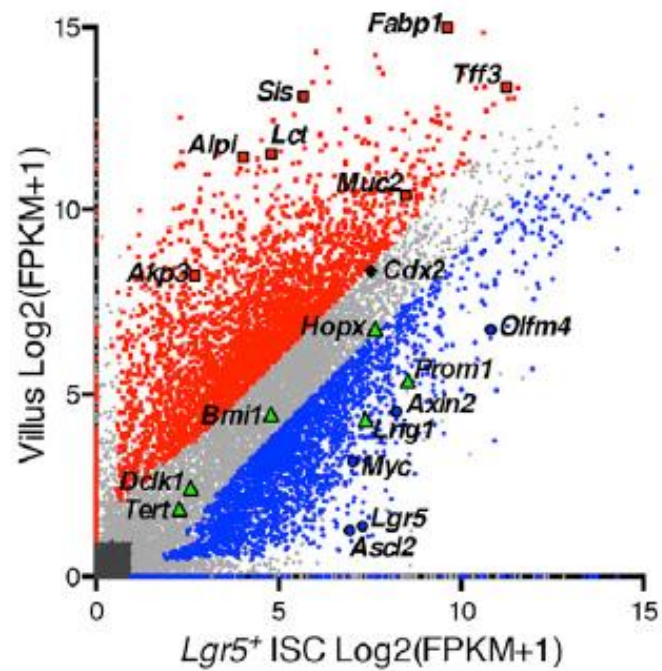


Figure 12 : Changement du transcriptome durant la différenciation des cellules souches intestinales

Transcriptomes des ISC Lgr5⁺ et des cellules de la villosité mesurés par RNA-seq. En rouge : les 3317 gènes plus exprimés dans les cellules de la villosité, et en bleu : les 2889 gènes plus exprimés dans les ISC (différences > 2 fois et p-value < 0,05). En gris : les 6752 gènes qui ont une expression comparable entre les 2 populations cellulaires. A noter : Cdx2 est exprimé fortement et de manière comparable entre les 2 populations. D'après San Roman et al., 2015.

b) Les facteurs de transcription

La différenciation peut être définie par le changement de phénotype d'une cellule (i.e. la spécialisation de la cellule) grâce aux changements d'expression de groupes de gènes (Potten et al., 2009). En effet, durant la différenciation intestinale le changement de transcriptome est énorme (entre 4000 et 6000 gènes sont différentiellement exprimés selon plusieurs études (Kazakevych et al., 2017; San Roman et al., 2015a) (Figure 12), ce qui suggère un rôle important des facteurs de transcription dans la mise en place de l'identité cellulaire spécialisée.

Le facteur de transcription de la famille des gènes homéobox CDX2, spécifique de l'épithélium intestinal, a été le sujet de nombreuses études. L'activité de CDX2 est notamment essentielle à la différenciation des cellules de l'épithélium intestinal. Tout d'abord, CDX2 réprime la prolifération des cellules HIEC, modèle des cellules intestinales humaines de la crypte. Au niveau transcriptionnel, cette répression passe notamment par l'inhibition de l'expression du gène Cycline D1, qui est essentiel au bon déroulement du cycle cellulaire (Escaffit et al., 2006). Une autre étude a montré, dans des cellules humaines de cancer colorectal, que CDX2 a un rôle répresseur de la voie WNT en inhibant l'interaction entre la β -CATENINE et TCF4 (Guo et al., 2010). Cependant, *in vivo* chez la souris, le KO de *Cdx2* dans l'épithélium intestinal affecte la prolifération de manière contrastée. En effet, une étude ne montre aucun effet sur la prolifération des cellules progénitrices (San Roman et al., 2015a), alors que Gao et ses collaborateurs ont montré une augmentation du nombre de ces cellules (Gao et al., 2009). Ces résultats contrastés concernant l'effet de CDX2 sur la prolifération, *in vivo* chez la souris, peuvent être expliqués par les différences de fenêtre d'induction du KO. La première étude a réalisé la délétion de *Cdx2* dans l'épithélium adulte (San Roman et al., 2015a) alors que la deuxième l'a induite dans l'endoderme embryonnaire à E8.5 (Gao et al., 2009). Le rôle de CDX2 sur la prolifération *in vivo* chez la souris pourrait donc dépendre du stade de développement.

Le facteur de transcription CDX2 est également impliqué dans le contrôle de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. De nombreuses études ont montré que CDX2 est essentiel à la différenciation de ces cellules, ce qui est plutôt cohérent avec son rôle antiprolifératif. Par exemple, la surexpression de *Cdx2* dans l'épithélium gastrique de souris entraîne un grand changement de l'identité de ces cellules. Les cellules pariétales de

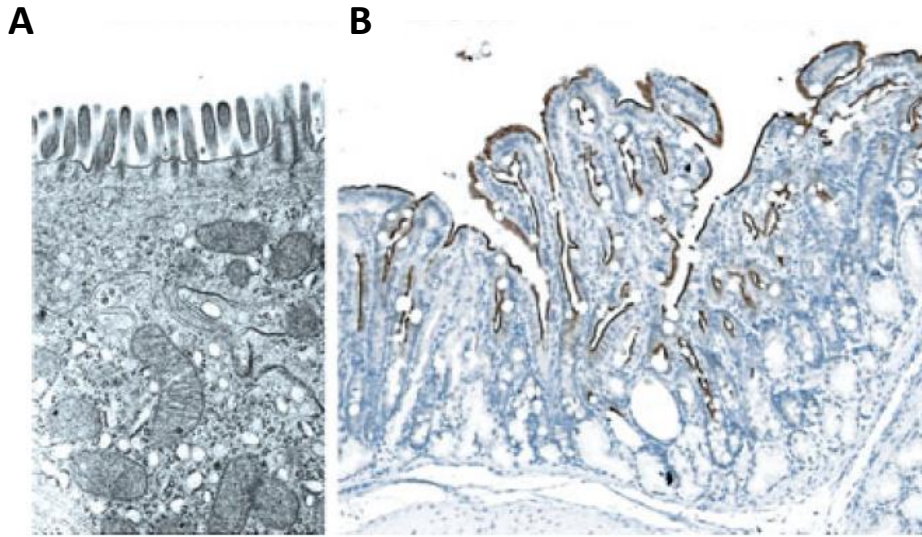


Figure 13 : Cdx2 entraîne l'apparition de caractères intestinaux dans l'épithélium gastrique

A : Microscopie électronique révélant la présence de microvillosités à la surface apicale des cellules gastriques exprimant Cdx2. **B** : Immunohistochimie de SI (sucrase isomaltase) à la surface de l'épithélium gastrique exprimant Cdx2. D'après Mutoh et al., 2005.

l'estomac sont perdues, ce qui entraîne la neutralisation du pH gastrique, et sont remplacées par des cellules à l'identité intestinale qui présentent des microvillosités et une expression de marqueurs fonctionnels comme des enzymes digestives intestinales (Sucrase isomaltase *Si*, et Lactase phlorizine hydrolase *Lph*) (Figure 13). Ce changement d'identité entraîne notamment l'augmentation de la capacité de digestion et d'absorption des sucres par l'estomac de ces souris, caractéristique de l'intestin grêle. D'ailleurs, ces souris survivent pendant un mois après l'ablation de l'intestin grêle alors que des souris sauvages meurent en quelques jours. Enfin, les cellules sécrétoires sont aussi fortement modifiées, avec l'expression de la Mucine 2 (plutôt intestinale) à la place des mucines normalement gastriques : Muc5AC et Muc6 (Mutoh et al., 2002, 2005).

A l'inverse, le KO de *Cdx2* entraîne l'apparition d'entérocytes immatures au niveau de l'intestin grêle, qui comportent peu de microvillosités ainsi qu'une expression diminuée des marqueurs de différenciation entérocytaire, notamment *Lph* et *Alpi* (Alcaline phosphatase intestinale). L'expression des marqueurs de cellules à mucus (*Muc2*...) est également diminuée, et les cellules entéroendocrines sont perdues. Les cellules de Paneth ne semblent, en revanche, pas affectées, ce qui est cohérent avec la faible expression de *Cdx2* dans ces cellules. Par RNAseq et ChIPseq, les auteurs ont montré que le KO de *Cdx2* entraîne l'augmentation et la diminution de l'expression de gènes, cependant *Cdx2* se fixe principalement aux niveaux des régions régulatrices des gènes qui sont sous-exprimés dans le KO, montrant l'effet activateur direct de CDX2 sur la transcription, l'effet négatif étant probablement indirect. Enfin, ces études ont montré que CDX1 est capable de partiellement sauver le phénotype dû à la perte de CDX2, puisque les effets sont renforcés dans le double KO, et que le simple KO *Cdx1* n'a pas d'impact sur l'épithélium intestinal (Verzi et al., 2011). Ces résultats *in vivo* abondent dans le sens des premiers travaux effectués *in cellulo* (dans des lignées humaines) et *in vitro* qui montraient le rôle activateur de CDX2 sur l'expression de *SI* (Boudreau et al., 2002), *LPH* (Mitchelmore et al., 2000) ou encore *MUC2* (Yamamoto et al., 2003). Tous ces résultats montrent le rôle essentiel de CDX2 dans la mise en place et le maintien de l'identité des cellules épithéliales intestinales différenciées.

L'analyse des cibles de *Cdx2* à grande échelle, ainsi que son patron de liaison au niveau des régions régulatrices de ses cibles, durant le développement de l'intestin ainsi que durant la différenciation de l'épithélium, a été réalisé pour mieux comprendre son rôle dans

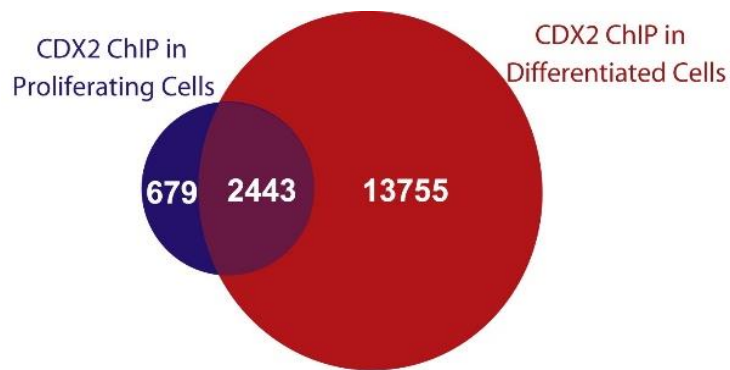
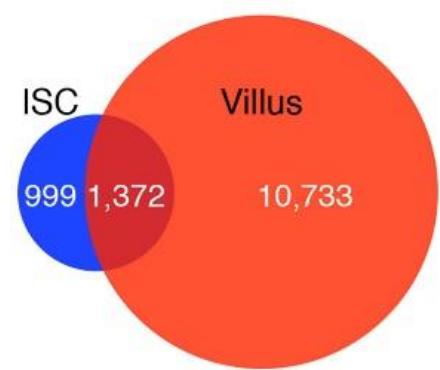
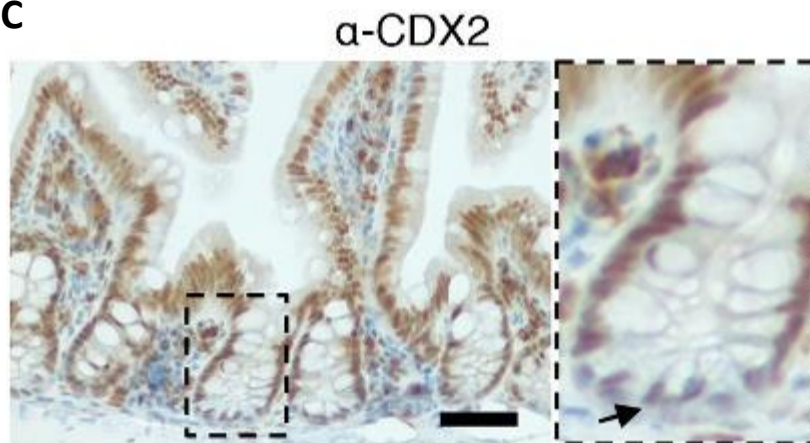
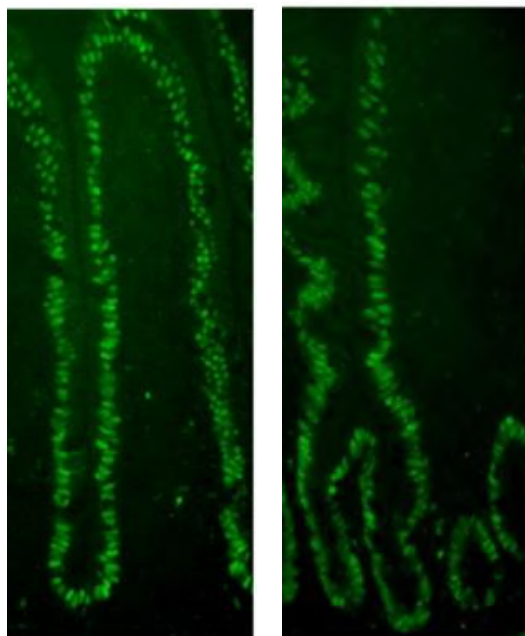
A**B****C****D**

Figure 14 : Dynamique de Cdx2 au sein de l'épithélium intestinal

A : Diagramme de Venn représentant les sites de liaison de CDX2 par ChIP-seq dans des cellules Caco-2 prolifératives et différenciées. D'après Verzi et al., 2010. **B** : Diagramme de Venn représentant les sites de liaison de CDX2 par ChIP-seq dans les ISC et les cellules de la villosités murines. D'après San Roman et al., 2015. Immunohistochimie (**C**) et immunohistofluorescence (**D**) de CDX2 dans l'iléon de souris sauvage, montrant la présence de CDX2 dans toutes les cellules de l'épithélium intestinal. D'après San Roman et al., 2015 ; Benoit et al., 2010.

l'acquisition de l'identité cellulaire. Ces analyses montrent d'énormes changements au cours de ces processus (San Roman et al., 2015a; Verzi et al., 2010, 2011). Durant le développement, le set de gènes régulés par CDX2 change fortement : en effet, l'expression de plus de 5000 gènes est dérégulée, seulement dans l'embryon ou seulement dans l'adulte des souris KO pour *Cdx2*, alors que l'expression de moins de 400 gènes est dérégulée dans les 2 (Verzi et al., 2011). Cela suggère un grand changement de patron de liaison de CDX2 au cours du développement de l'épithélium intestinal pour permettre aux cellules d'acquérir une nouvelle identité. Lors de la différenciation entérocytaire dans le modèle cellulaire humain Caco-2/15 (ces cellules expriment des marqueurs de l'identité entérocytaire lorsqu'elles arrivent à confluence), les auteurs ont également montré un grand changement du patron de liaison de CDX2 entre les cellules prolifératives et les cellules différenciées, avec 679 et 13755 sites spécifiques respectivement, pour seulement 2443 sites en commun (Verzi et al., 2011) (Figure 14A). *In vivo* chez la souris, une différence similaire est retrouvée entre le patron de liaison de CDX2 dans les ISC (999 sites spécifiques) et dans les cellules différenciées de la villosité (10733 sites spécifiques), pour seulement un faible nombre (1372) de sites en commun (San Roman et al., 2015a) (Figure 14B). Dans ces 2 cas, la liaison de CDX2 aux régions régulatrices des gènes est fortement corrélée avec l'expression de ces gènes. Or, *Cdx2* est exprimé de manière assez équivalente entre tous ces types cellulaires (i.e. intestin embryonnaire versus cellules progénitrices et différenciées adultes) (Benoit et al., 2010; Escaffit et al., 2005; Gao et al., 2009; San Roman et al., 2015a; Verzi et al., 2011), la seule différence notable étant une légère diminution dans les ISC (Benoit et al., 2010; San Roman et al., 2015a) (Figure 14C et D). Ce patron d'expression similaire de CDX2 ne peut donc pas expliquer ce grand changement de patron de liaison dans les différents types cellulaires. De plus, la présence du motif de liaison de CDX2 au niveau de toutes ces régions ne permet pas non plus d'expliquer cette différence (San Roman et al., 2015a; Verzi et al., 2011). L'hypothèse que ce changement puisse être gouverné par d'autres cofacteurs de transcription et/ou par un paysage chromatinien différent entre les types cellulaires a donc été avancée (Verzi et al., 2010).

Le lien entre CDX2 et d'autres facteurs de transcription a ainsi été étudié. Par exemple, une étude basée sur l'enrichissement des motifs de liaison des facteurs de transcription, a montré que CDX2 co-occupe des régions régulatrices dans les ISC avec les facteurs de

transcription de la famille GATA (GATA 4 et 6), alors qu'il co-occupe des régions régulatrices dans les cellules différenciées préférentiellement avec HNF1 α et 4 α (San Roman et al., 2015b). Les auteurs ont également montré que le KO de *Hnf4 α* , *in vivo*, a seul peu d'effet sur l'homéostasie de l'épithélium intestinal et l'expression des gènes spécifiques des cellules intestinales différenciées, mais accroît la diminution de l'expression des cibles de CDX2 dans le double KO (*Hnf4 α* et *Cdx2*), notamment pour les gènes de différenciation terminale entérocytaire (San Roman et al., 2015b; Verzi et al., 2013). Ces résultats sont en accord avec les précédentes études, *in cellulo* chez l'homme et *in vitro*, qui ont montré la coopération entre CDX2 et HNF1 α dans la régulation des marqueurs de différenciation entérocytaire (Benoit et al., 2010; Boudreau et al., 2002; Mitchelmore et al., 2000).

Ces différences de partenaires pourraient expliquer, au moins en partie, les différences d'impact sur les gènes cibles et de liaison de CDX2 entre cellules prolifératives et différenciées. Cependant, les auteurs ont montré que le KO de *Hnf4 α* , *in vivo*, n'a aucun effet sur le patron de liaison de CDX2 sur les régions régulatrices de ses cibles, contrairement au KO de *Cdx2* qui, lui, entraîne la forte diminution de la liaison de HNF4 α au niveau des sites qu'ils co-occupent (Verzi et al., 2013). Ils ont alors fait l'hypothèse que CDX2 est un facteur de transcription de type « master gene » qui se fixe à ses cibles et permet le recrutement d'autres facteurs et co-facteurs de transcription pour permettre l'expression des gènes et donc la mise en place de l'identité cellulaire intestinales. Cette hypothèse est corroborée par l'apparition d'une identité intestinale dans les cellules de l'estomac surexprimant *Cdx2* (Mutoh et al., 2002, 2005).

Ces résultats n'expliquant peu ou pas le changement drastique de patron de liaison de CDX2 entre les différents types cellulaires de l'intestin, l'analyse de la dynamique chromatinienne et de son effet sur le recrutement de CDX2 à ses cibles semble donc être primordiale dans la meilleure compréhension de la mise en place et du maintien de l'identité cellulaire au sein de l'épithélium intestinal.

D'autres facteurs de transcription sont également importants pour l'acquisition de l'identité des différents types cellulaires différenciés de l'épithélium intestinal. En aval du facteur de transcription MATH1, les différents types cellulaires du lignage sécrétoire nécessitent l'activité de facteurs de transcription spécifiques pour acquérir leurs identités. Le facteur de transcription SPDEF, par exemple, est essentiel à la différenciation des cellules à mucus et

des cellules de Paneth (Gregorieff et al., 2009) (voir Figure 5). Le KO de ce facteur de transcription entraîne la forte diminution de ces 2 types de cellules différenciées ainsi que la perte de leur maturité, sans affecter l'expression des marqueurs précoces de ces cellules (i.e. Tff3 et Gob5 respectivement) (Gregorieff et al., 2009). Le facteur répresseur de la transcription GFI1 favorise également la différenciation de ces 2 types cellulaires et inhibe la différenciation des cellules entéroendocrines (Shroyer et al., 2005). La différenciation des cellules de Paneth nécessite également l'activité du facteur de transcription SOX9 ; en effet, ces cellules sont totalement perdues, et remplacées par des cellules prolifératives, dans les souris KO pour ce facteur (Bastide et al., 2007) (cf Figure 5). Les cellules entéroendocrines sont, quant à elles, très dépendantes du facteur de transcription NEUROG3. La surexpression de *Neurog3* est suffisante pour augmenter le nombre de cellules entéroendocrines (marquage Chromogranine A) qui remplace numériquement les cellules à mucus (López-Díaz et al., 2007). Enfin, le facteur de transcription POU2F3 est primordial pour la différenciation en cellules « tufts » puisque son KO entraîne la perte totale de ces cellules, sans affecter les autres types cellulaires de l'épithélium intestinal (Gerbe et al., 2016) (voir Figure 5).

Toutes ces études montrent l'importance des facteurs de transcription et de leur dynamique dans le contrôle de l'identité cellulaire de l'épithélium intestinal. Cependant, la régulation de leurs fonctions est encore peu connue et reste un champ d'investigation important à la compréhension de l'homéostasie épithéliale intestinale. Là encore, comme suggéré pour CDX2, la chromatine pourrait jouer un rôle important dans la régulation fonctionnelle de ces facteurs de transcription et donc dans le contrôle de l'identité des cellules de l'épithélium intestinal.

6) Plasticité du tissu

Malgré l'aspect apparemment définitif de l'engagement dans un lignage et de la différenciation qui s'en suit, de nombreuses études ont montré récemment que les cellules de l'épithélium intestinal conservent une grande plasticité. Ce terme de plasticité définit ici les cellules progénitrices ou différenciées qui sont capables de se dédifférencier en cas de perte des CBC *Lgr5*⁺ pour donner naissance à de nouvelles cellules souches, qui peuvent alors renouveler l'épithélium en entier. La première description de ce phénomène a été faite en 2012 par le laboratoire de Hans Clevers (van Es et al., 2012b). Les auteurs ont montré

	Cre induction	Radiation	LacZ analysis
Group 1	Day -1	No	Day 28
Group 2	Day -14	Day 0	Day 28
Group 3	Day -1	Day 0	Day 28

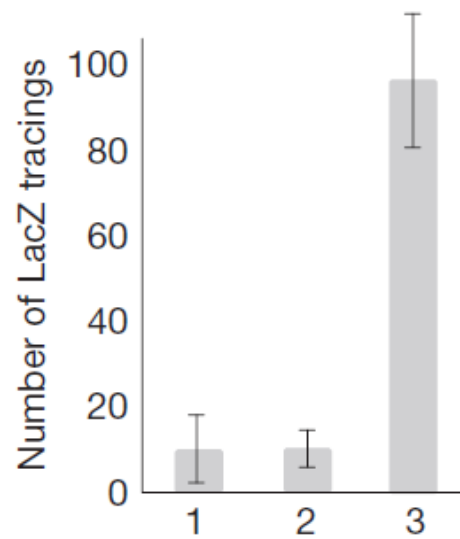


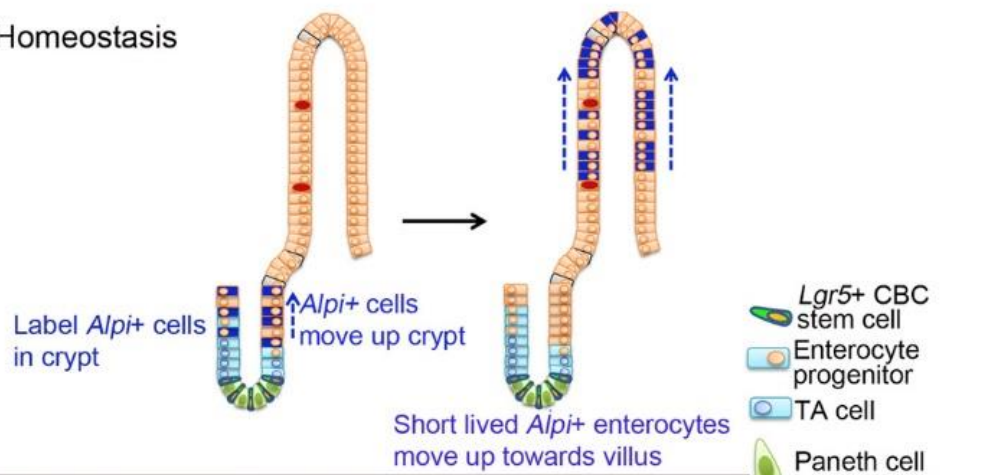
Figure 15 : Les cellules Dll1⁺ peuvent se dédifférencier mais ne sont pas des cellules souches quiescentes

Nombre de clones LacZ⁺ après induction de la CRE dans les cellules Dll1⁺ et perte des ISC (dû à l'irradiation). Le groupe 1 représente le contrôle négatif car il n'y a pas d'irradiation. L'absence de clones LacZ⁺ dans le groupe 2 avec l'induction de la CRE 14 jours avant l'irradiation couplée à la présence de clones LacZ⁺ dans le groupe 3 avec l'induction de la CRE 1 jours avant l'irradiation montre, en plus de la dédifférenciation de ces cellules, que les cellules Dll1⁺ ne sont pas des cellules souches quiescentes à longue durée de vie. D'après van Es et al., 2012.

qu'une population de cellules progénitrices du lignage sécrétoire, localisée au-dessus du compartiment des CBC et exprimant le marqueur moléculaire *Dll1*, est capable de se différencier. Pour démontrer cela, les auteurs ont utilisé la technique de suivi du lignage (comme décrite en Figure 6) des cellules *Dll1*⁺. En conditions d'homéostasie, 4 jours après l'induction de la CRE sous la dépendance du promoteur *Dll1* et d'expression de *LacZ*, quelques cellules sont positives dans les cryptes et les villosités, marquant des cellules de Paneth, des cellules à mucus, entéroendocrines et de « tufts ». Ceci montre le caractère progéniteur du lignage sécrétoire des cellules *Dll1*⁺. De plus, 10 jours après l'induction, seules des cellules de Paneth sont encore positives, confirmant une durée de vie courte des autres types de cellules *Dll1*⁺. Pour tester la plasticité les souris ont été irradiées à 6Gy, ce qui cause la perte des CBC *Lgr5*⁺. Les auteurs ont montré que, 28 jours après l'irradiation et l'induction de la CRE, des clones de cellules positives font leur apparition tout le long de la crypte et de la villosité (Figure 15, groupe 3). Tous les types cellulaires sont représentés dans ces cellules positives, et le marqueur *Lgr5* spécifique des CBC est réexprimé. Ces résultats montrent la différenciation des cellules *Dll1*⁺ en cellules souches CBC après perte des cellules *Lgr5*⁺ pour permettre le renouvellement normal de l'épithélium. De plus, les auteurs ont également montré que, lorsqu'ils ont induit la CRE 14 jours avant l'irradiation, 28 jours après l'irradiation aucune cellule n'est positive à *LacZ* (Figure 15, groupe 2). Ceci confirme que les cellules *Dll1*⁺ sont des progéniteurs avec une courte durée de vie et pas des cellules souches quiescentes (van Es et al., 2012b). Une autre étude a directement analysé une population de cellules dites quiescentes, grâce à leur capacité à retenir un marquage à long terme (ici H2B-YFP) comme décrit par Potten et ses collaborateurs (Potten et al., 1978). Dans cette étude, ces cellules sont localisées dans la crypte, avec une préférence pour la position 3, et sont nommées LRC (Label-retaining cells) (Buczacki et al., 2013). L'étude transcriptomique de ces cellules montrent qu'elles expriment à la fois des marqueurs de cellules souches, de cellules du lignage sécrétoire ainsi que les marqueurs des cellules « +4 ». En conditions d'homéostasie, les auteurs ont montré que ces cellules donnent naissance principalement aux cellules de Paneth et aussi aux cellules entéroendocrines. Enfin, par suivi du lignage ils ont montré que ces cellules sont capables de renouveler l'épithélium en entier, mais seulement en réponse aux dommages causant la perte des CBC *Lgr5*⁺. Les auteurs ont donc fait l'hypothèse que ces cellules décrites comme des cellules souches quiescentes par Potten et ses collaborateurs (Potten et al., 1978) pourraient être en fait des précurseurs du

Alpi-CreER-R26R;Lgr5-DTR model

Homeostasis



Regeneration

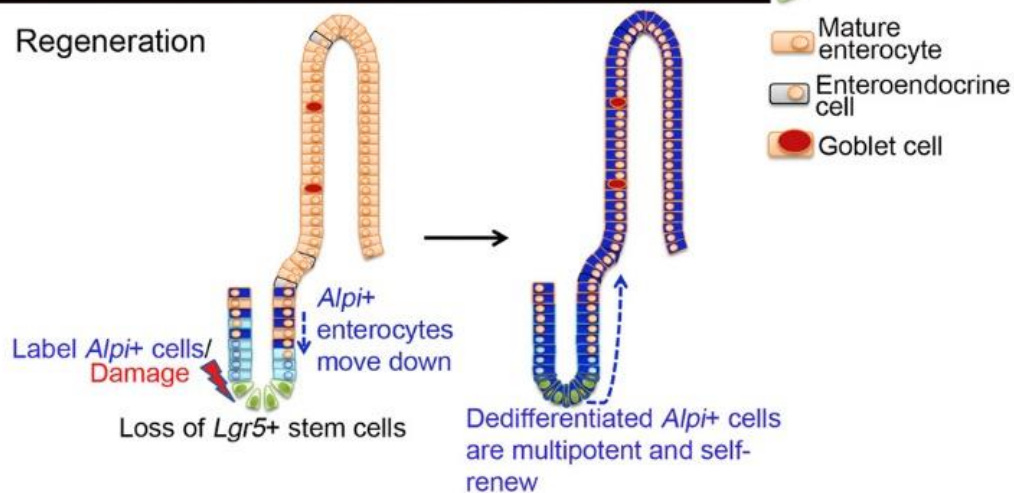


Figure 16 : Les cellules *Alpi*⁺ peuvent se dédifférencier pour régénérer l'épithélium intestinal

En homéostasie normale, les cellules progénitrices *Alpi*⁺ ont une durée de vie courte et donnent naissance aux entérocytes matures en migrant vers le haut de la villosité. Lors de la perte des ISC *Lgr5*⁺, les cellules *Alpi*⁺ sont capables de migrer vers le bas et de se dédifférencier pour permettre la régénération de l'épithélium. D'après Tetteh et al., 2016.

lignage sécrétoire avec une durée de vie assez longue, et capables de se différencier en cas de perte des CBC *Lgr5*⁺ (Buczacki et al., 2013). Cette hypothèse est en accord avec Bjerknes et ses collaborateurs qui avaient montré l'existence de cellules progénitrices du lignage sécrétoire à longue durée de vie (Bjerknes and Cheng, 1999). Cette étude a l'avantage de n'être pas basée sur des marqueurs moléculaires, qui ne sont pas toujours spécifiques, mais sur la capacité de la cellule à retenir un marquage, ce qui caractérise les cellules souches quiescentes selon Potten. Une autre étude a montré que les cellules *Bmi1*⁺, qui ont été caractérisées comme des cellules souches quiescentes en position +4 (Sangiorgi and Capecchi, 2008), seraient en fait une population de cellules entéroendocrines différenciées (Yan et al., 2017). Cette population contient plusieurs sous-populations, en accord avec l'hétérogénéité des cellules entéroendocrines, et est capable de renouveler l'épithélium après irradiation et perte des CBC *Lgr5*⁺ (Yan et al., 2017). Enfin, il a également été montré que les cellules progénitrices du lignage entérocytaire, *Alpi*⁺, sont capables de régénérer l'ensemble des cellules épithéliales intestinales à long terme après perte des cellules *Lgr5*⁺ alors qu'elles ont une courte durée de vie et une descendance exclusivement entérocytaire dans l'homéostasie normale (Tetteh et al., 2016) (Figure 16).

Toutes ces études suggèrent que les cellules +4, qui permettent, comme d'autres cellules progénitrices, le maintien de l'épithélium suite à la perte des CBC *Lgr5*⁺, seraient en fait des cellules différenciées ou en cours de différenciation, qui sont capables de se différencier en cas de problème. Cette hypothèse est cohérente avec la grande hétérogénéité des cellules présentes au niveau de cette position en terme moléculaire (*Bmi1*⁺, *Hopx*⁺, *Prox1*⁺...) ou en termes de sensibilité à l'irradiation. Cette hypothèse suggère que les cellules présentes au-dessus de la zone des CBC se retrouvent en positions inférieures lors de la perte des CBC et donc au contact de la niche des cellules souches qui leur impose alors une identité souche. Ce mécanisme mis en place par l'organisme pour maintenir l'intégrité du tissu quoi qu'il arrive, assure la robustesse fonctionnelle du tissu. Toutefois, il a pour inconvénient de permettre à n'importe quelle cellule de l'épithélium de se différencier, de proliférer et, donc potentiellement, d'entraîner l'initiation de la tumorigénèse en réponse à des signaux environnementaux. Par exemple, une étude a montré que la surexpression de la *β-Caténine* stabilisée, en association avec l'activation des oncogènes NF-κB ou KRAS, dans les cellules *Lgr5*⁻ (grâce à l'expression de la CRE sous la dépendance du promoteur Xbp1) de

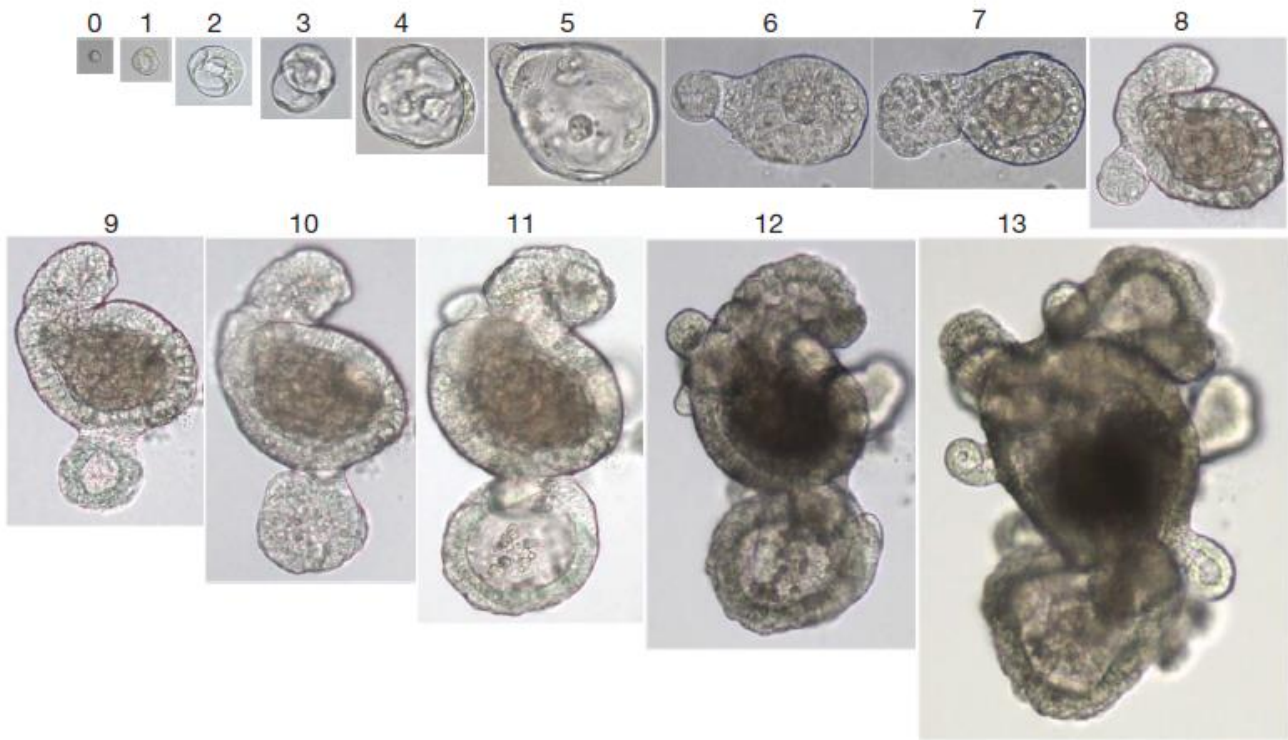
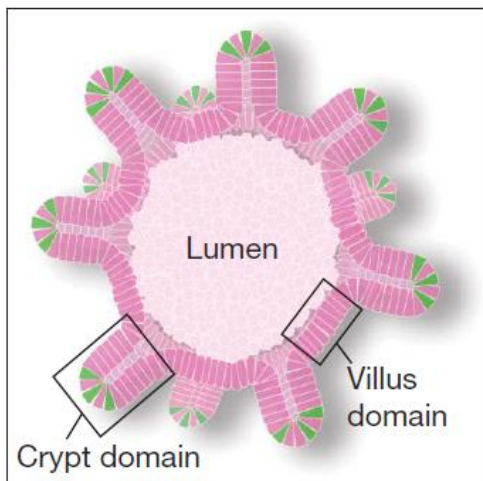
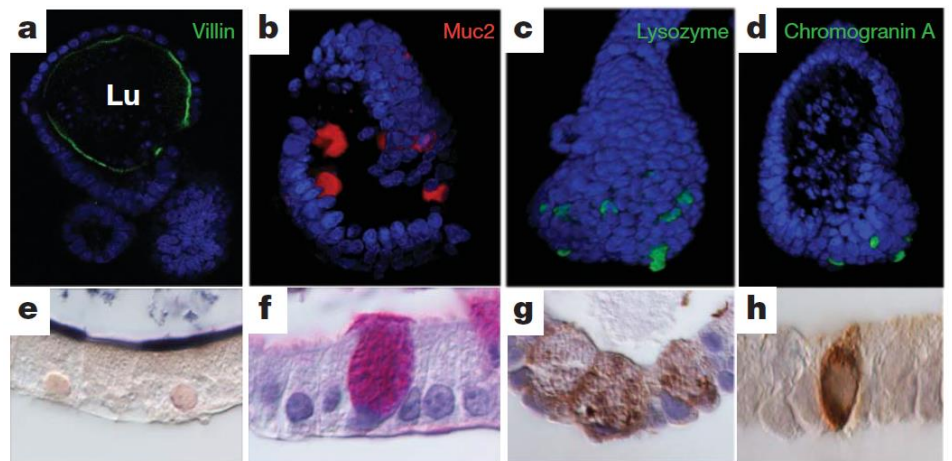
A**B****C**

Figure 17 : Le modèle organoïde

A : Croissance d'un organoïde cultivé à partir d'une cellule souche isolée durant 13 jours. **B** : représentation schématique d'un organoïde avec la lumière au centre de l'épithélium. Les bourgeonnements contiennent les cellules souches et sont assimilés à la crypte. Entre ces bourgeonnements les cellules différenciées sont présentes et récapitulent l'organisation des villosités. **C** : Images confocales (a, b, c et d) et coupes paraffines (e, f, g et h) montrant la présence dans les organoïdes d'entérocytes (a : villine, e : alcaline phosphatase), de cellules à mucus (b : Muc2, f : acide périodique de Schiff), de cellules de Paneth (c et g : Lysozyme) et de cellules entéroendocrine (d : Chromogranine A, h : Synaptophysine). D'après Sato et al., 2009.

l'épithélium intestinal entraîne la tumorigénèse intestinale. Les polypes formés sont très prolifératifs mais surtout ils expriment un grand nombre de gènes marqueurs des ISC (*Lgr5*, *Ascl2*...), ce qui montre que la surexpression de ces oncogènes dans les cellules différenciées de l'épithélium intestinal a engendré la dédifférenciation de ces cellules et donc la tumorigénèse (Schwitalla et al., 2013). De plus, dans un modèle permettant l'ablation des cellules *Lgr5*⁺ par ajout de toxine diphtérique, après la formation des tumeurs, la déplétion de ces cellules entraîne l'arrêt de la croissance des tumeurs jusqu'à l'arrêt du traitement qui engendre alors la reprise de la croissance (de Sousa e Melo et al., 2017). Ceci suggère que des cellules de la tumeur, après la fin du traitement, se sont dédifférenciées pour relancer la prolifération et donc la croissance tumorale. Ceci pourrait expliquer la résistance de certaines tumeurs vis-à-vis des traitements ciblant les cellules souches cancéreuses.

Là aussi, la plasticité de l'épithélium intestinal étant fortement liée aux mécanismes de mise en place de l'identité cellulaire, la chromatine pourrait avoir un rôle majeur dans ce processus et donc dans le maintien à long terme de l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

7) Modèle d'homéostasie : les organoïdes

Le manque de modèle *ex vivo* de cellules épithéliales recréant la complexité de l'axe crypte-villosité a pendant longtemps compliqué les investigations sur l'homéostasie de l'épithélium intestinal. Le laboratoire de Hans Clevers a décrit un modèle, nommé « organoïde », pour la première fois en 2009 (Sato et al., 2009). Pour cela, les auteurs ont isolé des cryptes intestinales, dissocié les cellules puis mis celles-ci en culture dans du Matrigel pour fournir un support extracellulaire proche de celui existant *in vivo* avec des laminines et du collagène. Lors de la mise en culture, les cryptes se referment sur elles-mêmes et forment une sphère avec une lumière au centre (Figure 17A). La croissance de ces organoïdes nécessite des facteurs permettant de stimuler la voie Wnt (WNT3a et R-SPONDIN pour amplifier la signalisation Wnt), de l'EGF important pour la prolifération et de la NOGGIN pour inhiber la signalisation Bmp. Grâce à ces facteurs, les organoïdes croissent et forment au bout de quelques jours des bourgeonnements contenant des cellules souches ainsi que des cellules de Paneth, donc similaires à des cryptes. Les cellules différenciées se trouvent hors des cryptes dans des domaines récapitulant l'organisation des villosités (Figure 17A, B et C). Ces organoïdes peuvent être dissociés et les cryptes réensemencées pour donner naissance à de

nouveaux organoïdes, qui peuvent être ainsi cultivés pendant une durée supérieure à 8 mois (Sato et al., 2009). Ce système est donc le premier à permettre la culture à long terme de cellules épithéliales intestinales qui s'auto-organisent pour recréer les équilibres de l'homéostasie intestinale et en mimer la physiologie de l'axe crypte-villosité. Cette technique montre que les cellules de l'organoïde sont capables de recréer l'asymétrie entre la crypte et la villosité sans l'aide des cellules mésenchymateuses. Par exemple, l'agoniste de WNT (R-Spondin) est présent dans tout le milieu de culture, mais pourtant seules les cellules de la crypte des organoïdes ont une signalisation Wnt active (Sato et al., 2009). Enfin, les auteurs ont également montré la possibilité de créer des organoïdes à partir de cellules souches *Lgr5*⁺ isolées. Cependant cette culture nécessite l'ajout supplémentaire, par rapport à la culture à partir de cryptes entières, d'agoniste de la voie Notch pour pouvoir former des organoïdes (Sato et al., 2009). Ceci semble confirmer le caractère indispensable des cellules de Paneth pour activer la voie Notch dans les ISC et permettre le maintien de ces dernières.

Ce modèle facilite donc l'analyse de l'homéostasie de l'épithélium intestinal par une approche *ex vivo*. Il permet notamment d'aborder le rôle de différents facteurs dans le maintien du caractère souche ou l'induction des lignages, par exemple par des approches de pertes de fonctions (siRNA, CRISPR-Cas9, ...) ou en comparant différents génotypes. Par exemple, la mise en culture des villosités de souris sauvages n'entraîne pas la formation d'organoïdes, prouvant le caractère différencié et non prolifératif des cellules des villosités. Cependant, la mise en culture des villosités provenant des souris ayant la voie Wnt et l'oncogène KRAS activés dans tout l'épithélium entraîne la formation et la croissance d'organoïdes, prouvant ainsi que, dans ces souris, certaines cellules des villosités ont des caractéristiques souches (Schwitalla et al., 2013). Aussi, l'ajout d'un agoniste de la voie Bmp (BMP4) dans le milieu de culture des organoïdes entraîne la perte de la formation de ces structures (Qi et al., 2017). Ce modèle est donc puissant pour analyser le caractère souche des cellules.

Ce modèle permet également l'analyse de la perméabilité de l'épithélium par injection de molécules fluorescentes à l'intérieur des organoïdes, puis analyse du maintien de la fluorescence à l'intérieur de l'organoïde au cours du temps. Par exemple, dans une étude, il a été montré que l'ajout de la toxine de Clostridium, dans le milieu de culture, entraîne la perte de la fluorescence en 20h, contrairement aux organoïdes contrôles non traités dans

lesquels cette fluorescence est encore présente (Hill et al., 2017). Cette technique permet donc d'analyser la perméabilité de l'épithélium intestinal en réponse à des molécules en temps réel. La micro-injection permet également d'analyser la relation hôte-pathogène. Par exemple, la micro-injection de *Salmonella enterica* dans la lumière d'organoïdes a permis de montrer le rôle protecteur de l'Interleukine-22 contre l'invasion intracellulaire de cette bactérie (Forbester et al., 2018). Tous ces exemples montrent la multitude de possibilités d'utilisation des organoïdes comme modèle d'étude des caractères physiologiques du tissu.

L'un des atouts de ces organoïdes est également l'une de leurs principales limitations : ils sont uniquement constitués de cellules épithéliales, ce qui permet de découpler leurs propriétés et physiologie de celles du mésenchyme (Sato et al., 2009). Or les cellules entourant l'épithélium intestinal *in vivo* ont également un rôle prépondérant dans le contrôle de sa physiologie et son homéostasie. Pour remédier à ceci de plus en plus d'études utilisent les organoïdes en coculture avec un autre type cellulaire (revue Holloway et al., 2019). Par exemple, une étude a montré la possibilité de cultiver les organoïdes intestinaux avec des lymphocytes intraépithéliaux (IEL). La coculture de ces IEL avec les cellules épithéliales donne naissance à des organoïdes qui présentent ces lymphocytes au sein de l'épithélium (Nozaki et al., 2016). Cette co-culture pourrait, notamment, permettre l'analyse plus complète de la réponse immunitaire intestinale *ex vivo*. La coculture de cryptes provenant du colon sur un tapis cellulaire de myofibroblastes sous-épithéliaux a montré une plus forte capacité à former des colonoïdes que la culture sans ces cellules (Hirokawa et al., 2014). L'étude de la coculture de différents types cellulaires avec les cellules épithéliales n'est qu'au début de son investigation mais semble très prometteuse dans la meilleure compréhension de la physiologie de l'épithélium intestinal.

Enfin, en plus de leur importance dans la compréhension de la physiologie intestinale, les organoïdes ont aussi un gros potentiel thérapeutique. Il a été montré que des colonoïdes peuvent être greffés dans des colons *in vivo*. Pour cela, les auteurs ont cultivé des organoïdes exprimant la GFP pour pouvoir facilement les suivre, puis ils les ont implantés dans des colons endommagés par une colite induite par le DSS (Dextran Sodium Sulfate) de souris immunodéprimées (KO pour *Rag2*). Quelques jours après la greffe, les auteurs ont observé que des cellules GFP⁺ ont recolonisé le colon et restauré son intégrité. Cette greffe permet une meilleure reprise du poids des souris après arrêt du traitement DSS (Yui et al.,

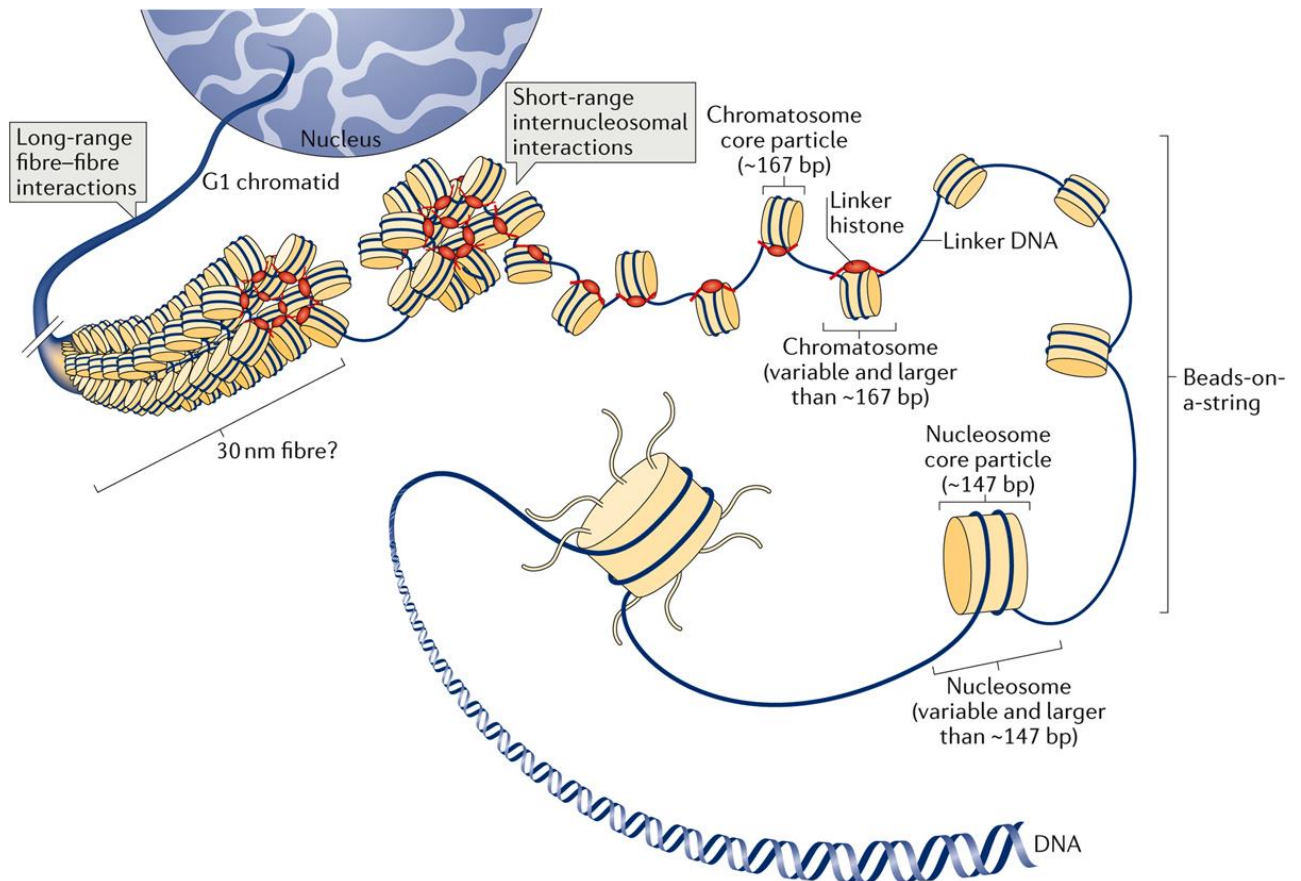
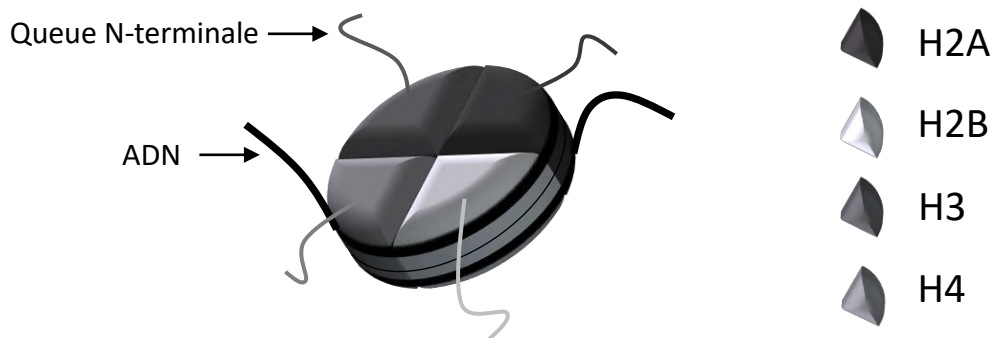
A**B**

Figure 18 : Structure de la chromatine

A : Schéma illustrant les différents niveaux de compaction de la chromatine. La plus petite unité est formée par l'enroulement d'environ 147 paires de bases d'ADN autour d'un octamère d'histone, et est appelée nucléosome. La fixation de l'histone de liaison H1 (« linker histone ») au nucléosome aboutit à la formation de l'unité de la chromatine appelée chromatosome. L'interaction entre les nucléosomes peut aboutir à la formation d'une fibre plus compacte : la fibre de 30nm, même si son existence *in vivo* fait l'objet d'intense débat. D'après Fyodorov et al., 2018. **B** : Schéma illustrant un nucléosome avec l'enroulement de l'ADN autour du tétramère H3/H4 et des 2 dimères H2A/H2B. A noter : les queues N-ter des histones (qui sont le lieu de nombreuses modifications post-traductionnelles) sont à l'extérieur du coeur du nucléosome.

2012). Les organoïdes ont donc un fort intérêt thérapeutique pour la greffe chez des patients atteints de pathologies inflammatoires chroniques induisant des dommages aux épithéliums intestinaux et du colon.

Ce modèle en recréant la physiologie de l'épithélium intestinal pourrait permettre d'analyser le rôle de la chromatine et sa dynamique dans le contrôle de l'identité des cellules épithéliales intestinales, ainsi que le possible lien avec les facteurs de transcription et les voies de signalisation clés de l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

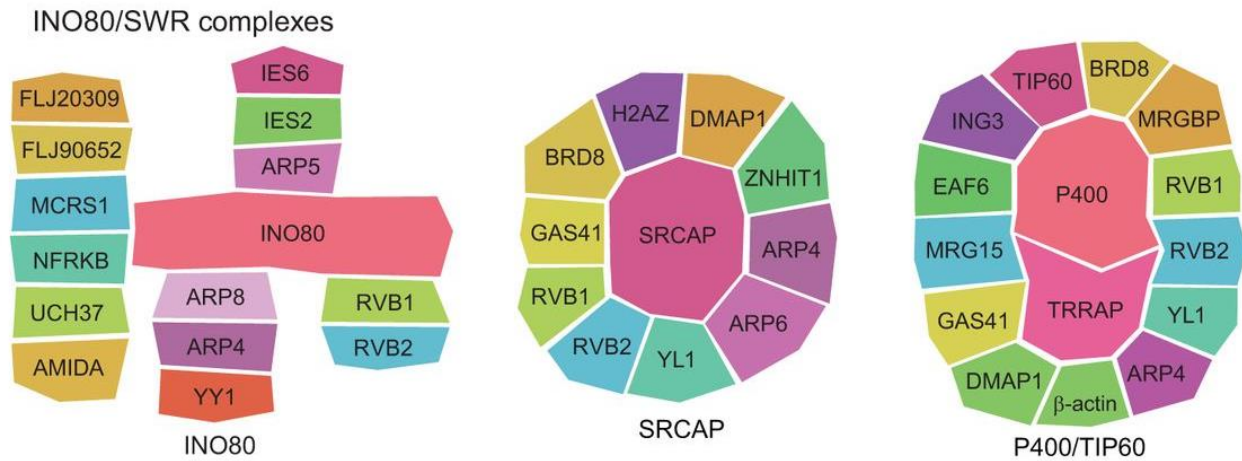
II- La Chromatine

1) Une structure dynamique et collaborative

La chromatine est l'association de l'ADN avec des protéines histones et non histones. L'enroulement de 146 paires de bases de la double hélice d'ADN autour d'un octamère d'histones (un tétramère H3/H4 et 2 dimères H2A/H2B) donne naissance au nucléosome, l'unité fonctionnelle minimale de la chromatine (Figure 18A et B). L'histone H1 participe à la stabilisation des nucléosomes, et forme, avec le nucléosome, le chromatosome (Fyodorov et al., 2018) (Figure 18A). Cette structure chromatinienne a pour rôle fondamental de compacter l'ADN au sein du noyau, mais elle est aussi essentielle dans le maintien de la stabilité génétique grâce à son rôle de protection de l'ADN contre les agressions qu'il pourrait subir. Enfin la chromatine joue un rôle primordial dans la régulation des processus biologiques se déroulant au niveau de la molécule d'ADN et nécessitant l'accès à la double hélice (transcription, réparation, réplication...).

Malgré une architecture qui semble très rigide, la chromatine est une structure très dynamique. De nombreuses modifications de la chromatine comme les remodelages ATP-dépendants, l'incorporation de variants d'histones, les modifications post-traductionnelles des histones, la méthylation de l'ADN ou encore l'expression d'ARN non codants contribuent à cette dynamique. Ces modifications peuvent avoir plusieurs conséquences sur la structure de la chromatine (modification de la compaction, rôle de plateforme de recrutement...) dans le but de réguler les processus biologiques à différentes échelles, allant de processus moléculaires, qui ont lieu au niveau de l'ADN (transcription, réparation, réplication...), à des processus plus globaux comme le choix ou le changement d'identité ou de destin cellulaire.

A



B

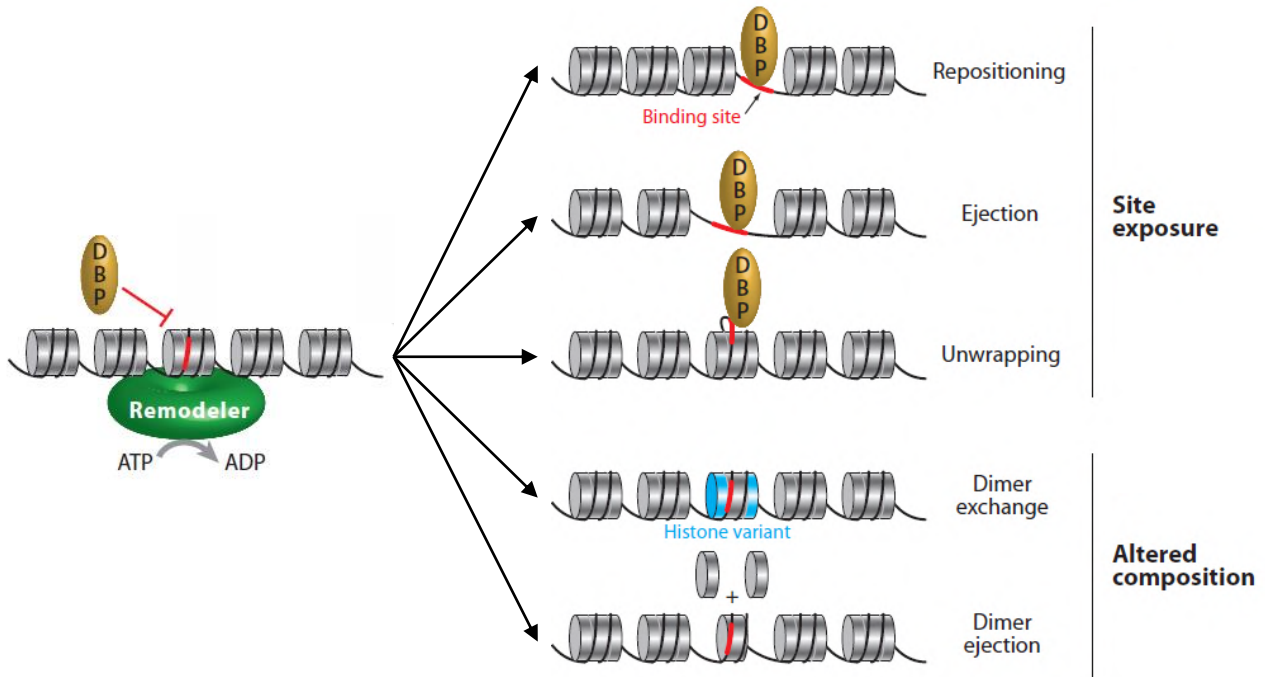


Figure 19 : Remodelage ATP-dépendant de la chromatine

A : Sous-unités composants les complexes de remodelage de la famille SWR/INO80. D'après Hota and Bruneau, 2016. **B** : Schéma représentant les modes d'action des complexes de remodelage sur la chromatine. Ces complexes peuvent avoir 2 effets sur la chromatine : le changement de l'accessibilité à une région (via le repositionnement ou l'éviction d'un nucléosome ou via le désenroulement local de l'ADN) et le changement de la composition du nucléosome (via l'échange de dimère d'histone comme l'incorporation de variant d'histone ou via le retrait d'un dimère d'histone). DBP : Protéine se liant à l'ADN. Modifié d'après Clapier and Cairns, 2009.

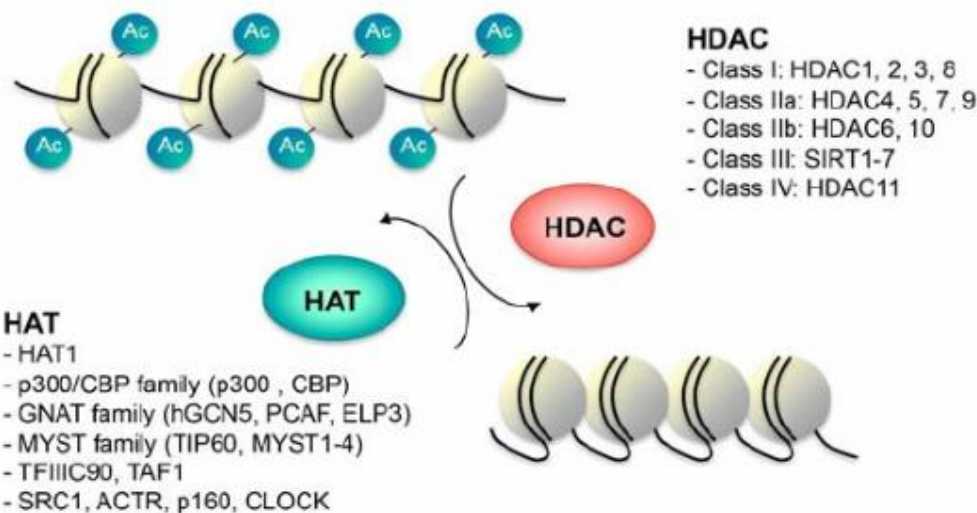


Figure 20 : Dynamique de l'acétylation des histones

La dynamique de l'acétylation de la chromatine est régulée par les 2 types d'enzymes qui la déposent (HAT) ou qui l'enlèvent (HDAC). La forte acétylation augmente l'accessibilité de l'ADN alors que l'absence de l'acétylation la diminue. D'après Schneider et al., 2013.

L'expression et la régulation des protéines qui modifient la chromatine constituent un autre niveau de régulation de cette dynamique. Des défauts dans ces mécanismes entraînent des dysfonctionnements qui peuvent aller d'une anomalie transcriptionnelle ou de réparation de l'ADN jusqu'à l'apparition de pathologies comme le cancer.

a) Remodelages ATP-dépendants de la chromatine et modifications post-traductionnelles des histones

Les complexes de remodelages ATP-dépendants de la chromatine sont tous composés d'au moins une sous-unité ATPase qui va catalyser le remodelage, ainsi que d'autres sous-unités qui peuvent avoir des rôles divers, comme activer l'ATPase ou permettre la liaison à l'ADN. Il existe 4 grandes familles de complexes de remodelage, dont la famille INO80/SWR qui comporte 3 complexes chez les mammifères : INO80, SRCAP et p400 (Figure 19A). Ces complexes de remodelage vont pouvoir déplacer ou enlever les nucléosomes, mais également incorporer des variants d'histone dans la chromatine (Figure 19B). Les variants d'histones sont, à l'inverse des histones canoniques, incorporés dans la chromatine tout au long du cycle cellulaire. Le remodelage de la chromatine a 2 effets directs principaux sur la chromatine qui sont de changer l'accessibilité à l'ADN ou de modifier la composition du nucléosome (Figure 19B).

La dynamique des modifications post-traductionnelles des histones est un autre moyen de contrôler des processus biologiques. Il existe un grand nombre de modifications de ce type, certaines sont connues et étudiées depuis longtemps (acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination...), d'autres ont été découvertes plus récemment (crotonylation, tyrosine hydroxylation, ...) (Tan et al., 2011).

L'incorporation de variants d'histones et les modifications post-traductionnelles des histones ont comme caractéristique commune de pouvoir être réversibles, ce qui augmente le degré de dynamique de ces marques. En effet, en plus des enzymes qui les déposent sur la chromatine (writers), d'autres enzymes sont capables de les enlever (erasers), comme par exemple les Histones acétyltransférases (HAT) et les Histones déacétylases (HDAC) pour l'acétylation (Figure 20).

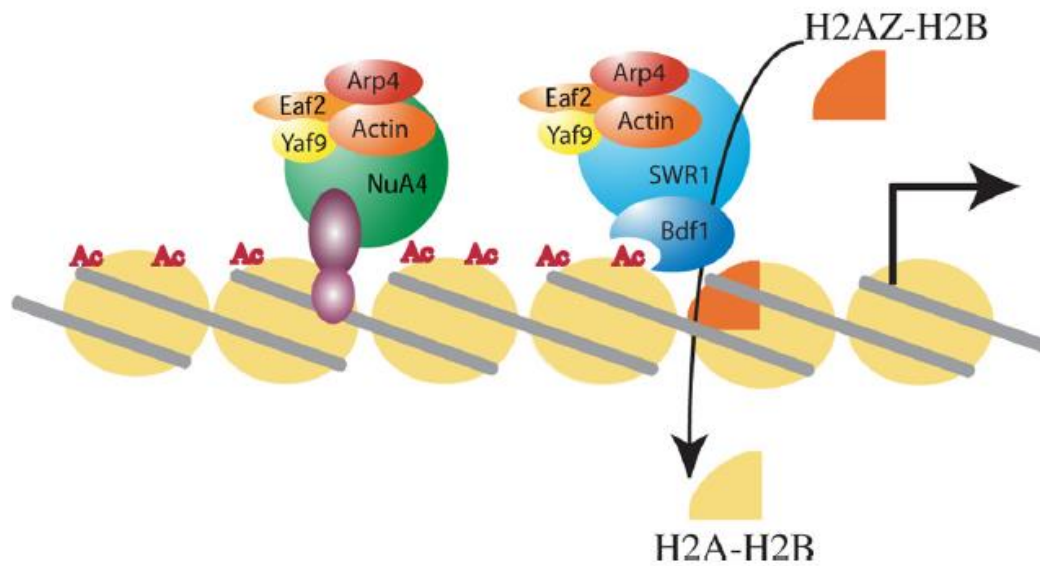


Figure 21 : Exemple de coopération entre les acteurs chromatinien

Dans ce modèle la HAT NuA4 est recrutée aux promoteurs et acétyle les histones H4 et H2A. Cette acétylation est reconnue par le bromodomaine de Bdf1, ce qui permet le recrutement du complexe de remodelage de la chromatine SWR1. Le complexe SWR1 peut alors échanger localement le dimère H2A-H2B par le dimère H2A.Z-H2B. D'après Altaf et al., 2010.

Ces modifications (post-traductionnelles et variants) de la chromatine changent l'accessibilité à des régions chromatinienne spécifiques, ou servent de plateforme de recrutement pour des protéines effectrices (readers). Par exemple, l'acétylation des histones entraîne la diminution de l'interaction de celles-ci avec l'ADN en neutralisant la charge positive des lysines, mais peut aussi servir de plateforme de recrutement pour des protéines contenant un bromodomaine. Tous ces effets sur la structure de la chromatine ont pour but de réguler les processus biologiques.

b) Interdépendance des modificateurs et/ou modifications de la chromatine

Du fait de la diversité des marques chromatinienne et des remodeleurs de la chromatine, le rôle individuel de chaque modificateur ou de chaque modification doit être considéré dans un paysage chromatinien global pour comprendre le rôle de sa dynamique dans les différents processus biologiques. Sa mise en place ou son enlèvement intervient dans un contexte chromatinien déjà établi et, de ce fait, certaines marques peuvent coopérer, s'opposer ou encore être redondantes fonctionnellement (revue Zhang et al., 2015).

Un exemple de coopération directe, parmi les plus marquants, est celui entre 2 complexes de modification de la chromatine chez la levure : le complexe comprenant l'acétyltransférase NuA4 (Tip60 chez l'Homme) et le complexe de remodelage de la chromatine SWR1 (p400 chez l'Homme). Altaf et ses collaborateurs ont montré que l'acétylation de H2A ou H4 par NuA4, au sein de la chromatine, stimule l'incorporation du variant d'histone HTZ1 (H2A.Z chez l'homme) par le complexe SWR1 *in vitro* et *in cellulo* chez la levure. Pour cela, la sous-unité Bdf1 du complexe SWR1 interagit avec H2A ou H4 acétylés (par NuA4) pour cibler la région d'échange de H2A-H2B par H2A.Z-H2B (Altaf et al., 2010) (Figure 21). Ces 2 types de modificateurs peuvent également agir de manière antagoniste sur le même processus. Par exemple, chez l'Homme, p400 et Tip60 contrôlent la prolifération des cellules de cancers colorectaux via des régulations différentes de la même voie de signalisation : la voie Wnt. Comme ils agissent de manière opposée, le ratio d'expression de ces 2 modificateurs de la chromatine est essentiel dans ce contexte et permet, via Wnt, le contrôle de la prolifération des cellules (Chevallard-Briet et al., 2014). Ces résultats montrent comment ces 2 acteurs chromatinien sont capables de coopérer de différentes manières selon le contexte.

Les modifications post-traductionnelles peuvent également être mutuellement exclusives, où le dépôt d'une marque va inhiber celui d'une autre marque. Par exemple, la lysine 9 de l'histone H3 peut être acétylé ou méthylé, le dépôt de l'une des 2 marques sur cette lysine inhibe, *de facto*, la présence de l'autre (Lacoste and Côté, 2003).

La relation entre ces modificateurs et/ou marques de la chromatine est essentielle et doit être prise en compte pour l'étude des mécanismes chromatinien contrôlant les processus biologiques comme la transcription ou le devenir cellulaire.

c) Rôle de la dynamique chromatinienne dans la transcription

La transcription est un processus biologique clé dans le devenir et la physiologie cellulaires, dont la régulation dépend des mécanismes chromatinien. La compaction de la chromatine, via le nucléosome, est une barrière au bon déroulement de ce processus notamment en empêchant la fixation et l'action de l'ARN Polymérase II (Zanton and Pugh, 2006). La modification de cette accessibilité et la dynamique de la chromatine sont donc essentielles à la transcription. L'acétylation des histones, par exemple, est connue pour avoir un effet d'ouverture de la chromatine en diminuant l'interaction entre l'ADN et les histones (Görisch et al., 2005). Historiquement, les HAT ont été considérées comme étant recrutées pour activer l'expression des gènes et les HDAC pour l'inhiber. Cependant, une étude a récemment montré que la dynamique de l'acétylation, médiée par les HAT et les HDAC au cours de la transcription, était un peu plus complexe (Wang et al., 2009). Dans cette étude, les auteurs ont analysé la liaison de 5 HAT et de 4 HDAC aux promoteurs des gènes par immunoprécipitation de la chromatine suivie du séquençage (ChIP-seq) dans des cellules humaines. De manière surprenante, comme pour les HAT, une corrélation a été établie entre la liaison des HDAC sur les promoteurs et l'acétylation, la liaison de l'ARN polymérase II ainsi que l'expression des gènes. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que les HAT sont présentes aux niveaux des promoteurs des gènes actifs en tant que co-activateur de la transcription, et que les HDAC sont présentes pour faire une réinitialisation de la chromatine (ici enlever l'acétylation des histones) après la transcription pour limiter ce processus et/ou lui permettre d'être réenclenché. Cette étude montre l'importance de la dynamique de

l'acétylation et du caractère transitoire que ces marques chromatinienne doivent avoir lors d'un processus comme la transcription.

Les interconnexions entre les marques chromatinienne doivent aussi être prises en compte dans le contrôle de la transcription (revue Lee et al., 2010). Par exemple, La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (H3S10Phospho) favorise l'acétylation de la lysine 14 de H3 (H3K14Ac) *in vitro*, et ces 2 marques régulent de façon similaire l'expression de certains gènes (Ho, His3...) chez la levure (Lo et al., 2000). Certaines marques exclusives, comme H3R2me2a et H3K4me3, qui ne sont jamais présentes aux mêmes sites chez la levure, contribuent également à la régulation de la transcription. Dans ce cas-là, H3R2me2a inhibe la fixation de l'histone méthyltransférase Set1p, qui ne peut donc pas tri-métyler H3K4, ce qui a pour conséquence l'inhibition de la transcription (Kirmizis et al., 2007).

L'étude du rôle crucial de la dynamique chromatinienne dans la régulation de la transcription a fait l'objet d'efforts intenses qui ont permis de mieux comprendre les mécanismes de contrôle de ce processus et les conséquences qui en découlent (revue Li et al., 2007a).

d) Rôle de la dynamique chromatinienne dans le devenir cellulaire

L'acquisition d'une identité cellulaire est notamment définie par la mise en place d'un programme transcriptionnel spécifique. La dynamique de la chromatine est essentielle à la réalisation de ce programme, en réponse à des signalisations intracellulaires ou à des stimuli environnementaux, et peut être ainsi à l'origine du changement d'identité. Un des exemples les plus étudiés est celui du maintien ou de la différenciation des cellules souches embryonnaires (ESC). Les ESC, pour conserver leur identité, doivent activer les gènes de pluripotence et réprimer les gènes de différenciation ; pour cela les facteurs de transcription Oct4, Sox2 et Nanog sont primordiaux (Boyer et al., 2005). Mais il a été démontré que la dynamique des complexes de remodelage INO80 et p400 est aussi essentielle, notamment dans le maintien de l'identité des ESC. INO80 permet le maintien de leur pluripotence grâce à son action d'ouverture de la chromatine au niveau de promoteurs des gènes spécifiques de ce caractère (Oct4, Nanog, Klf4...). Il est guidé au niveau de ces régions par le facteur de transcription Oct4, et permet la fixation de l'ARN polymérase II et donc, l'expression de ces

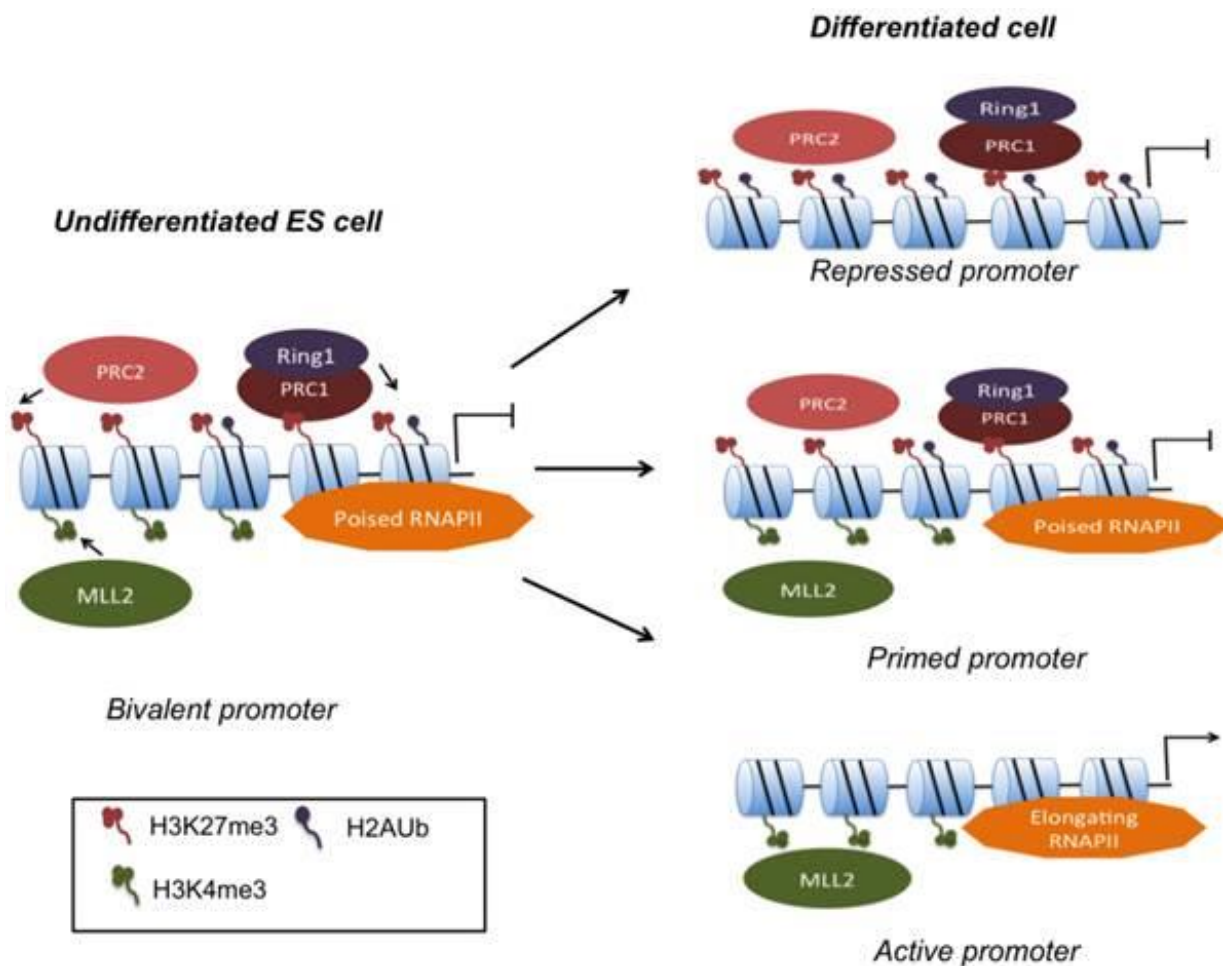


Figure 22 : Dynamique des gènes bivalents durant la différenciation des cellules ES

Dans les cellules ES les complexes MLL et PRC2 déposent les marques H3K4me3 (activatrice) et H3K27me3 (inhibitrice) respectivement. Les gènes ayant ces 2 marques à leur promoteur ne sont pas exprimés, cependant l'ARN polymérase II est présente au niveau de ces promoteurs et est prête à être activée. Durant la différenciation, les promoteurs peuvent conserver leur bivalence, ou alors la perte de l'une ou l'autre des marques peut survenir pour réprimer ou activer la transcription du gène. D'après Kraushaar and Zhao, 2013.

gènes. Au cours de la différenciation, la diminution de l'expression de INO80, couplée à la diminution de sa fixation aux promoteurs cibles (due à la diminution de l'expression de Oct4), entraînent la perte de l'expression des gènes de pluripotence (Wang et al., 2014). Le complexe p400, quant à lui, contrôle l'identité des ESC d'une manière différente. Dans ce contexte, le complexe p400 est impliqué principalement dans la répression des gènes de différenciation. Le set de gènes régulés par p400 chevauche fortement celui des gènes régulés par le facteur de transcription Nanog, suggérant un lien entre ces 2 facteurs dans l'expression génique. Par exemple, ces 2 acteurs sont essentiels à l'inhibition de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation de l'endoderme : Gata4 et 6 (Fazio et al., 2008). De plus, les acteurs chromatinien peuvent réguler de manière redondante ce processus biologique pour permettre d'assurer sa robustesse. Dans le cas du maintien de la pluripotence et de l'identité des ESC, qui sont essentielles pour le développement normal de l'embryon, le complexe p400 et le complexe Polycomb (PRC2, qui dépose la marque répressive H3K27me3) ont des rôles redondants. Ces 2 modificateurs de la chromatine ont pour rôle d'inhiber les gènes de différenciation dans les ESC, et notamment inhibent le facteur Gata6 (Boyer et al., 2006; Fazio et al., 2008).

L'identité cellulaire des cellules ES est également contrôlée par la dynamique et les relations entre modifications post-traductionnelles des histones. En effet, les marques chromatinien régulent de façon complexe l'expression des gènes appelés « bivalents ». Ce terme, décrit pour la première fois en 2006 par Bernstein et ses collaborateurs, regroupe les gènes qui ont au niveau de leurs régions régulatrices (promoteurs ou enhancers) à la fois des marques activatrices de la transcription et des marques répressives. Dans cette étude, les auteurs ont montré que la marque activatrice H3K4me3 et la marque répressive H3K27me3 (déposée par PRC2) sont présentes aux promoteurs de gènes, notamment de facteurs de transcription-clés du développement et de la différenciation dans les ESC. La présence des 2 marques dans les ESC se traduit par l'inhibition de l'expression de ces gènes, alors que la perte de H3K27me3 durant la différenciation permet l'expression rapide de ces gènes (Bernstein et al., 2006) (Figure 22). Ceci suggère que ces marques, qui sont essentielles aux processus développementaux, pourraient être aussi impliquées dans la différenciation des tissus adultes. Ce mécanisme permettrait donc d'inhiber les gènes de

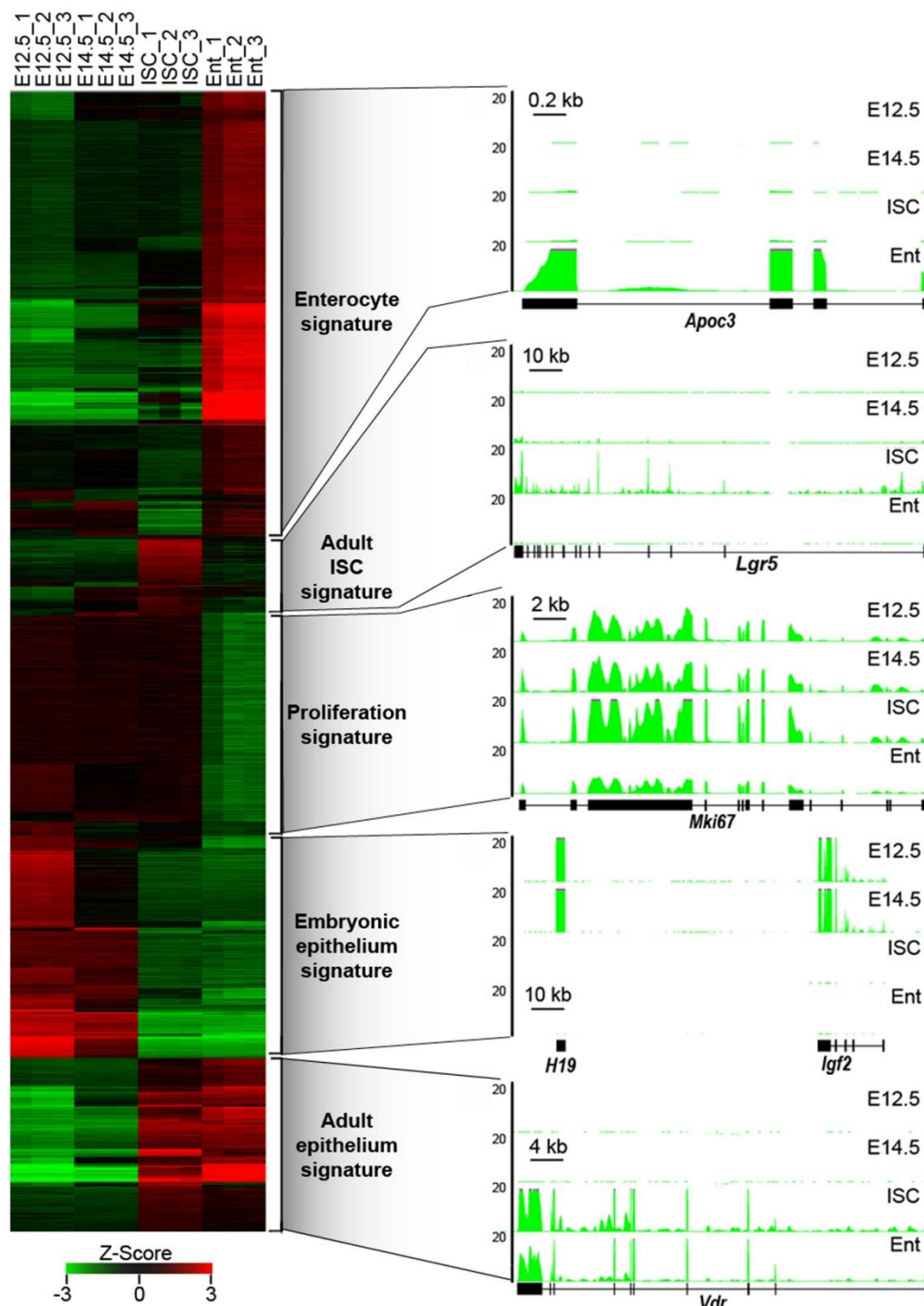


Figure 23 : Changement du transcriptome durant la spécification et la différenciation des cellules épithéliales intestinales

Heatmap montrant les gènes différentiellement exprimés entre l'épithélium embryonnaire à E12.5 et E14.5, les cellules souches intestinales (ISC) et les entérocytes matures. Les gènes différentiellement exprimés sont regroupés en groupe d'expression. Par exemple, les gènes plus exprimés dans les entérocytes que dans l'embryon et dans les ISC sont regroupés dans le groupe de gènes signatures des entérocytes. Les panels de droite montrent des exemples représentatifs de l'expression d'un gène appartenant à chaque groupe de gènes. D'après Kazakevych et al., 2017.

différenciation dans les cellules pluri/multipotentes et de pouvoir les exprimer rapidement lors de la différenciation.

De manière très intéressante, INO80 est également indispensable à la reprogrammation des cellules somatiques (fibroblastes embryonnaires murins MEF) en cellules pluripotentes (iPSC), grâce à son rôle dans l'expression des gènes importants pour la pluripotence (Wang et al., 2014). Ceci montre que la chromatine est impliquée dans la plasticité cellulaire, ce qui laisse entrevoir un rôle fort de la chromatine et de ses modificateurs dans le destin cellulaire en réponse à des signaux environnementaux.

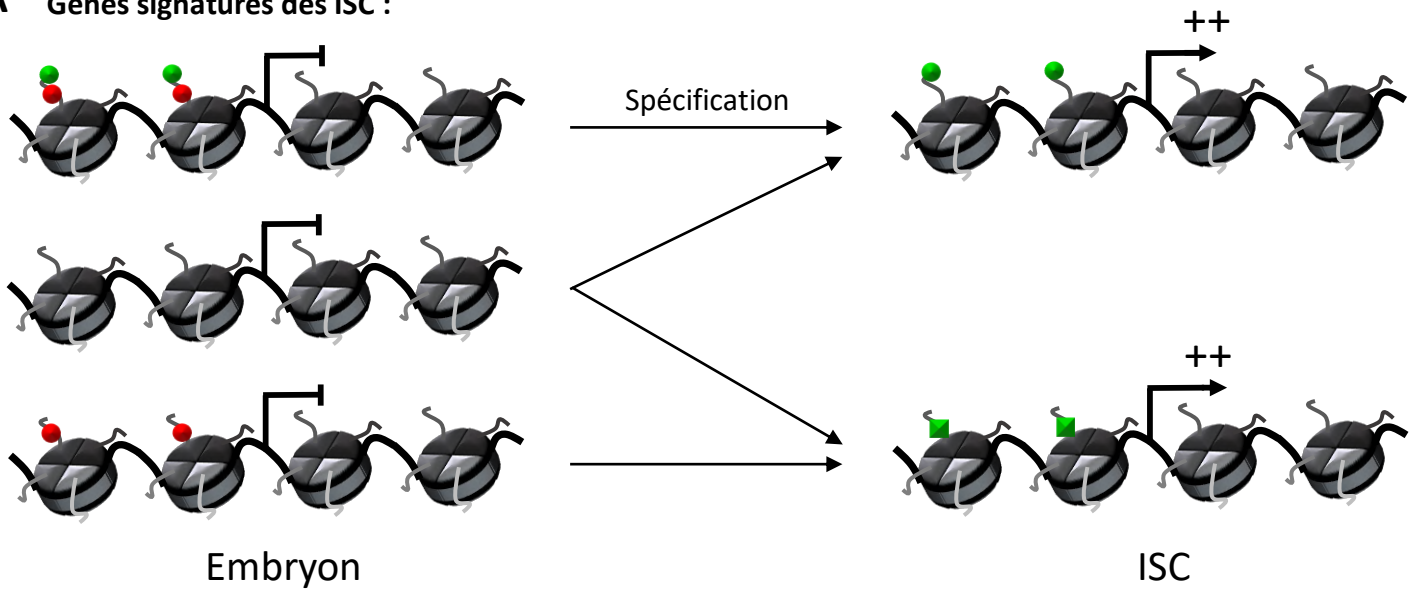
Toutes ces études montrent donc le rôle fondamental de la dynamique chromatinienne dans le choix ou le maintien de l'identité cellulaire au cours du développement embryonnaire (revue (Hota and Bruneau, 2016)). Ceci laisse également entrevoir un rôle important de la dynamique chromatinienne dans le contrôle de l'identité des cellules dans les tissus adultes.

2) Dynamique des marques chromatinienne dans l'épithélium intestinal : destin cellulaire vs plasticité cellulaire

a) La dynamique chromatinienne au sein de l'épithélium intestinal normal

Pour tester le rôle de la dynamique chromatinienne dans le contrôle de l'identité des cellules adultes, l'épithélium intestinal est un modèle très intéressant, de par sa structure (un compartiment non différencié et un compartiment différencié), son grand nombre de types cellulaires différents mais aussi de par sa rapidité de renouvellement. Comme démontré par les travaux du laboratoire de Ramesh Shivdasani, les facteurs de transcription spécifiques du développement ou du choix d'une identité cellulaire dans l'intestin n'agissent pas seul dans la mise en place des programmes de transcription. Comme déjà évoqué, la grande dynamique de CDX2 durant le développement (Kumar et al., 2019) ou durant la différenciation des ISC (Verzi et al., 2010) ne peut pas être expliquée par la seule variation du niveau d'expression de ce facteurs de transcription. Au cours du développement, les auteurs ont montré que la dynamique d'accessibilité de la chromatine est essentielle à la régulation de la dynamique de CDX2, et que celui-ci est ensuite important pour le maintien de cette accessibilité (Kumar et al., 2019). De plus, la perte de CDX2 dans l'épithélium intestinal adulte entraîne la diminution de l'accessibilité de la chromatine au niveau de certains

A Gènes signatures des ISC :



B Gènes signatures embryonnaires :

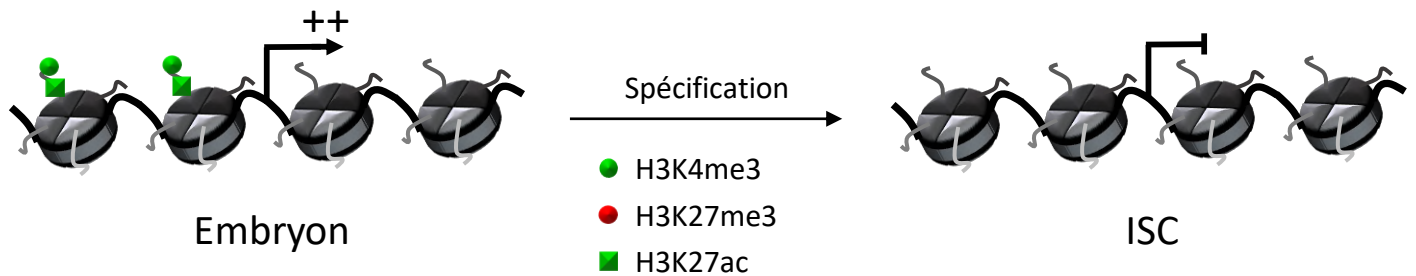


Figure 24 : Dynamique des marques chromatinienne au cours de la spécification des ISC

Représentation schématique de la dynamique majoritaire des marques H3K4me3, H3K27me3 et H3K27ac au cours de la spécification des ISC au niveau des promoteurs des gènes signatures des ISC (**A**, i.e. les gènes plus exprimés dans les ISC que dans l'embryon ou que dans les entérocytes) et au niveau des promoteurs des gènes signatures embryonnaires (**B**, i.e. les gènes plus exprimés dans l'épithélium embryonnaire que dans l'adulte). Les marques vertes sont activatrices de la transcription alors que les rouges sont inhibitrices..

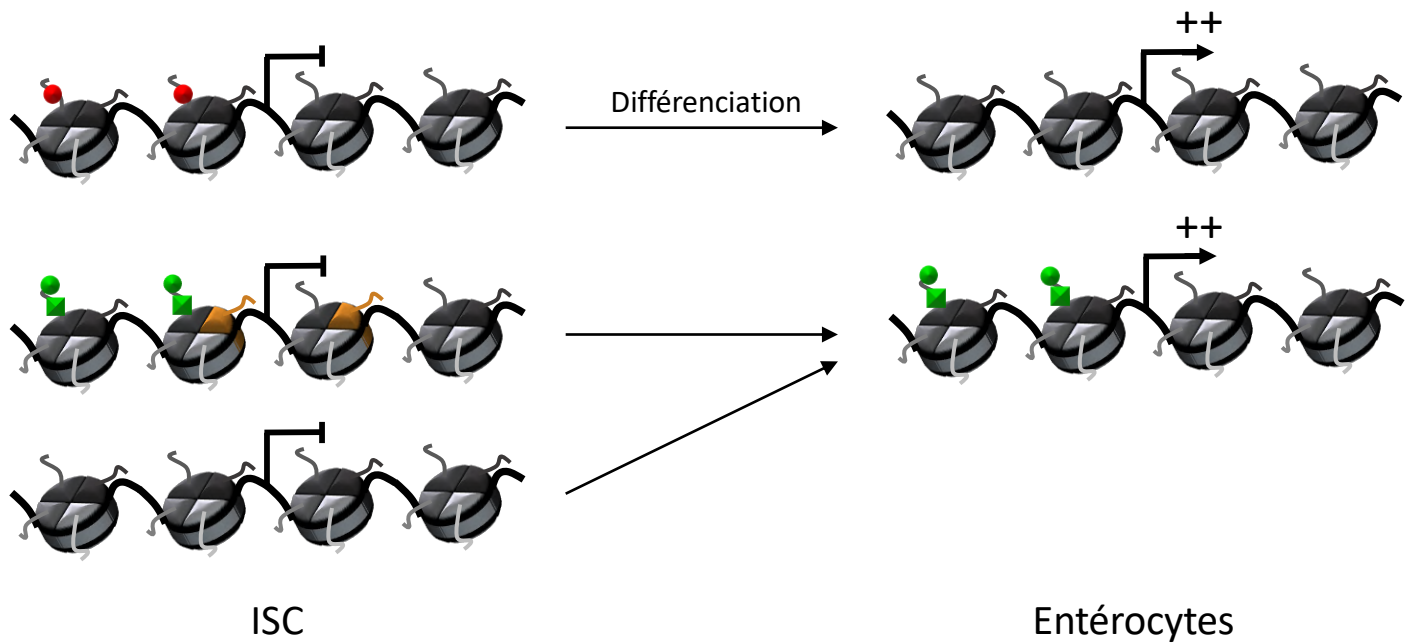
enhancers de gènes cibles de CDX2 (Si...) (Verzi et al., 2010). Enfin, en accord avec ces résultats, une étude a montré que CDX2 permet le recrutement du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF au niveau des promoteurs de certains de ses gènes cibles *in cellulo*, permettant ainsi l'ouverture de la chromatine au niveau de ces régions (Nguyen et al., 2017). Ces résultats montrent le lien très fort entre la dynamique de CDX2 et celle de la chromatine. L'étude du paysage chromatinien durant le développement et la différenciation intestinale semble donc essentielle à la compréhension de la dynamique de ce facteur de transcription, mais également de la dynamique d'autres facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'identité cellulaire et l'homéostasie épithéliale intestinale.

Pour appréhender le rôle de la chromatine dans le contrôle de l'identité cellulaire au niveau intestinal, le laboratoire de Natalia Soshnikova a étudié la dynamique de plusieurs marques chromatinienne et les changements transcriptomiques associés (Figure 23), au cours de la spécification des cellules souches intestinales (ISC) mais aussi au cours de la différenciation de ces ISC en entérocytes (Kazakevych et al., 2017).

Il a été montré qu'au jour de développement embryonnaire 14.5 (E14.5) les cellules précurseuses de l'épithélium intestinal commencent à préparer la spécification, en déposant la marque activatrice H3K4me3 au niveau d'un grand nombre de gènes « signature » des ISC (i.e. les gènes fortement exprimés dans les ISC par rapport à l'embryon E14.5 et aux entérocytes, figure 23). A ce stade embryonnaire, ces gènes « signatures » des ISC ne devant pas être exprimés, cette marque est associée principalement à la marque répressive H3K27me3 pour inhiber l'expression de ces gènes. Durant la spécification, la marque répressive est perdue et ces gènes sont donc exprimés dans les ISC (Figure 24A). Les autres gènes « signatures » des ISC, qui n'ont pas la marque H3K4me3, gagnent la marque activatrice H3K27ac durant la spécification (Figure 24A). Enfin les gènes « signatures embryonnaires » (i.e. les gènes fortement exprimés à E14.5 par rapport aux ISC et aux entérocytes, figure 23) perdent les marques activatrices H3K4me3 et H3K27ac, ce qui semble expliquer la diminution de leur expression (Figure 24B).

Les auteurs ont par la suite analysé la dynamique de ces marques chromatinienne au cours de la différenciation des ISC en entérocytes, qui correspond à un bouleversement du transcriptome avec pas moins de la moitié des gènes actifs qui sont différentiellement exprimés entre ces 2 types cellulaires (cf Figure 12 et 23). Une partie de ces changements

A Gènes signatures des entérocytes :



B Gènes signatures des ISC :

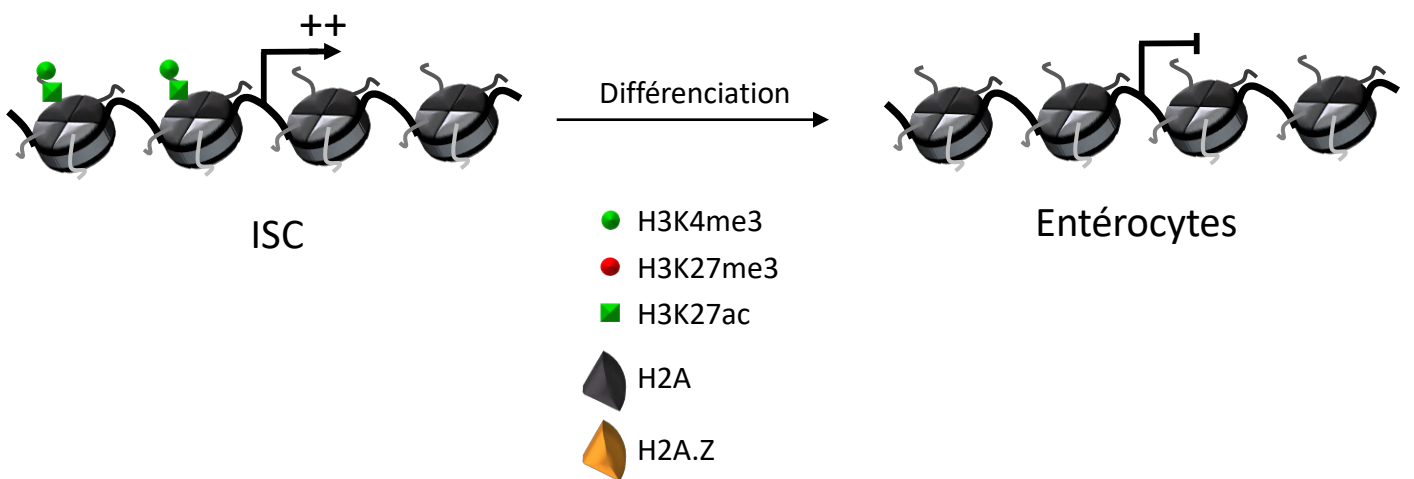


Figure 25 : Dynamique des marques chromatinienne au cours de la différenciation des ISC

Représentation schématique de la dynamique majoritaire des marques H3K4me3, H3K27me3, H3K27ac et H2A.Z au cours de la différenciation des ISC au niveau des promoteurs des gènes signatures des entérocytes (A, i.e. les gènes plus exprimés dans les entérocytes que dans l'embryon ou que dans les ISC) et au niveau des promoteurs des gènes signatures des ISC (B, i.e. les gènes plus exprimés dans les ISC que dans l'embryon ou que dans les entérocytes). Les marques vertes sont activatrices de la transcription alors que les rouges sont inhibitrices.

peut être expliquée par la dynamique de la marque répressive H3K27me3, qui est perdue aux promoteurs de quelques gènes « signatures » des entérocytes (i.e. les gènes plus exprimés dans les entérocytes que dans les ISC ou à E14.5, figure 23), notamment les gènes du cluster d'inhibiteurs du cycle cellulaire *Cdkn2a/b* (Figure 25A). Le plus gros changement au cours de la différenciation des ISC concerne le variant d'histone H2A.Z. La présence de H2A.Z diminue aux promoteurs d'un grand nombre de gènes « signatures » des entérocytes au cours de la différenciation des ISC (Figure 25A). L'hypothèse que H2A.Z inhiberait la différenciation entérocytaire dans les ISC en contrôlant négativement le programme transcriptionnel spécifique de ces cellules a été émise. De plus, les promoteurs des gènes « signatures » des entérocytes marqués par H2A.Z dans les ISC sont également, en très grande partie, associés aux marques activatrices H3K27ac et H3K4me3 (Figure 25A). Ce double marquage laisse penser que ces gènes sont bivalents, en attente de la différenciation pour être rapidement exprimés lors de la perte de H2A.Z. Enfin, les gènes « signatures » des ISC, qui sont réprimés dans les entérocytes, perdent les marques activatrices H3K27ac et H3K4me3 au cours de la différenciation, mais ne gagnent pas de marques répressives comme la méthylation de l'ADN ou H3K27me3 (Figure 25B). Une des explications pourrait être un mécanisme permettant d'inhiber les gènes « signatures » des ISC, sans trop « verrouiller » la chromatine afin de garantir une certaine réversibilité dans la régulation génique et permettre ainsi la plasticité du tissu.

Cette étude, sur la dynamique de nombreuses marques chromatiniennes, laisse penser que certaines de ces marques pourraient être impliquées dans l'acquisition d'une identité cellulaire spécifique ou dans la mise en place de ce changement. Comme le suggèrent Verzi et ses collaborateurs en 2010, ce changement de patron chromatinien pourrait être notamment impliqué dans le changement de liaison des facteurs de transcription comme CDX2 (Verzi et al., 2010). De plus, cette étude laisse également présager d'un rôle de la chromatine dans la plasticité tissulaire.

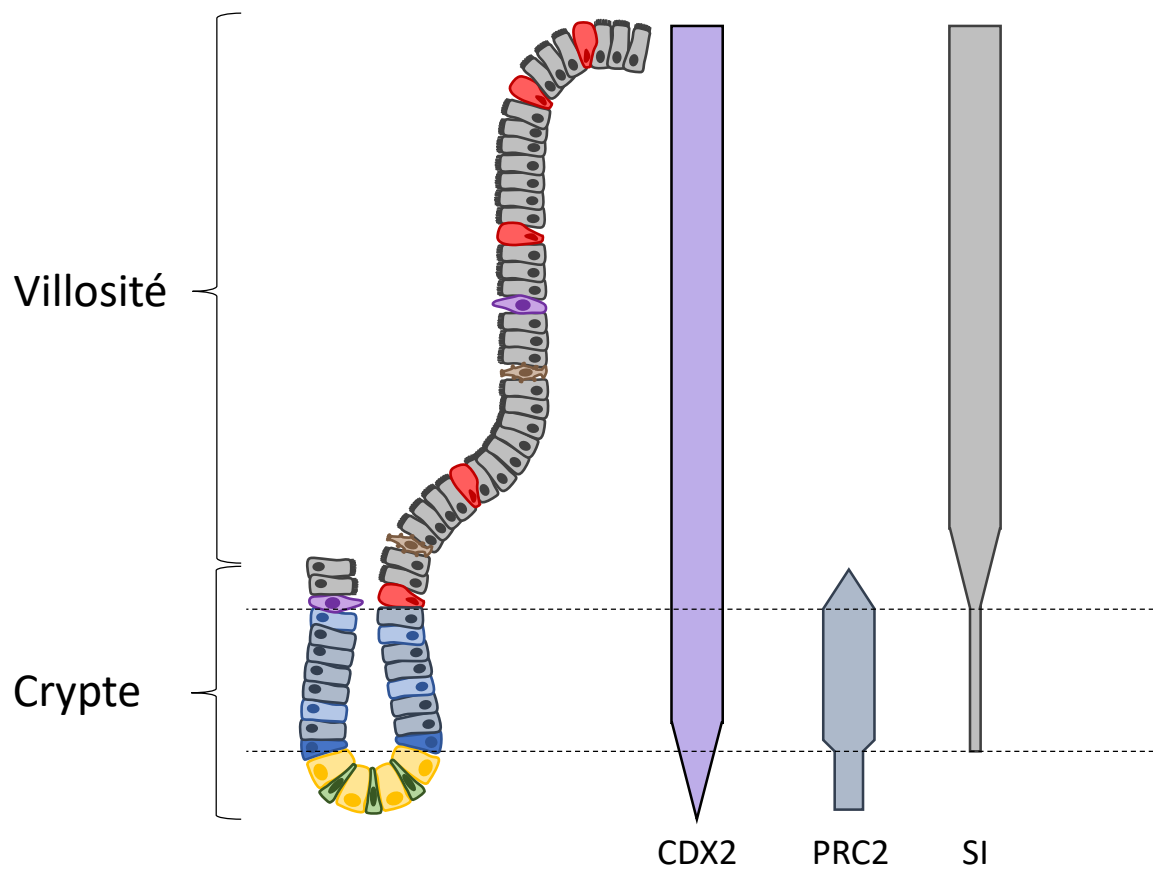


Figure 26 : Hypothèse de mécanisme de maintien de l'identité des cellules progénitrices

Schéma illustrant les patrons de présence de CDX2, PRC2 et SI dans l'épithélium intestinal. La zone entre les lignes pointillées définit les cellules progénitrices qui expriment très faiblement les gènes de différenciation entérocytaire terminale (comme *SI*) malgré la présence du facteur de transcription CDX2. L'hypothèse est donc que la chromatine (par exemple PRC2) permet l'inhibition de l'expression de ces gènes dans ces cellules.

- b) Rôle de la dynamique de la chromatine dans le choix et la mise en place d'un destin cellulaire
- H3K27me3 et le complexe PRC2

Une des marques chromatinienne les plus étudiées dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal, mais aussi dans le destin cellulaire en général, est H3K27me3 et le complexe en charge de son dépôt sur la chromatine : Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). La première démonstration de son implication dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal normal a été faite par Benoit et ses collaborateurs en 2012 (Benoit et al., 2012). Dans cette étude, les auteurs ont montré que la déplétion de SUZ12 (une sous-unité de PRC2), qui permet la déplétion des 2 sous complexes contenant les deux méthyltransférases de H3K27 : EZH1 et 2, entraîne, dans des modèles cellulaires humains de différenciation entérocytaire (Caco-2/15 et HIEC^{HNF1α/Cdx2}), l'augmentation de l'expression de certains marqueurs de différenciation (SI, LPH, DPPIV, ALPI), ainsi que la diminution de la prolifération des cellules HIEC (modèle de cellules progénitrices intestinales). Ils ont également montré que la répression des marqueurs de différenciation est dépendante de la présence de CDX2 et HNF1α, et que SUZ12 est principalement exprimé dans les cellules progénitrices *in vivo*. Les facteurs de transcription CDX2 et HNF1α sont exprimés dans les cellules progénitrices alors que certaines de leurs cibles (SI, LPH...) ne le sont pas (Benoit et al., 2012). Ceci a permis aux auteurs d'émettre l'hypothèse que PRC2 serait impliqué dans le maintien de l'identité des cellules progénitrices, via la répression de l'expression des marqueurs de différenciation et le maintien de leur prolifération (Figure 26). Des études *in vivo* chez la souris (grâce au KO inducible du gène *Eed* codant pour une sous-unité également partagée par les 2 sous-complexes) ont également montré le rôle prépondérant de PRC2 dans le contrôle de l'homéostasie de l'épithélium intestinal (Chiacchiera et al., 2016; Koppens et al., 2016). Ces études ont confirmé le rôle essentiel de PRC2 dans le maintien de la prolifération des progéniteurs (perte du marquage Ki67 dans les souris KO) via l'inhibition directe du locus *Cdkn2a* (*Ink4a*, qui code pour des inhibiteurs du cycle cellulaire), mais sont en désaccord sur le caractère indispensable de PRC2 pour le maintien des cellules souches. L'une a analysé l'effet du KO sur l'épithélium intestinal 15j après l'induction (Chiacchiera et al., 2016) et n'a pas vu d'effet sur le maintien des ISC, alors que l'autre a analysé l'effet 6 semaines après l'induction et a vu une perte des ISC (Koppens et al., 2016). Comme ces 2 études ont utilisé le même modèle d'induction (*AhCre;Eed*^{LoxP/LoxP}), la différence pourrait être expliquée par la

fenêtre d'analyse, et notamment la récurrence des inductions de la recombinaison dans le travail de Koppens et ses collaborateurs ; en effet, dans ce type de modèles, toutes les cryptes ne sont pas directement affectées par le KO à la première induction. Après 6 semaines d'induction, environ 90% des cryptes sont affectées mais les cryptes restantes sont hyperactives en termes de prolifération (Koppens et al., 2016). Le manque d'effet visible sur le maintien des ISC dans la globalité de l'intestin (pas de diminution de l'expression de *Lgr5*) dans l'étude de Chiacchiera et ses collaborateurs peut donc être dû à une compensation par les cryptes sauvages (wt) encore en grand nombre. Ces 2 études montrent également une forte augmentation de la différenciation du lignage sécrétoire dans les souris KO, avec l'augmentation du nombre de cellules à mucus et entéroendocrines, et l'augmentation et la délocalisation des cellules de Paneth. D'autres aberrations de différenciation sont même parfois observées avec la co-expression, dans la même cellule, de marqueurs de cellules à mucus et de cellules de Paneth. Les auteurs ont montré que le rôle de PRC2 dans la répression de la différenciation sécrétoire est direct, par l'inhibition de l'expression des facteurs de transcription *Math1* et *Gfi1* au niveau des cellules progénitrices et des ISC. Ces résultats valident la présence de H3K27me3 aux promoteurs des gènes de différenciation sécrétoire dans les ISC et les entérocytes, telle qu'observée dans l'étude menée par le laboratoire de Natalia Soshnikova (Kazakevych et al., 2017). Enfin, aucune induction de la différenciation entérocytaire n'est observée *in vivo*, contrairement à ce qui avait été démontré *in cellulo* (Benoit et al., 2012; Oittinen et al., 2017). Cette variation peut être expliquée par la différence d'organisme (humain *versus* murin), par une compensation d'un autre facteur *in vivo* pour conserver une différenciation entérocytaire normale, ou par la forte induction du lignage sécrétoire (au dépend du lignage absorbant) dans les KO *in vivo*, qui pourrait masquer l'effet sur l'expression des marqueurs de différenciation entérocytaire.

Ces études montrent le rôle fondamental de la dynamique chromatinienne, au travers de PRC2 et H3K27me3, dans le maintien des ISC ainsi que dans la mise en place et le maintien de l'identité des progéniteurs intestinaux, en évitant que ceux-ci se différencient ou arrêtent de proliférer.

- Les HDAC et l'acétylation des histones

Le rôle de la dynamique chromatinienne dans l'homéostasie épithéliale intestinale a également été abordé par l'étude de l'acétylation des histones, notamment via les enzymes qui enlèvent ces marques : les HDAC. En 2004, Tou et ses collaborateurs ont démontré l'importance des HDAC (1 et 2) dans la répression de gènes marqueurs de l'épithélium mature dans l'intestin embryonnaire à E13 (comme *Fabpi*, *Apo1a* et *Upa*) (Tou et al., 2004). La fixation de HDAC1 et 2 aux promoteurs de ces gènes diminue au cours du développement embryonnaire (entre E13 et E17), ce qui a pour conséquence l'augmentation de l'acétylation de H3 et H4 et l'expression de ces gènes. Cette augmentation de l'acétylation durant le développement est d'ailleurs retrouvée dans l'étude de Kazakevych et ses collaborateurs. En effet, certains promoteurs de gènes « signatures de l'épithélium adulte » (i.e. Des gènes plus exprimés dans les ISC et les entérocytes que dans les progéniteurs intestinaux à E14.5, cf Figure 23) gagnent la marque H3K27ac durant le passage de E14.5 au tissu adulte (ISC et entérocytes) (Kazakevych et al., 2017). Dans l'intestin adulte, la perte de l'activité des HDAC, soit via des inhibiteurs (SAHA, β -Hydroxybutyrate (β HB)) (Roostae et al., 2015; Wang et al., 2017), soit par KO spécifique de *Hdac1* et *Hdac2* (Zimmerlin et al., 2015) dans l'intestin, entraîne une forte perte de la prolifération des cellules intestinales *in cellulo* et *in vivo*. De plus, Zimmerlin et ses collaborateurs ont montré que le KO de *Hdac1* et *Hdac2* induit une forte diminution de l'expression des marqueurs d'ISC (*Lgr5*, *Olfm4*...) ainsi que la perte de capacité à former des organoïdes. Ceci n'est pas retrouvé dans le KO de *Hdac1* ou de *Hdac2* seul, ce qui montre là aussi la redondance fonctionnelle de ces 2 protéines. Ces résultats montrent que les protéines HDAC 1 et 2 sont essentielles au maintien des cellules souches intestinales (Zimmerlin et al., 2015).

L'inhibition pharmacologique des HDAC entraîne également une forte hausse de l'expression des marqueurs de différenciation absorbante ou sécrétoire, dans les modèles cellulaires humains de différenciation et *in vivo* chez la souris (Roostae et al., 2015; Wang et al., 2017). Cependant, l'étude de Zimmerlin et de ses collaborateurs ne montre pas d'augmentation de l'expression de ces marqueurs de différenciation après KO de *Hdac1* et 2, une tendance à la diminution est même observée (Zimmerlin et al., 2015). Ceci peut être expliqué par la trop forte perte des ISC dans le KO *Hdac1* et *Hdac2*, qui ne vont donc plus pouvoir renouveler l'épithélium, ce qui va aboutir à la perte progressive des cellules différenciées de l'intestin.

Ceci peut être également expliqué par la différence de cibles dans ces études ; en effet, les études qui montrent une augmentation de la différenciation ont utilisé des inhibiteurs des HDAC, ce qui pourrait suggérer un rôle de ces protéines indépendant de leur activité déacétylase (plateforme pour permettre le recrutement d'autres protéines). Une autre tiendrait à la non-spécificité de ces inhibiteurs qui sont susceptibles d'inhiber de nombreuses HDAC et/ou d'autres enzymes, contrairement à l'étude de Zimmerlin et ses collaborateurs, où les auteurs ont délété spécifiquement *Hdac1* et *Hdac2*.

L'effet de la perte des HDAC, et donc de l'augmentation de l'acétylation, sur l'expression des marqueurs de différenciation, est cohérent avec l'augmentation de H3K27ac sur les promoteurs de gènes « signatures » des entérocytes (Kazakevych et al., 2017) (cf Figure 25A). De manière très intéressante, le β -Hydroxybutyrate (β HB) est un inhibiteur endogène des HDAC qui voit sa concentration circulante augmentée lors de long jeûne (Newman and Verdin, 2014). Ceci montre donc que la chromatine fait le lien entre des signaux environnementaux et l'homéostasie du tissu, avec par exemple ici une surexpression des enzymes essentielles à la digestion (comme la SI) en réponse à un jeûne, grâce aux HDAC.

Comme pour la méthylation des histones, ces études montrent le rôle prépondérant de leur acétylation et des enzymes responsables de la dynamique de cette marque dans le contrôle des identités cellulaires de l'intestin, via la régulation du programme transcriptionnel.

- La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est plutôt statique au cours de la différenciation des ISC (Kaaij et al., 2013; Kazakevych et al., 2017). Ces études ont montré que les gènes « signatures » des entérocytes sont déjà déméthylés durant le développement de l'intestin, ce qui permet leur future activation (Kazakevych et al., 2017). Par contre, au cours de la différenciation, peu de régions gagnent ou perdent la méthylation de l'ADN (DMR) ; les seuls changements (des pertes) ont lieu aux niveaux d'enhancers de gènes qui sont plus exprimés dans les cellules différenciées (Kaaij et al., 2013). Une autre étude montre, en modifiant les seuils de détection des DMR, (Sheaffer et al., 2014) des modifications de la méthylation de l'ADN aux enhancers, notamment des gènes « signatures » de la différenciation (*Lct*, *Alpi*, *Krt20*) qui perdent cette marque et des gènes « signatures » des ISC (comme *Olfm4*) qui la gagnent. Le

Composition du complexe SWI/SNF



Maintien des ISC	Favorise	Favorise
	Régulation positive des gènes Lgr5, Olm4 et Ascl2	Régulation positive de Sox9
Différenciation du lignage sécrétoire	Inhibe	Favorise
	Via l'activation de Notch	?

Figure 27 : Rôle du complexe SWI/SNF dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal

Lorsque le complexe SWI/SNF est composé de l'ATPase Brg1, il favorise le maintien des ISC via la régulation positive de l'expression des gènes Lgr5, Olm4 et Ascl2 et inhibe la différenciation du lignage sécrétoire via l'activation de la voie Notch (Takada et al., 2016). Lorsqu'il est composé de Arid1a et d'une autre ATPase que Brg1 (peut être Brm), ce complexe favorise également le maintien des ISC mais via la régulation positive de Sox9, cependant ce complexe favorise la différenciation du lignage sécrétoire avec un mécanisme inexpliqué (Hiramatsu et al., 2019).

KO de *Dnmt1* (méthyltransférase de maintenance, exprimée dans la crypte), *in vivo* chez la souris, entraîne une augmentation de la prolifération et de la taille du compartiment prolifératif qu'est la crypte, ainsi qu'une augmentation de l'expression de certains gènes « signatures » des ISC comme *Olfm4*. Ceci montre l'importance de la dynamique de la méthylation de l'ADN dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal. Enfin l'analyse du rôle des protéines TET, responsable de la déméthylation active de l'ADN (revue Wu and Zhang, 2017), dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal apparait essentielle à la meilleure compréhension de la dynamique de la méthylation de l'ADN et son rôle dans la régulation de ce processus.

- Les complexes de remodelage de la chromatine

Le complexe de remodelage SWI/SNF joue également un rôle dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal. Une des sous-unités ATPases de ce complexe, BRG1, a été montrée comme essentielle dans l'inhibition de la différenciation du lignage sécrétoire, via la régulation de la voie Notch. Mais cette sous-unité est également requise pour le maintien des ISC, dont l'expression des marqueurs (*Lgr5*, *Olfm4*, *Ascl2*...) est perdue dans les souris KO pour *Brg1*, de manière inexpliquée et indépendante de Notch (Takada et al., 2016). La sous-unité ARID1a (rôle dans l'interaction avec l'ADN), quant à elle, est fondamentale dans le maintien des ISC et de la crypte via la régulation positive de l'expression de *Sox9* (Hiramatsu et al., 2019). Le KO de *Arid1a* entraîne une diminution de la quantité de cellules du lignage sécrétoire, contrairement au KO de *Brg1* qui induit une augmentation du nombre de cellules de ce lignage. De plus le KO de *Brg1* n'a aucun effet sur l'expression de *Sox9*, ce qui montre donc que le KO de 2 sous-unités qui peuvent faire partie du même complexe, SWI/SNF, n'engendre pas le même phénotype. Ceci suggère que la composition du complexe est fondamentale dans la régulation de l'homéostasie de l'épithélium intestinal (Figure 27). Par exemple, le complexe SWI/SNF pourrait réguler l'expression de *Sox9* en étant composé de ARID1a et d'une autre ATPase du complexe : BRM, mais cette régulation pourrait aussi être indépendante de l'activité ATPase. De plus, la faible différence d'expression de ces sous-unités entre les différents types cellulaires de l'intestin (légère diminution de l'expression de *Arid1a* lors de la différenciation, par exemple) laisse penser que la spécificité de leurs activités, sur le programme transcriptionnel des différents types cellulaires, est donnée, soit

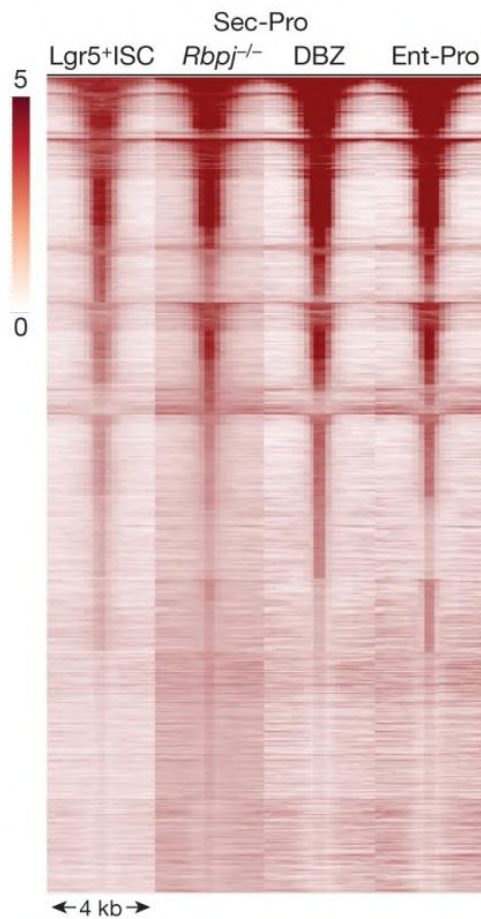


Figure 28 : Profil aux enhancers de H3K4me2 dans les cellules de la crypte

Profil de H3K4me2 aux niveaux de 57481 régions (à plus de 2 kb et plus de 1 kb en aval et en amont des TSS respectivement) dans les ISC Lgr5⁺, les progéniteurs sécrétoires (Sec-pro) et les progéniteurs absorbants (Ent-pro). D'après Kim et al., 2014.

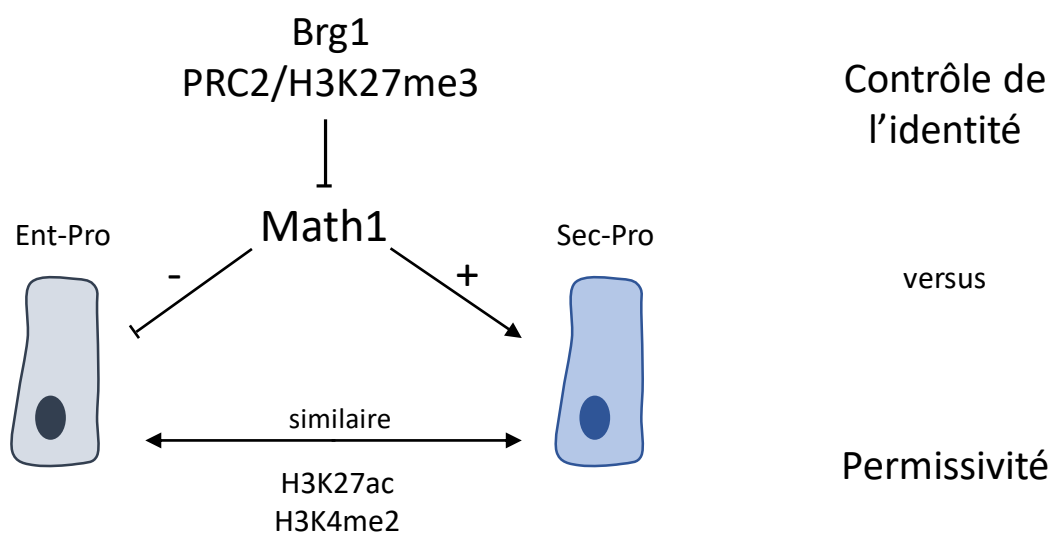


Figure 29 : Double rôle de la chromatine dans le contrôle de l'identité des cellules progénitrices

La chromatine contrôle le choix entre l'identité sécrétoire ou absorbante des cellules progénitrices, par exemple avec Brg1 ou PRC2 qui régulent ce choix via Math1. La chromatine, via les marques H3K27ac et H3K4me2, est également permissive à ce changement, car ces marques ne nécessitent pas de modifications pour passer d'un type cellulaire à l'autre.

par d'autres sous-unités du complexe, soit par d'autres marques chromatinienne. Ces études laissent donc entrevoir de nombreuses possibilités de régulation de l'homéostasie de l'épithélium intestinal par les complexes de remodelage de la chromatine. L'étude approfondie de la composition de ces complexes selon le processus régulé apparaît donc essentielle à la compréhension de cette régulation

c) Rôle de la dynamique de la chromatine dans la conservation de la plasticité cellulaire

En plus de son rôle prépondérant dans la mise en place de l'identité cellulaire, la chromatine est également essentielle au maintien de la plasticité de l'épithélium intestinal. Le terme de plasticité englobe ici tous les changements d'identité cellulaire en réponse à des stress ou à l'environnement, et pas seulement la dédifférenciation en cellules souches.

Une étude en 2014 a analysé la dynamique de plusieurs marques chromatinienne activatrices (H3K27ac et H3K4me2) ainsi que l'hypersensibilité à la DNase (DHS, permet d'analyser l'accessibilité à la chromatine) entre 2 types cellulaires de l'intestin : les progéniteurs du lignage sécrétoire (Sec-pro) *versus* les progéniteurs du lignage absorbant (Ent-pro) (Kim et al., 2014). De manière surprenante, les auteurs n'ont pas observé de différence majeure ni pour ces marques, ni pour l'accessibilité des régions régulatrices de la chromatine, et ce malgré une différence transcriptomique significative entre ces 2 types cellulaires (confirmant par ailleurs le fait que ce soit bien 2 types cellulaires différents) (Figure 28). Ils ont démontré que cette différence transcriptomique est en grande partie expliquée par la présence ou l'absence du facteur de transcription clé du choix du lignage : MATH1. Ils ont également montré que la perte de MATH1 dans les Sec-pro change l'identité de ces cellules en Ent-pro, donc que la chromatine arbore, dans ces cellules, une permissivité naturelle qui est fondamentale pour la plasticité du tissu dans le choix du lignage. Ceci montre que la chromatine peut, spontanément et sans remodelage, permettre la réponse de l'épithélium à un stress ou un problème majeur. De plus, la régulation de l'expression de *Math1* par des facteurs chromatinien (exemple de BRG1 ou de PRC2 qui inhibent son expression (Chiacchiera et al., 2016; Takada et al., 2016), montre l'action de la chromatine à différents niveaux pour mettre en place une identité cellulaire, tout en gardant une certaine plasticité en cas de problème (Figure 29).

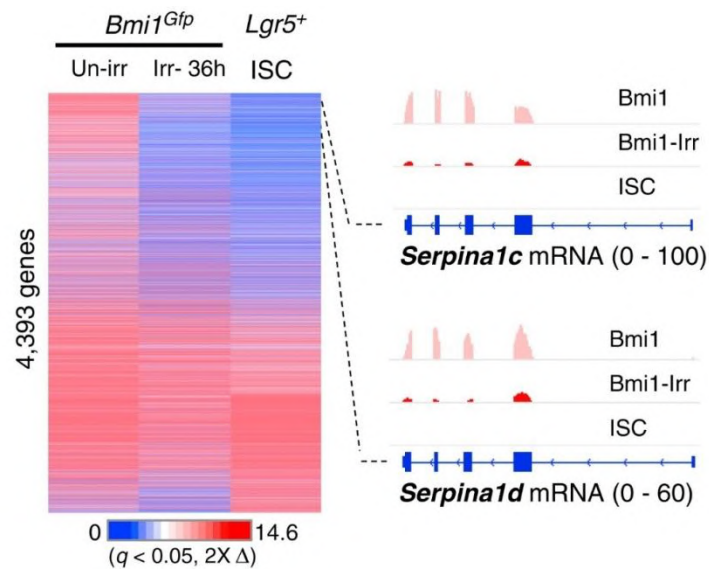
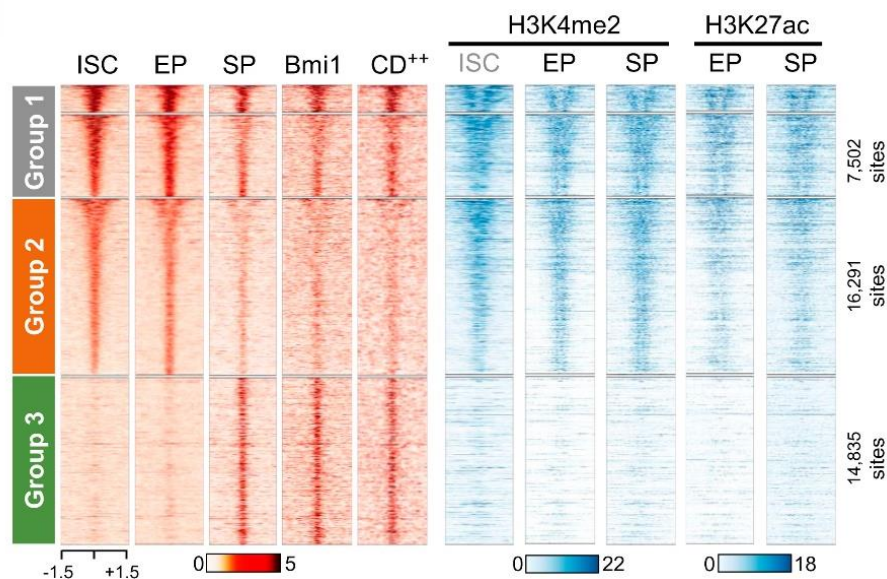
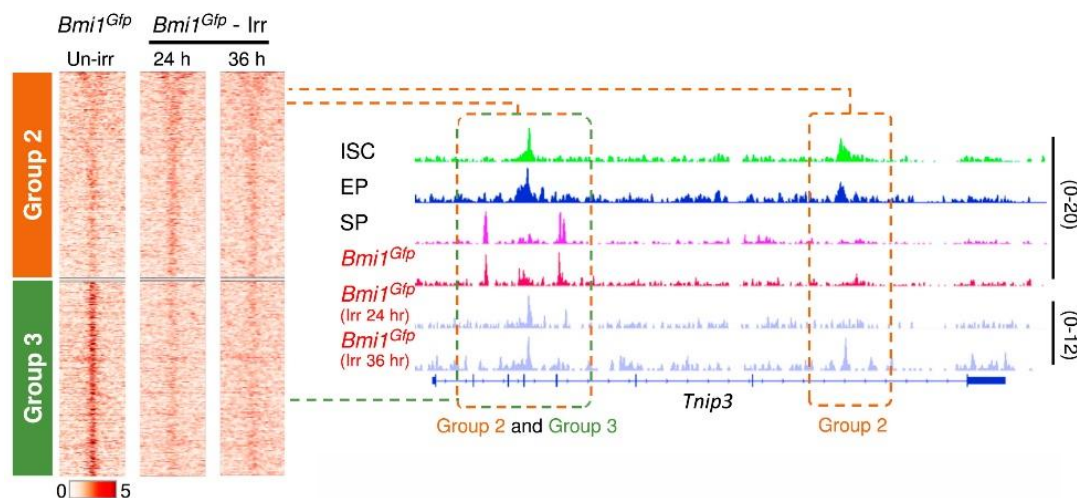
A**B****C**

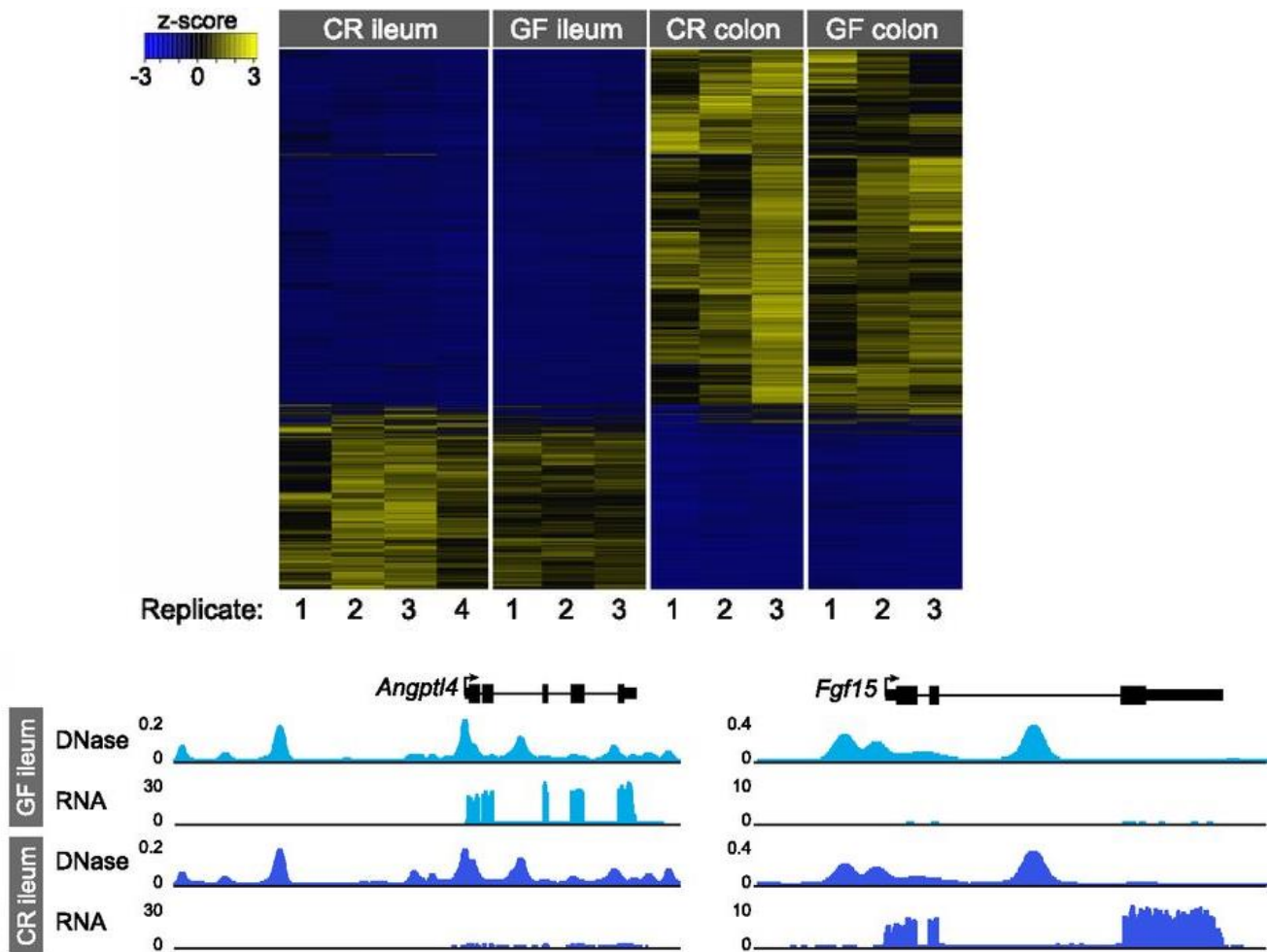
Figure 30 : Modification du transcriptome et de la chromatine lors de la dédifférenciation

A : Différence d'expression de 4393 gènes (les gènes différentiellement exprimés entre les cellules *Lgr5*⁺ et *Bmi1*⁺ (*Bmi1*^{GFP})) dans les cellules *Bmi1*⁺ avant ou après dédifférenciation (sans ou avec irradiation des souris). Les 2 panels de droite montrent 2 exemples de gènes qui voient leur expression diminuer lors de la dédifférenciation. **B** : Signaux ATAC-seq et ChIP-seq (H3K4me2 et H3K27ac) de 41167 régions (> 1 kb des TSS) dans les ISC, les progéniteurs absorbants (EP) et les progéniteurs sécrétoires (SP, *Bmi1*⁺ et CD⁺⁺). Le groupe 1 comprend les régions avec des signaux ATAC-seq similaires dans tous les types cellulaires, le groupe 2 les régions avec des signaux plus forts dans les ISC et les EP et enfin le groupe 3 les régions avec des signaux beaucoup plus forts dans les EP. **C** : Signaux ATAC-seq au niveau des régions des groupes 2 et 3 lors de la dédifférenciation des cellules *Bmi1*⁺ (après irradiation et perte des ISC *Lgr5*⁺). Le panel de droite montre un exemple d'une région du groupe 2 qui présente une apparition du signal ATAC-seq après irradiation et un exemple d'une région du groupe 3 qui perd ce signal lors de la dédifférenciation. D'après Jadhav et al., 2017.

Néanmoins, H3K27ac a été montré comme essentiel au contrôle du programme transcriptionnel le long de l'intestin ; en effet, la dynamique de cette marque, régulée ici par le facteur de transcription GATA4, contrôle la spécificité d'expression des gènes entre le jéjunum et l'iléon (Aronson et al., 2014). Là encore, ces résultats montrent comment la même marque chromatinienne peut avoir différents rôles (identité vs plasticité) selon l'échelle d'analyse, ainsi que l'étroite coopération entre les facteurs de transcription et la chromatine dans ces processus.

Une autre étude dans le même laboratoire a analysé le rôle de la chromatine dans la dédifférenciation des cellules intestinales lors de la perte des ISC (Jadhav et al., 2017). L'accessibilité à la chromatine a été analysée, par ATAC-seq cette fois-ci, dans les ISC, les Ent-pro et les Sec-pro, mais également dans 2 types cellulaires précurseurs des cellules à mucus et des cellules entéroendocrines (respectivement les cellules CD274⁺CD69⁺ et les cellules *Bmi1*⁺). Les auteurs ont montré, tout d'abord, que les cellules CD274⁺CD69⁺ et *Bmi1*⁺ sont capables de se dédifférencier en cellules souches en cas de perte des ISC *Lgr5*⁺, notamment en changeant leurs transcriptomes pour se rapprocher de celui des cellules *Lgr5*⁺ (Figure 30A). Au niveau de l'accessibilité, certaines régions sont similaires entre tous les types cellulaires, alors que certaines sont plus accessibles dans les cellules du lignage sécrétoire (i.e. Sec-pro, CD274⁺CD69⁺ et *Bmi1*⁺) que dans les cellules Ent-pro ou ISC (Figure 30B). Contrairement à la première étude, des régions ont donc une accessibilité différente entre les Ent-pro et les Sec-pro. Cependant ces régions sont négatives pour les 2 marques des enhancers actifs H3K4me2 et H3K27ac, or lors de la première étude les auteurs ont analysé l'accessibilité des régions positives pour ces marques, expliquant pourquoi ils n'ont pas observé de différence dans Kim et al., 2014 (Figure 30B). Ces régions pourraient donc définir la spécificité chromatinienne entre les 2 types cellulaires et l'analyse de leur remodelage lors du choix du lignage apparaît essentielle. Lors de la dédifférenciation, les cellules CD274⁺CD69⁺ et *Bmi1*⁺ perdent l'accessibilité au niveau de ces régions pour se rapprocher du patron ATAC-seq des ISC *Lgr5*⁺ (Figure 30C). Ces résultats montrent que les précurseurs du lignage absorbant, de par leur profil d'accessibilité de la chromatine très similaire à celui des ISC, ont une chromatine déjà prête à la dédifférenciation, alors que les précurseurs du lignage sécrétoire nécessitent un remodelage de la chromatine. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que les précurseurs du lignage absorbant pourraient se dédifférencier plus

A



B

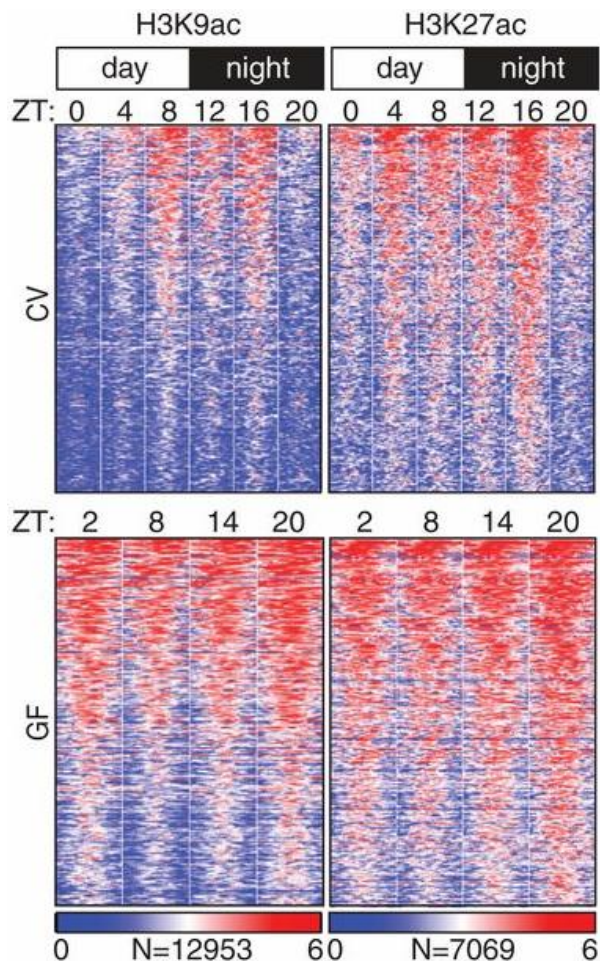


Figure 31 : Dynamique de la chromatine en présence ou absence du microbiote intestinal

A : Signaux de DHS-seq (DNase hypersensitivity) dans les cellules épithéliales provenant de l'iléon ou du côlon de souris colonisées (CR) ou non (GF) par le microbiote intestinal. Le panel du bas montre 2 exemples de DHS-seq similaires entre les conditions avec ou sans microbiote, alors que l'expression de ces 2 gènes est différente. D'après Camp et al., 2014. **B** : Signaux ChIP-seq de H3K9ac et H3K27ac dans les cellules épithéliales intestinales de souris avec (CV) ou sans (GF) microbiote intestinal. Ces signaux sont analysés à différents temps au cours d'un cycle circadien (ZT) de 12h de jours et 12h de nuit. D'après Kuang et al., 2019.

facilement que les précurseurs du lignage sécrétoire. La capacité de dédifférenciation des 2 types de précurseurs a déjà été montrée, mais la possibilité d'un type cellulaire préférentiel pour la dédifférenciation reste encore inconnue. Enfin, il a été aussi montré que PRC2, qui est essentiel à la mise en place de l'identité des progéniteurs, est indispensable à la dédifférenciation en cas de perte des ISC *Lgr5*⁺ (Chiacchiera et al., 2016). Toutes ces études montrent l'aspect très dynamique de la chromatine qui peut être remodelée en réponse à un stress environnemental, dans le but de conserver l'intégrité du tissu. Les acteurs chromatinien impliqués dans ces processus restent encore largement inconnus et leur caractérisation apparaît essentielle à la compréhension de ces mécanismes.

L'accessibilité de la chromatine (par DHS) en présence ou en absence du microbiote intestinal a été également étudié pour mieux comprendre le rôle de la chromatine dans la réponse de l'épithélium (Camp et al., 2014). Malgré une forte modification du transcriptome lors de l'ajout du microbiote, aucune différence majeure dans l'accessibilité à la chromatine n'a été observée (Figure 31A) ; le microbiote semble donc réguler la transcription sans remodeler l'accessibilité de la chromatine, ce qui suggère que la chromatine est permissive à ce changement. Comme cette étude a été faite avec le microbiote commensal, il serait intéressant d'analyser l'accessibilité de la chromatine en réponse à une colonisation par d'autres bactéries (pathogènes...). Une autre étude très récente, a montré, quant à elle, l'action du microbiote sur le transcriptome des cellules épithéliales intestinales via des modifications de la chromatine. Les auteurs ont montré que le microbiote est essentiel à la dynamique de l'acétylation des histones (H3K9ac et H3K27ac) lors du cycle circadien. En effet, une souris avec un microbiote conventionnel présente un pic d'acétylation de la chromatine entre la fin de la journée et le début de la nuit, et cette acétylation est fortement diminuée entre la fin de la nuit et le début de la journée (Figure 31B). En absence de microbiote cette dynamique est perdue avec le niveau d'acétylation qui reste fort et constant tout au long de la journée (Figure 31B). Cette dynamique d'acétylation, qui est fortement corrélée à la transcription, est contrôlée par le microbiote via HDAC3. En effet, HDAC3 est recruté aux promoteurs de ses gènes cibles de manière dynamique, selon le rythme circadien, et dépendante du microbiote. Grâce à ce mécanisme, le microbiote régule l'expression de gènes importants pour l'absorption des nutriments et notamment celle des lipides (Kuang et al., 2019).

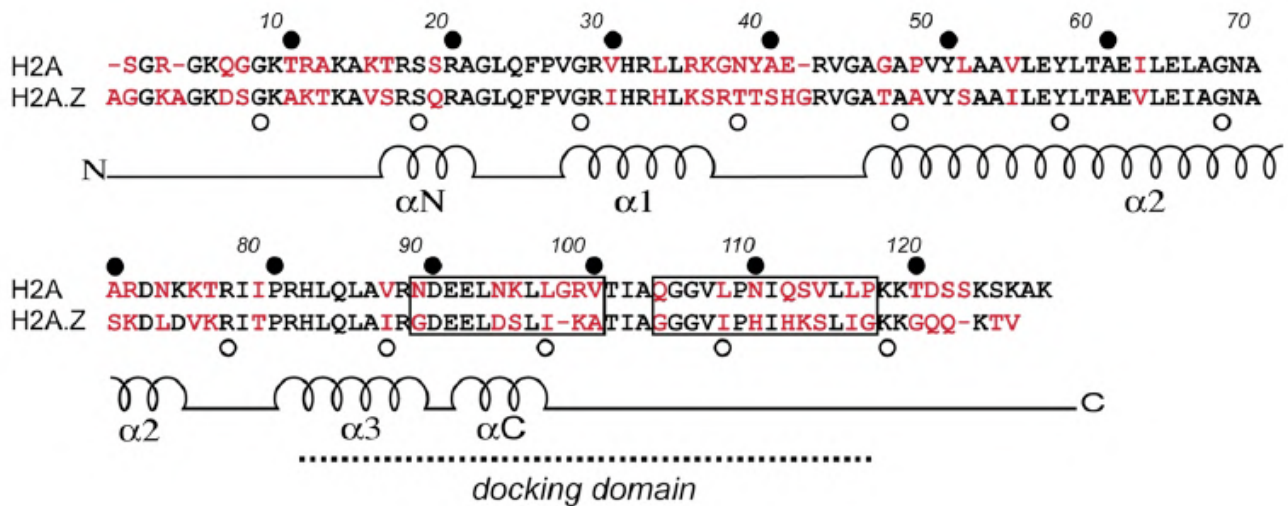


Figure 32 : Séquences protéiques de l'histone H2A et de son variant H2A.Z

Alignement des séquences protéiques de H2A et H2A.Z murins. Les différences entre les 2 séquences sont écrites en rouge. La structure secondaire est placée en dessous des séquences. D'après Suto et al., 2000.

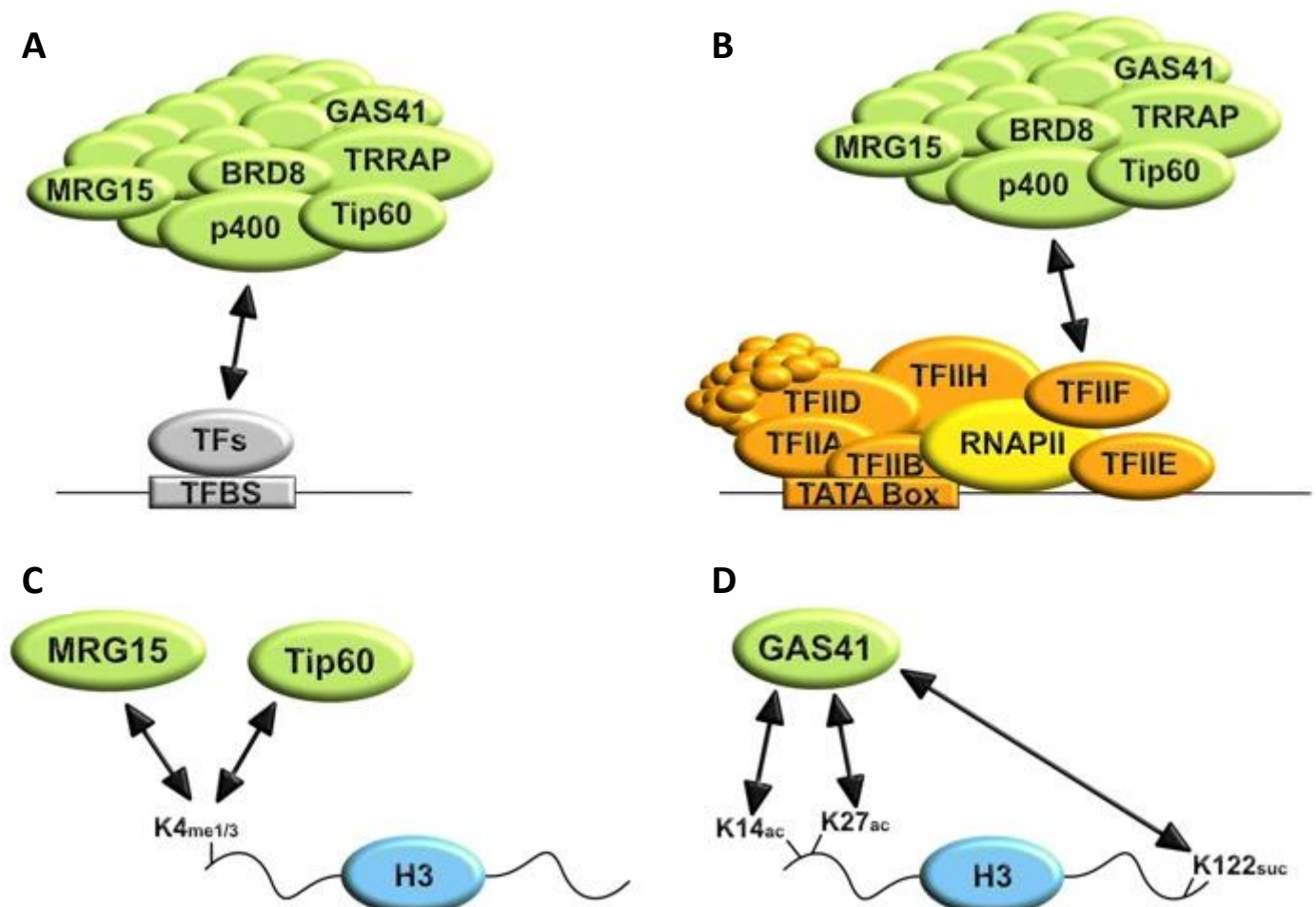


Figure 33 : Mécanismes de recrutement des complexes d'incorporation de H2A.Z

Les complexes d'incorporation de H2A.Z (ici p400) peuvent être recrutés via leur interaction avec des facteurs de transcription (A) ou avec une sous-unité du complexe de Pré-initiation de la transcription (PIC) (B). Le complexe p400 peut également être recruté grâce à certaines de ses sous-unités qui sont capables d'interagir avec des modifications post-traductionnelles des histones comme MRG15 et Tip60 (C) qui se lie à la méthylation de H3K4 ou encore à GAS41 (D) qui se lie à l'acétylation de H3K14 et de H3K27. D'après Giaimo et al., 2019.

Pour conclure, ces études ont montré l'aspect essentiel de la chromatine, qu'elle soit permissive ou qu'elle nécessite un remodelage, dans la plasticité cellulaire en réponse à des stress, des changements de lignage ou encore au microbiote intestinal.

3) Le variant d'histone H2A.Z

Comme démontré par l'étude de Kazakevych et ses collaborateurs la dynamique du variant d'histone H2A.Z au sein de l'épithélium intestinal suggère un rôle essentiel de ce variant dans le contrôle du programme transcriptionnel des cellules de cet épithélium (Kazakevych et al., 2017) (cf Figure 25A).

Les variants d'histones sont incorporés dans la chromatine de manière indépendante du cycle cellulaire, contrairement aux histones canoniques. H2A.Z est un des variants de l'histone canonique H2A, qui a été découvert en 1980 (West and Bonner, 1980) et qui partage 60% d'homologie de séquence avec elle (Jackson et al., 1996) (Figure 32). H2A.Z représente 10% de la quantité de H2A totale et est incorporé de manière spécifique et non aléatoire, principalement au niveau des régions régulatrices de la transcription (promoteurs et enhancers) mais également dans le corps des gènes (Lamaa et al., en révision, communication personnelle). Ceci suggère un rôle important dans la régulation de la transcription des gènes. Ce ciblage spécifique de H2A.Z est médié par le recrutement de ses incorporateurs (p400 et SRCAP) au niveau des régions spécifiques grâce à des facteurs de transcription, le complexe de pré-initiation de la transcription (PIC) ou encore par des modifications post-traductionnelle des histones (revue Giaimo et al., 2019) (Figure 33).

Ce variant est très conservé au cours de l'évolution (la séquence est similaire à 90% chez les mammifères), ce qui suggère un rôle clé dans la physiologie cellulaire. D'ailleurs sa délétion entraîne un fort ralentissement de la croissance chez la levure (Jackson and Gorovsky, 2000) et est létale chez de nombreuses espèces et types cellulaires (van Daal and Elgin, 1992; Faast et al., 2001), ce qui prouve le rôle essentiel de ce variant.

Chez les vertébrés, une seconde isoforme de H2A.Z a fait son apparition : H2A.Z2, par un processus phylogénétique contraint et non neutre, ce qui suggère un rôle essentiel de cette seconde isoforme dans des processus biologiques clés (Eirín-López et al., 2009). Les 2 isoformes sont codées par 2 gènes différents et leurs séquences peptidiques ne diffèrent

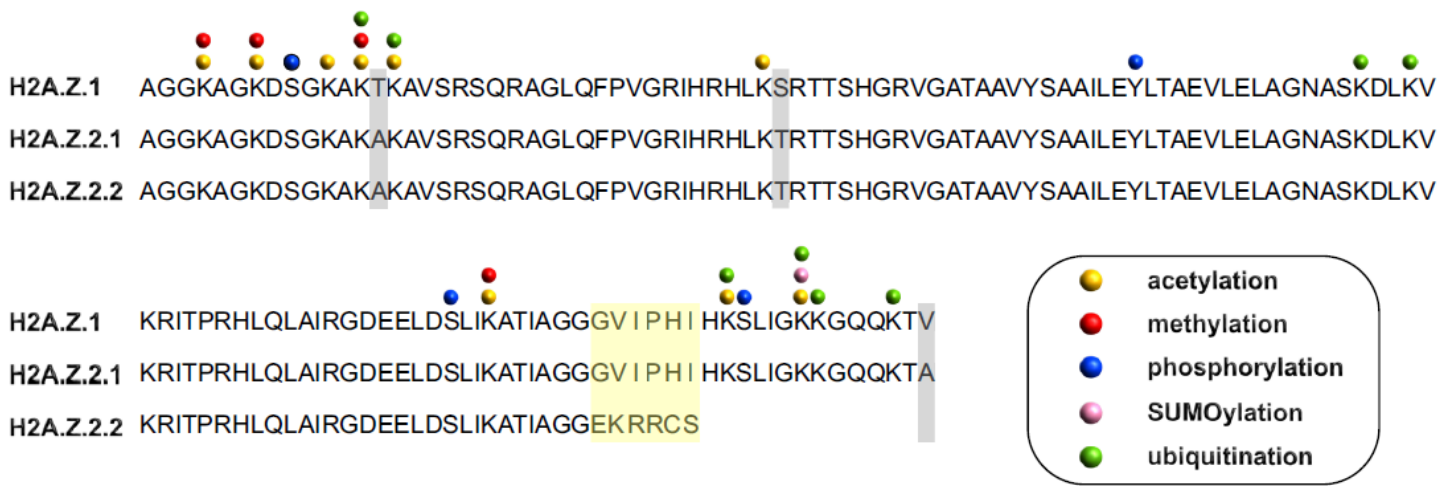


Figure 34 : Séquences protéiques des isoformes de H2A.Z

Alignement des séquences protéiques de H2A.Z1, H2A.Z2.1 et H2A.Z2.2. Les boîtes grises montrent les 3 acides aminés différents entre H2A.Z1 et H2A.Z2. La boîte jaune montre la différence de séquence entre H2A.Z2.2 et H2A.Z2.1. Les points montrent les sites modifiables post-traductionnellement. D'après Giaimo et al., 2019.

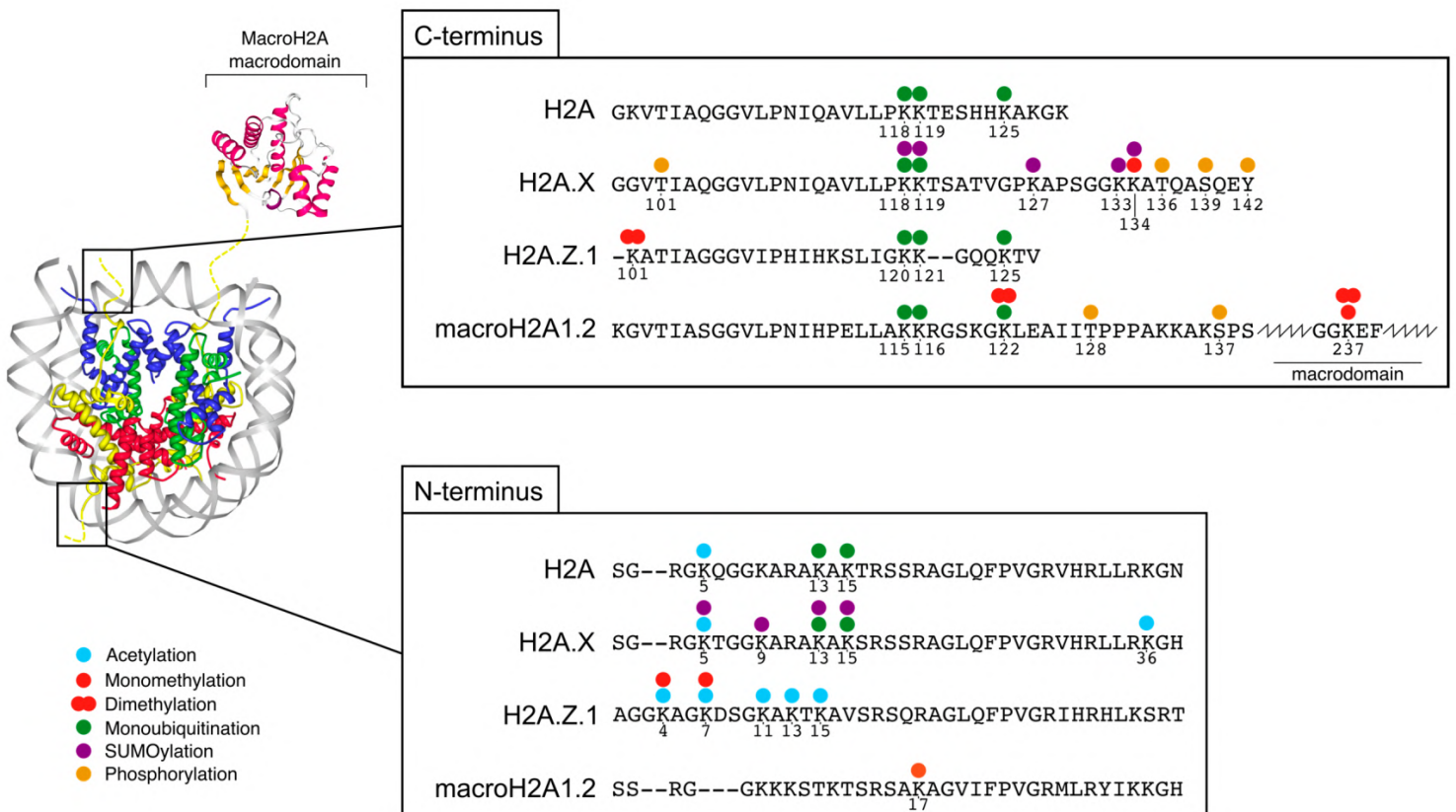


Figure 35 : Modifications post-traductionnelles de l'histone H2A et de ses variants

Séquences C-ter et N-ter de H2A, H2A.X, H2A.Z1 et macroH2A1.2 avec les modifications post-traductionnelles possibles. A noter la forte quantité de lysines acétylables au niveau de la queue N-ter de H2A.Z1 comparé à H2A. D'après Corujo and Buschbeck, 2018.

que par 3 acides aminés (Figure 34, cette faible différence empêche de distinguer les 2 isoformes par des méthodes basées sur la spécificité d'anticorps). Leur ratio d'expression diffère selon le type cellulaire et le stade de développement analysés (Dryhurst et al., 2009), suggérant des rôles spécifiques de l'une ou l'autre selon le tissu. Enfin, il existe un variant d'épissage de H2A.Z2 nommé H2A.Z2.2, spécifique des primates, qui est tronqué au niveau de sa partie carboxy-terminale (C-ter) (Figure 34) (Bönisch et al., 2012). Ceci présage d'un niveau supplémentaire de régulation des processus biologiques par les isoformes de H2A.Z.

La différence de séquence entre H2A.Z et H2A induit des différences de structure des nucléosomes contenant H2A.Z. La première différence se trouve au niveau du domaine « d'amarrage » de l'histone qui compte seulement 40% d'homologie entre H2A et H2A.Z. Cette différence de séquence entraîne la diminution de l'interaction du dimère H2A.Z-H2B avec le tétramère H3-H4 par la perte de 3 liaisons hydrogènes, par rapport au dimère H2A-H2B au sein du nucléosome. Ceci suggère une plus forte dynamique des nucléosomes contenant le dimère H2A.Z/H2B. Cette différence a également un effet sur l'interaction avec d'autres partenaires (comme l'histone H1) ainsi qu'avec la queue amino-terminale (N-ter) de l'histone H4 du nucléosome voisin. Ces modifications entraînent donc également une modification de l'interaction entre les nucléosomes, ce qui suggère que l'incorporation de H2A.Z/H2B influe sur la compaction de la chromatine. L'autre différence majeure se trouve au niveau de la boucle L1 qui est la région qui permet l'interaction entre les 2 dimères H2A-H2B ou H2A.Z-H2B au sein du nucléosome (Suto et al., 2000), ce qui suggère également un effet sur la dynamique du nucléosome contenant H2A.Z.

Les différences de séquences entre H2A et H2A.Z entraînent également une disparité au niveau des modifications post-traductionnelles de ces histones (revue (Corujo and Buschbeck, 2018), Figure 35). La principale différence entre les 2 est la présence d'une série de lysines acétylables en N-ter de H2A.Z. Ces modifications post-traductionnelles différentes entre le nucléosome contenant H2A et celui contenant H2A.Z peuvent avoir des conséquences sur la structure du nucléosome (Ishibashi et al., 2009), mais aussi permettre l'interaction avec de nouveaux partenaires (Draker et al., 2012).

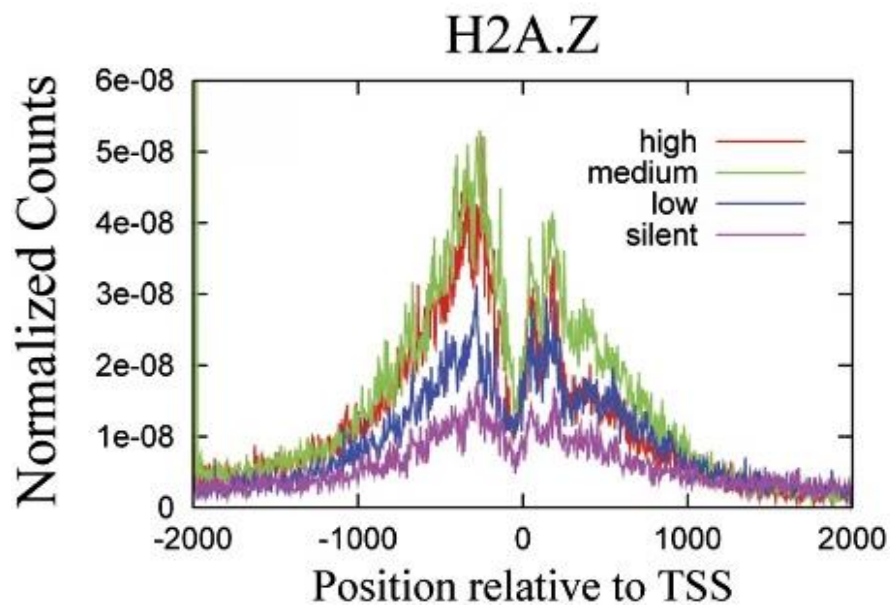


Figure 36 : L'incorporation de H2A.Z aux promoteurs est corrélée au niveau de transcription

Profil moyen de ChIP-seq H2A.Z autour du site de début de la transcription (TSS) selon le niveau d'expression des gènes répartis en 4 catégories. H2A.Z est plus fortement enrichi aux niveaux des promoteurs des gènes fortement et moyennement exprimés (courbes rouge et verte respectivement) qu'aux niveaux des promoteurs des gènes faiblement exprimés ou inactifs (courbes bleue et violette respectivement). D'après Barski et al., 2007.

a) Rôle de H2A.Z et de ses modifications post-traductionnelles dans la transcription

L'incorporation de H2A.Z au niveau des régions régulatrices de la transcription suggère un rôle de ce variant dans ce processus. En effet, H2A.Z est incorporé aux promoteurs des gènes dans les nucléosomes entourant le TSS (site de début de la transcription) de manière corrélée avec le niveau d'activation de la transcription (i.e. plus la transcription d'un gène est forte, plus H2A.Z est incorporé à son promoteur, en moyenne) (Barski et al., 2007) (Figure 36). De plus, étant donné sa structure (Suto et al., 2000), l'effet attendu de l'incorporation de H2A.Z sur la dynamique du nucléosome, associé à l'effet de frein du nucléosome sur le déroulement de la transcription (Lorch et al., 1987), renforce l'hypothèse d'un rôle de H2A.Z dans ce processus biologique.

De nombreux travaux ont étudié l'effet de l'incorporation de H2A.Z sur la dynamique et la stabilité du nucléosome. Les études *in vitro* ont donné des résultats contradictoires, certaines montrant une déstabilisation du nucléosome contenant H2A.Z (Horikoshi et al., 2013, 2019; Zhang et al., 2005) et d'autres montrant au contraire une stabilisation du nucléosome H2A.Z⁺ (Ishibashi et al., 2009; Park et al., 2004). Ces résultats contradictoires semblent pouvoir être expliqués par les différences de purification des nucléosomes (à partir de bactéries ou à partir de cellules humaines) ainsi que par les tests effectués (sensibilité à la concentration de NaCl ou sensibilité à la température). De plus, il a été montré, *in vitro*, que l'acétylation de H2A.Z semble essentielle à la déstabilisation du nucléosome par rapport au nucléosome contenant du H2A.Z non acétylé (Ishibashi et al., 2009). Cette déstabilisation est importante car elle permet d'augmenter la dynamique du nucléosome et donc l'ouverture locale de la chromatine pour faciliter le recrutement de l'ARN PolII et l'initiation de la transcription (Lorch et al., 1987). Les études *in cellulo*, donc avec les modifications post-traductionnelles, montrent que H2A.Z est plus rapidement échangé que H2A dans des analyses de retour de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP) (Horikoshi et al., 2013, 2019). Toutes ces études suggèrent que les modifications post-traductionnelles de H2A.Z sont fondamentales pour la stabilité et la dynamique du nucléosome, et donc potentiellement pour la régulation de la transcription.

Historiquement, H2A.Z a été décrit comme important pour la transcription, en permettant le recrutement de l'ARN polymérase II (ARN PolII) aux promoteurs des gènes chez la levure (Adam et al., 2001) et chez l'homme (Hardy et al., 2009). L'hypothèse était que

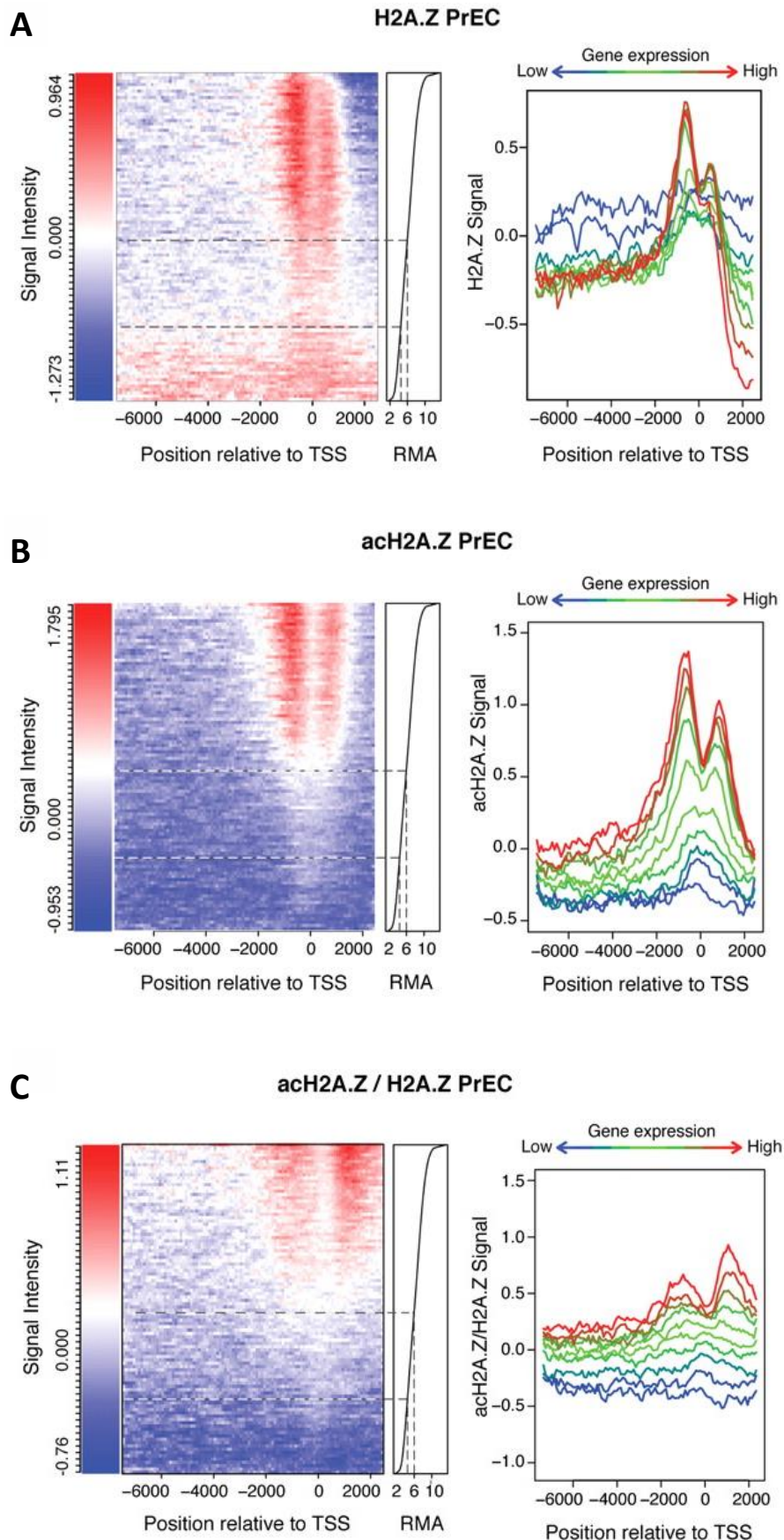


Figure 37 : H2A.Z acétylé est présent aux promoteurs des gènes exprimés dans les cellules PrEC

Signaux ChIP-seq de H2A.Z (A), H2A.Zac (B) et H2A.Zac/H2A.Z (C) autour du site de début de la transcription (TSS) dans les cellules PrEC. Sur les panels de gauche les promoteurs sont classés de haut en bas du gène le plus exprimé au moins exprimé. Les panels de droite montrent la moyenne des signaux selon le niveau d'expression des gènes. La proportion d'acétylation de H2A.Z est plus forte aux niveaux des promoteurs des gènes fortement exprimés alors que cette modification est absente des promoteurs des gènes inactifs. D'après Valdés-Mora et al., 2012.

l'incorporation de H2A.Z aux nucléosomes proches du TSS (site de début de la transcription) « fragilise » ces nucléosomes, en déstabilisant les interactions entre ses constituants, qui sont alors plus facilement enlevés pour permettre la transcription par l'ARN PolIII (Zhang et al., 2005). Depuis, de nombreux travaux ont étudié le rôle de H2A.Z dans la transcription et ont montré des effets différents selon le contexte. Par exemple, H2A.Z est requis pour l'expression des gènes cibles du récepteur aux œstrogènes (ER) dans les cellules MCF7. Ainsi, l'incorporation de H2A.Z est essentielle pour le remodelage de la chromatine au promoteur du gène TFF1 et pour son expression en réponse à la signalisation ER (Gévry et al., 2009). Mais H2A.Z peut également avoir des effets négatifs sur la transcription : par exemple, H2A.Z inhibe la sénescence en réprimant l'expression du gène p21. En effet, l'incorporation de H2A.Z au promoteur de ce gène inhibe la fixation du facteur de transcription p53 et l'expression de p21 (Gévry et al., 2007).

Les études qui ont analysé les conséquences de la déplétion de H2A.Z sur l'expression génique à grande échelle ont également identifié les deux types d'effets (Dunn et al., 2017; Giaimo et al., 2018; Greenberg et al., 2019; Vardabasso et al., 2015) (Figure 43). Ces différences d'impact sur la transcription peuvent être expliquées, comme pour l'effet de H2A.Z sur la stabilité du nucléosome, par des modifications post-traductionnelles de H2A.Z différentes selon le contexte (Subramanian et al., 2015). Par exemple, l'acétylation de H2A.Z aux promoteurs des gènes est fortement corrélée à l'état actif de la transcription. Dans des cellules normales ou de cancer de la prostate, H2A.Z acétylé est présent seulement aux promoteurs de gènes actifs, alors que H2A.Z non acétylé est présent également aux promoteurs des gènes non exprimés (Figure 37). De plus les auteurs ont montré que le changement de transcriptome des cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales est fortement corrélé avec la distribution de l'acétylation de H2A.Z (i.e. Les gènes fortement sous-exprimés dans les cellules cancéreuses perdent l'acétylation de H2A.Z au niveau de leurs promoteurs, alors que c'est l'inverse pour les gènes fortement sur-exprimés) (Valdés-Mora et al., 2012). En plus de cette analyse corrélative, des analyses fonctionnelles ont également mis en lumière l'importance du statut d'acétylation de H2A.Z dans les régulations transcriptionnelles. Par exemple, l'éviction de H2A.Z non acétylé est primordiale à l'induction de l'expression du gène Cycline D1 en réponse à la signalisation ER. En effet, ceci

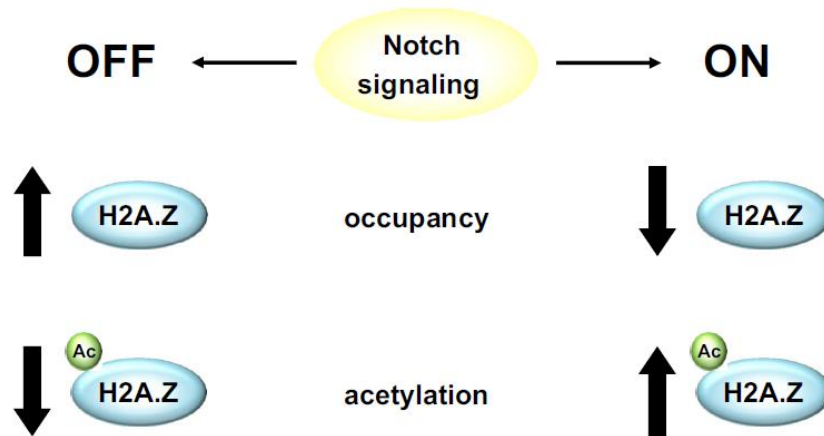


Figure 38 : Modèle de dynamique de H2A.Z et de son acétylation en réponse à la voie Notch

Dans les cellules T-matures, en absence de signalisation Notch la présence de H2A.Z augmente aux niveaux des régions régulatrices des gènes cibles de Notch, alors que son acétylation est faible. Lors de l'activation de Notch la présence de H2A.Z diminue et son acétylation augmente, ce qui favorise l'expression de ces gènes. D'après Giaimo et al., 2018.

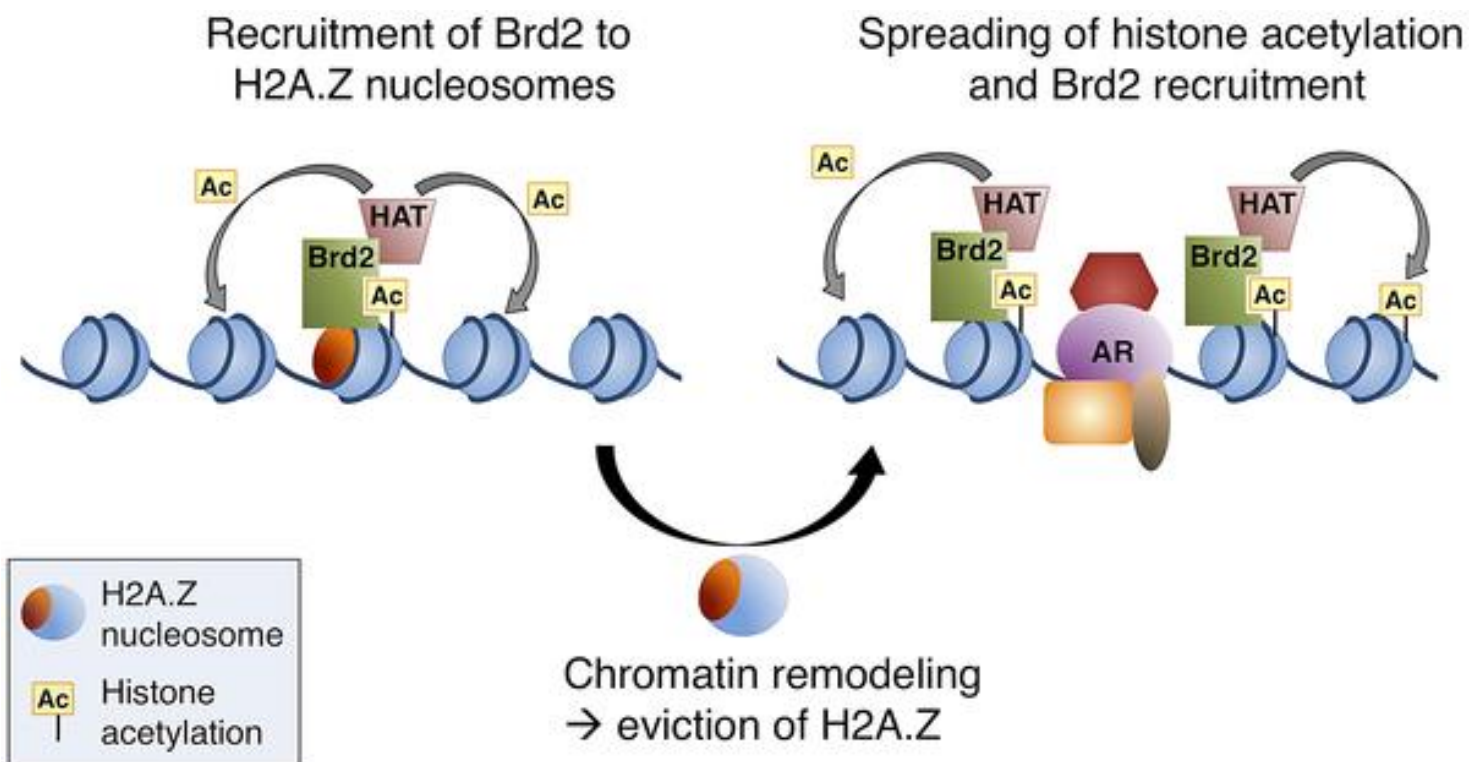


Figure 39 : Modèle de recrutement de BRD2 au niveau des gènes régulés par le récepteur aux androgènes

Après la stimulation par les androgènes, BRD2 est recruté au niveau des nucléosomes contenant H2A.Z et H4 acétylés. L'association de HAT avec BRD2 permet l'acétylation des nucléosomes voisins et donc le recrutement d'autres complexes BRD2-HAT. Le recrutement d'un complexe de remodelage de la chromatine entraîne l'éviction du nucléosome contenant H2A.Z, ce qui permet la liaison du récepteur aux androgènes et l'expression des gènes cibles. D'après Draker et al., 2012.

permet l'augmentation de la quantité de H2A.Z acétylé au promoteur de ce gène par rapport à la quantité totale de H2A.Z, ce qui favorise la transcription (Dalvai et al., 2013).

Cette modification post-traductionnelle de H2A.Z peut être mise en place en réponse à une signalisation cellulaire. C'est le cas de la voie Notch dont l'activation induit la liaison du facteur de transcription RBP-J aux promoteurs de ses gènes cibles, ce qui permet le recrutement du complexe Tip60 dans les cellules T matures et l'acétylation de H2A.Z. Ceci a pour conséquence la déstabilisation des nucléosomes aux promoteurs et l'expression de ses gènes cibles (Giaimo et al., 2018) (Figure 38).

Une autre modification de H2A.Z régule sa dynamique et la transcription : l'ubiquitination sur sa queue C-ter, qui est mise en place par le complexe PRC1 et enlevée par la protéine USP10. Ainsi, l'augmentation de l'expression des cibles du récepteur aux androgènes (AR), en réponse à l'induction de cette voie de signalisation, nécessite la déubiquitination de H2A.Z par USP10. Ceci entraîne la diminution de la présence de H2A.Z sur les promoteurs et les enhancers des gènes cibles de AR, et favorise leur expression (Draker et al., 2011). Dans ce contexte de réponse à la signalisation AR, les nucléosomes contenant H2A.Z acétylé et H4 acétylé permettent également le recrutement du cofacteur Brd2. Brd2 permet de recruter des complexes de modification de la chromatine, ce qui entraîne l'éviction de H2A.Z et l'expression des gènes (Draker et al., 2012) (Figure 39).

Enfin, la prise en compte du contexte chromatinien est également essentielle à la compréhension du rôle de H2A.Z dans la transcription. En effet, il a été montré que les nucléosomes contenant les 2 variants H2A.Z et H3.3 sont très labiles, et peuvent donc être facilement enlevés pour permettre la transcription. La localisation à des régions spécifiques des nucléosomes avec les 2 variants, ou avec H2A.Z seul, peut gouverner la mise en place de la transcription (Jin et al., 2009). Ces études montrent que H2A.Z peut avoir des effets différents sur la transcription, de manière dépendante de ses modifications post-traductionnelles et du contexte chromatinien. Ce rôle majeur de H2A.Z sur la régulation transcriptionnelle laisse présager d'un rôle essentiel de ce variant d'histone dans le contrôle de l'identité cellulaire.

H2A.Z.1 BALANCES BIVALENT GENE CONTROL

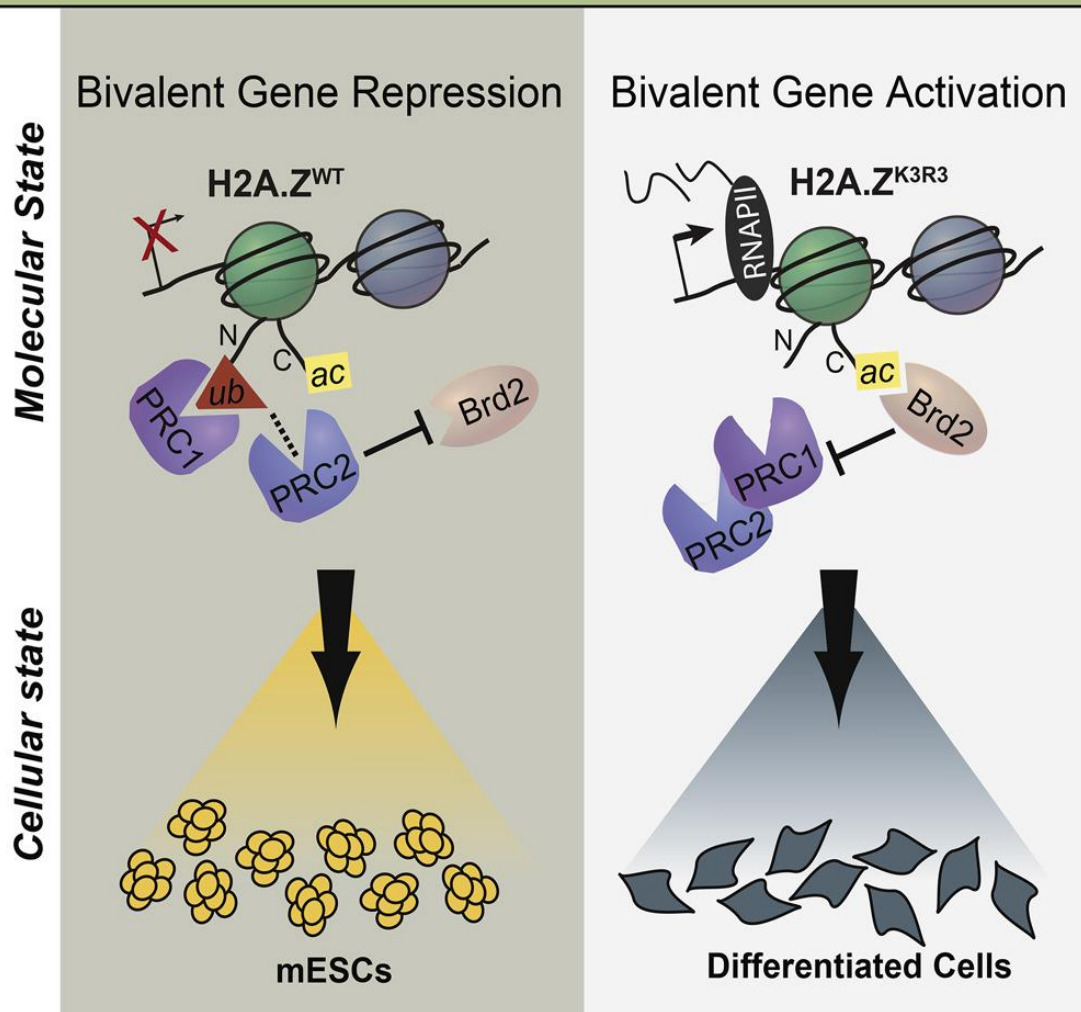


Figure 40 : Modèle du rôle de H2A.Z dans le maintien et la différenciation des cellules ES

Dans les cellules ES, l'ubiquitination de H2A.Z permet le recrutement du complexe PRC2 aux niveaux des promoteurs des gènes devant être réprimés. PRC2 peut alors déposer la marque répressive H3K27me3 au niveau de ces promoteurs. Durant la différenciation de ces cellules, H2A.Z est déubiquitiné, son acétylation permet donc le recrutement du cofacteur BRD2 qui inhibe alors le recrutement de PRC2 et permet donc l'activation de l'expression de ces gènes. D'après Surface et al., 2016.

b) Dynamique d'enrichissement en H2A.Z et devenir cellulaire

Le rôle de H2A.Z dans le devenir cellulaire a notamment été étudié dans les cellules ES. Par exemple, H2A.Z est essentiel au maintien de leur identité ainsi qu'à l'engagement dans un lignage cellulaire, en permettant la mise en place de programmes transcriptionnels spécifiques (Creyghton et al., 2008; Hu et al., 2013; Li et al., 2012; Subramanian et al., 2013; Surface et al., 2016). H2A.Z est présent aux promoteurs actifs (i.e. présence de H3K4me3), aux promoteurs bivalents (i.e. présence de H3K4me3 et H3K27me3) et aussi aux enhancers dans les ESC.

Le variant d'histone H2A.Z permet le maintien de l'identité des ESC murines en favorisant l'expression de plusieurs gènes important pour la pluripotence (*Sox2*, *Klf4*...) via le recrutement du facteur de transcription OCT4 aux promoteurs de ces gènes (Hu et al., 2013). Son deuxième rôle dans le maintien de l'identité des ESC est sa participation à la répression des gènes bivalents. H2A.Z est présent au niveau de la majorité des promoteurs de ces gènes (90%), et permet leur répression en recrutant le complexe PRC2 qui dépose alors la marque répressive H3K27me3 et inhibe la fixation du cofacteur de transcription BRD2 (Creyghton et al., 2008). De plus, cet effet répresseur de H2A.Z au niveau des gènes bivalents est dû à son ubiquitination en C-ter (Surface et al., 2016) (Figure 40).

H2A.Z est également important pour la différenciation de ces ESC murines, puisque la déplétion de H2A.Z entraîne une désorganisation du programme transcriptionnel de plusieurs lignages lors de la différenciation (Hu et al., 2013). La perte de H2A.Z entraîne notamment un développement anormal des « corps embryonnaires » en culture cellulaire, qui sont un modèle de gastrulation et de mise en place des feuillets embryonnaires. De plus, les marqueurs précoces de la différenciation (*Brachyury*, *Pax3*...) sont moins exprimés lors de la déplétion de H2A.Z (Creyghton et al., 2008; Hu et al., 2013; Subramanian et al., 2013). L'engagement dans le lignage endoderme/hépatique requiert également H2A.Z, puisqu'il est essentiel au recrutement du facteur de transcription clé de ce lignage : FOXA2. FOXA2 et H2A.Z recrutent ensuite des complexes de modifications de la chromatine (SWI/SNF et Tip60) pour permettre la déplétion des nucléosomes et l'expression des gènes (Li et al., 2012). Enfin H2A.Z est aussi indispensable à la différenciation des précurseurs neuronaux ou encore du lignage hématopoïétique (Creyghton et al., 2008). Toutes ces études montrent le rôle fondamental de H2A.Z, sa dynamique, ses modifications post-traductionnelles et son

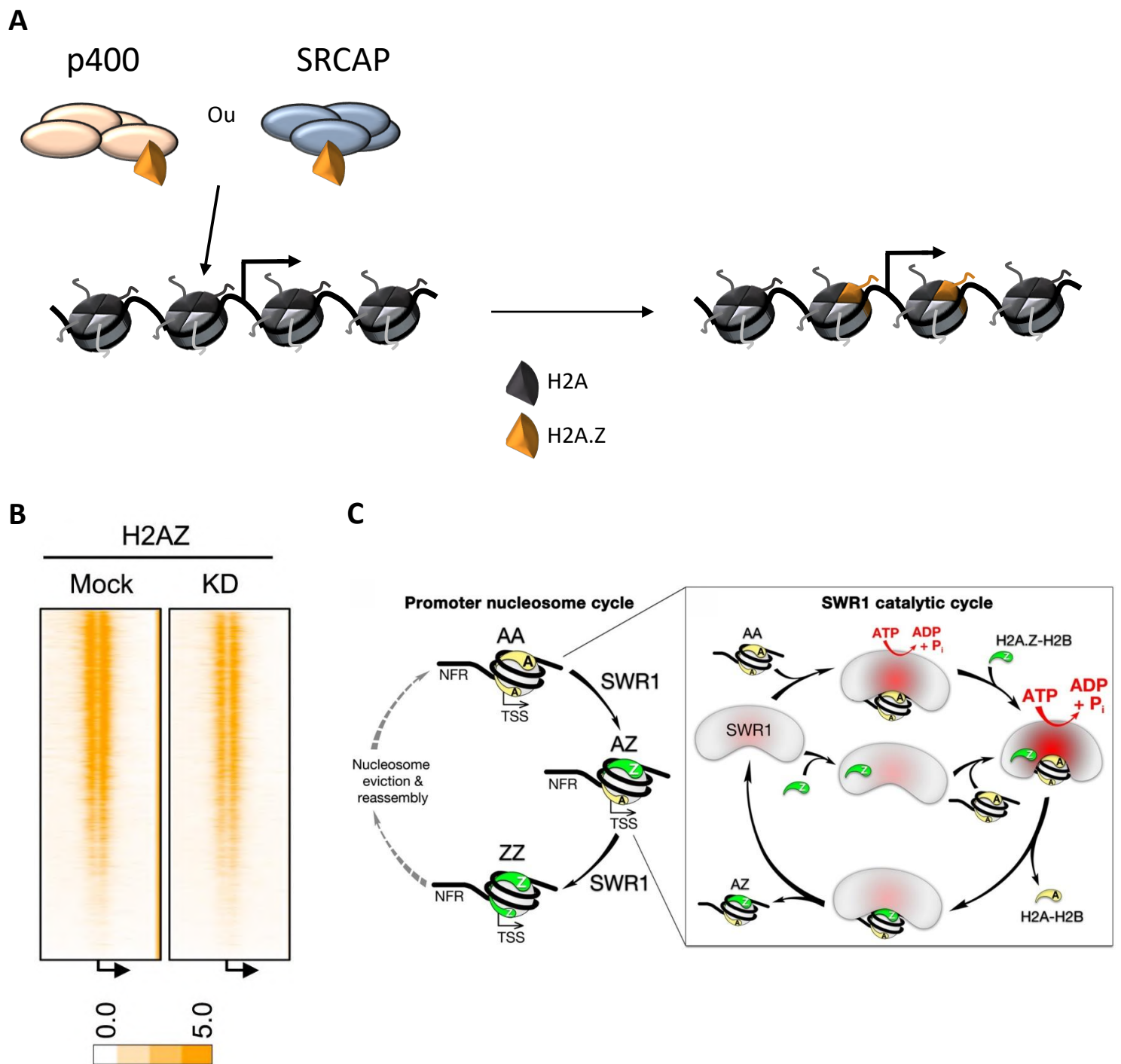


Figure 41 : Mécanisme d'incorporation de H2A.Z

A : Schéma représentant l'incorporation du dimère H2A.Z-H2B par les complexes SRCAP ou p400 au niveau des nucléosomes entourant le TSS des gènes. **B** : Signaux ChIP-seq de H2A.Z dans les régions de 3 kb autour des TSS dans des cellules U2OS déplétées (KD) ou non (Mock) de p400, montrant la diminution du signal après la déplétion de l'incorporeur de H2A.Z. D'après Pradhan et al., 2016. **C** : Modèle d'incorporation de H2A.Z par le complexe SWR1 *in vitro*. En présence d'ATP et du dimère H2A.Z-H2B, l'ATPase du complexe SWR1 enlève le dimère H2A-H2B de la chromatine qui est alors remplacé par H2A.Z-H2B. Ceci entraîne donc l'apparition d'un nucléosome, appelé hétérotypique, contenant un dimère H2A-H2B et un dimère H2A.Z-H2B. Ce nucléosome est donc le substrat d'une deuxième réaction d'échange pour avoir un nucléosome, appelé homotypique, contenant 2 dimères H2A.Z-H2B. D'après Luk et al., 2010.

interaction avec des partenaires spécifiques dans la mise en place des programmes transcriptionnels spécifiques de chaque type cellulaire lors du développement embryonnaire. Ces études montrent, de plus, toutes les possibilités de contrôle de la transcription par H2A.Z, et suggèrent qu'il pourrait avoir un rôle aussi important dans la régulation de l'identité des cellules adultes.

c) Dynamique d'incorporation de H2A.Z

La dynamique de H2A.Z a un rôle fondamental dans la régulation des processus biologiques. Sa régulation par les complexes d'incorporation et d'éviction est donc essentielle au bon déroulement de ces processus.

La première démonstration de l'incorporation de H2A.Z (Htz1) à la place de H2A a été faite chez la levure en 2004 (Mizuguchi et al., 2004). Les auteurs ont montré le rôle du complexe de remodelage ATP-dépendant SWR1, qui est capable *in vitro*, en présence d'ATP, d'échanger le dimère H2A-H2B par le dimère H2A.Z-H2B, mais pas l'inverse. Chez les mammifères, il existe 2 complexes homologues à SWR1 : p400 et SRCAP. Il a été également montré *in vitro* que ces 2 complexes sont capables d'incorporer le dimère H2A.Z-H2B de manière dépendante de l'ATP (Pradhan et al., 2016; Ruhl et al., 2006) (Figure 41A). *In cellulo*, que ce soit chez la levure ou dans des cellules humaines, la déplétion de ces complexes entraîne la diminution de la quantité de H2A.Z incorporé à la chromatine, confirmant ainsi leurs rôles dans ce processus (Gévry et al., 2007; Mizuguchi et al., 2004; Pradhan et al., 2016; Wong et al., 2007) (Figure 41B). L'analyse de l'expression des gènes, après la déplétion de SWR1 ou celle de H2A.Z chez la levure, montre un chevauchement de 40% des gènes dérégulés dans ces 2 cas. Ce chevauchement prouve le fort lien entre ce complexe de remodelage et H2A.Z, mais laisse également présager des rôles indépendants de ces 2 acteurs chromatinien (Mizuguchi et al., 2004).

Le mécanisme moléculaire de l'incorporation du dimère H2A.Z-H2B a été étudié en analysant la cinétique *in vitro* de ce processus. Les auteurs ont montré que le complexe SWR1, en présence d'ATP et de dimères H2A.Z-H2B, enlève un dimère H2A-H2B, grâce à la sous-unité ATPase du complexe, et le remplace alors par le dimère H2A.Z-H2B. Ceci entraîne l'apparition d'un nucléosome hétérotypique (i.e. contenant un dimère H2A-H2B et un

dimère H2A.Z-H2B) qui est donc la cible d'une deuxième réaction d'échange par SWR1, pour avoir un nucléosome homotypique (i.e. contenant 2 dimères H2A.Z-H2B) (Luk et al., 2010) (Figure 41C).

L'incorporation de ce variant au sein de la chromatine nécessite également la présence des chaperonnes d'histones. En effet, la fraction non incorporée de H2A.Z est faiblement liée au complexe SWR1 (Luk et al., 2007). Cette fraction est, par contre, fortement liée aux 2 chaperonnes d'histones Nap1 et Chz1 chez la levure. Nap1 est une chaperonne d'histone qui interagit avec les dimères H2A-H2B et H2A.Z-H2B de manière équivalente, alors que Chz1 interagit plus avec le dimère H2A.Z-H2B (Luk et al., 2007; Mizuguchi et al., 2004). Chez l'homme, la protéine YL1, qui fait partie des complexes SRCAP et p400, assure le rôle de chaperonne de H2A.Z et participe à son incorporation dans la chromatine (Latrick et al., 2016). Ces travaux montrent l'importance de la coopération de plusieurs protéines pour l'incorporation du variant H2A.Z dans la chromatine.

Enfin, H2A.Z est incorporé au niveau de régions génomiques précises, ce qui pose la question des mécanismes qui permettent le ciblage spécifique des complexes de remodelage à la chromatine. Le premier mécanisme possible est le recrutement de ces complexes par des facteurs de transcription. Par exemple, dans un modèle cellulaire humain, SRCAP interagit avec le récepteur aux androgènes (AR) pour faciliter la transcription de ses cibles (Slupianek et al., 2010) (cf Figure 33A). Le complexe p400/Tip60 peut être, quant à lui, recruté par le facteur de transcription de la voie Notch : RBPJ, comme décrit précédemment (Giaimo et al., 2018) (voir Figure 33A). Le paysage chromatinien peut lui aussi avoir un rôle prépondérant pour la localisation de l'incorporation de H2A.Z par les complexes de remodelage, grâce à des sous-unités capables de reconnaître et d'interagir avec les différentes marques chromatinienne. La sous-unité Bdf1, grâce à son bromodomaine, est capable de reconnaître l'acétylation de H2A et H4 pour permettre le recrutement du complexe p400 et l'incorporation de H2A.Z chez la levure et chez l'homme (Altaf et al., 2010; Pradhan et al., 2016). La sous-unité GAS41 (Yaf9 chez la levure), qui est présente dans les complexes SRCAP et p400 (et SWR1 chez la levure), est également capable de reconnaître et de se fixer à l'acétylation de H3K27 pour permettre l'incorporation de H2A.Z dans ces 2 organismes (cf Figure 33D). La déplétion de cette sous-unité ou la mutation de son domaine YEATS (qui

permet la fixation à H3K27Ac) entraînent une diminution de l'incorporation de H2A.Z (Hsu et al., 2018; Klein et al., 2018).

Le variant H2A.Z peut également être enlevé de la chromatine par des mécanismes actifs. Il a été montré récemment que la chaperonne d'histone ANP32E est capable d'enlever spécifiquement H2A.Z de la chromatine *in vitro* et *in cellulo* (cellules murines). La fixation de ANP32E à H2A.Z engendre un changement de conformation de ce dernier qui a pour conséquence une diminution de l'interaction avec le tétramère H3/H4. La déplétion de ANP32E, *in cellulo*, entraîne l'apparition de plus de 4000 nouveaux sites de présence de H2A.Z (siCtl : 23000 sites, siAnp32e : 27000 sites) et augmente de 20% la quantité moyenne de H2A.Z aux promoteurs (Obri et al., 2014). Ceci suggère que ANP32E est essentielle pour contrôler le niveau moyen de H2A.Z, mais aussi pour éviter son incorporation sur certaines régions. Enfin, il a été montré que le complexe de remodelage de la chromatine INO80 est capable d'enlever H2A.Z de la chromatine *in vitro* et chez la levure. En absence de ce complexe, H2A.Z est mal localisé avec notamment une augmentation de sa quantité dans le corps des gènes (Papamichos-Chronakis et al., 2011).

Toutes ces études montrent toutes la complexité de la régulation de la dynamique de H2A.Z au sein de la chromatine, qui laisse entrevoir un grand nombre de possibilités dans le but de réguler des processus biologiques majeurs.

d) Différences ou redondances fonctionnelles entre les isoformes de H2A.Z

La grande similarité de séquence entre H2A.Z1 et H2A.Z2 (3 acides aminés différents) suggère des rôles redondants de ces 2 isoformes. Pourtant, l'apparition phylogénétique contrainte de H2A.Z2 évoque le contraire.

La substitution d'une Thréonine pour H2A.Z1 par une Alanine pour H2A.Z2 survient au niveau de la queue N-ter en position 14 (T14A, cf Figure 34). Or le changement d'un acide aminé phosphorylable par un non phosphorylable pourrait avoir un effet sur la régulation des processus par H2A.Z, notamment aux vues des effets primordiaux des modifications post-traductionnelles de H2A.Z sur son rôle dans la transcription. Ce changement dans une zone fortement acétylable (K4, K7, K11, K13, K15) et essentielle pour la régulation de la transcription (cf rôle de l'acétylation de H2A.Z sur la transcription), pourrait avoir également

un impact sur la mise en place de ces marques (i.e. interaction ou exclusivité des marques) et donc, sur cette régulation.

La seconde substitution (T38S, cf Figure 34) intervient au niveau de la boucle L1 (importante pour l'interaction à l'intérieur du nucléosome) qui est donc légèrement différente entre H2A.Z1 et H2A.Z2, ce qui a pour conséquence, au moins en partie, d'induire une différence de vitesse d'échange de H2A.Z2 par rapport à H2A.Z1 dans les cellules Hela (Horikoshi et al., 2013). Ceci suggère que l'incorporation de l'une ou l'autre des isoformes pourrait avoir des effets différents sur la dynamique du nucléosome et donc sur la régulation des processus biologiques.

Enfin la dernière substitution (V127A) survient en dernière position dans la partie C-ter de la protéine (cf Figure 34). Ceci pourrait avoir un effet sur la stabilité du nucléosome puisqu'il a été montré que cette partie de la protéine est essentielle pour le maintien de celle-ci dans la chromatine (Wratting et al., 2012). Cette substitution survient aussi proche des lysines ubiquitinylées de H2A.Z qui sont importantes pour son rôle sur la transcription (i.e. rôle négatif de l'ubiquitination de H2A.Z sur la transcription). Cette substitution pourrait donc avoir un rôle sur le dépôt de ces modifications et donc sur la régulation des processus biologiques spécifique de chaque isoforme.

Pour finir, l'incorporation du variant d'épissage H2A.Z2.2, tronqué en C-ter (cf Figure 34), entraîne une forte déstabilisation du nucléosome à cause de la diminution de l'interaction avec le tétramère H3-H4 (Bönisch et al., 2012).

Tous ces changements confèrent donc à chaque isoforme des propriétés physiques et dynamiques différentes. L'analyse spécifique de chaque isoforme dans la régulation des processus biologiques apparaît donc essentielle pour mieux comprendre le rôle de H2A.Z et de sa dynamique dans la régulation de ces processus.

Quelques études ont montré des rôles spécifiques à chaque isoforme. Par exemple, le KO du gène codant pour H2A.Z1 (*H2afz*) est létal à l'état embryonnaire, avec une perte des embryons viables entre les jours 4.5 et 7.5 après l'accouplement (Faast et al., 2001). Ceci montre que H2A.Z1 est essentiel au développement embryonnaire de la souris mais aussi que, dans ce cas-là, H2A.Z2 est incapable de compenser cette perte. Ceci peut être expliqué par un effet spécifique de H2A.Z1 sur le développement ou par une trop grande différence

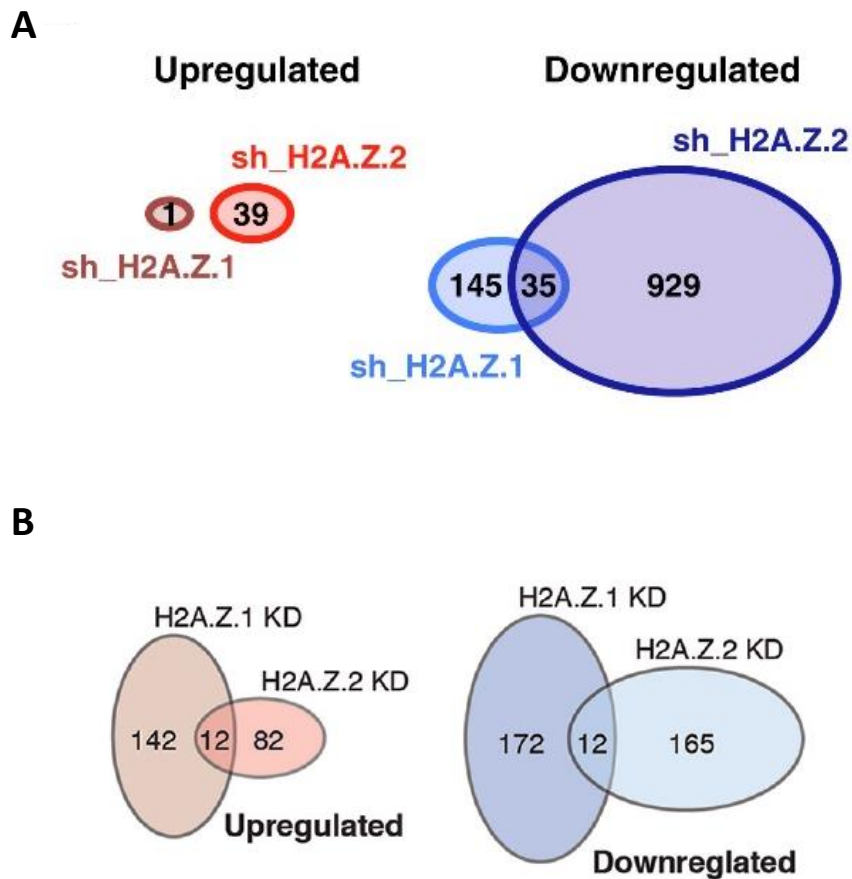


Figure 43 : Les 2 isoformes de H2A.Z régulent l'expression de groupes de gènes différents

Diagrammes de Venn montrant le nombre de gènes qui sont significativement sur- ou sous-exprimés après déplétion de H2A.Z.1 et H2A.Z.2 dans les cellules de mélanome (SK-mel147) (A) et dans les neurones corticaux (B). A noter le faible nombre de gènes dérégulés dans les 2 déplétions. D'après Vardabasso et al., 2015 et Dunn et al., 2017.

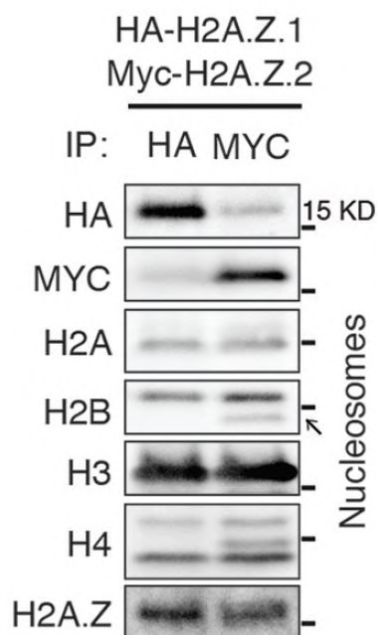


Figure 44 : Les isoformes de H2A.Z interagissent avec une forme différente de H2B dans les neurones

Western-Blot après co-immunoprécipitation de H2A.Z.1-HA ou H2A.Z.2-MYC sur une préparation de mononucléosomes provenant de neurones. La flèche indique la forme de H2B retrouvée uniquement lors de l'immunoprécipitation de H2A.Z.2. D'après Dunn et al., 2017.

d'expression des 2 isoformes dans l'embryon. En effet si H2A.Z2 est peu ou pas exprimé à ce moment du développement, cela peut expliquer la non compensation. La forte différence d'expression de H2A.Z1 et H2A.Z2 dans les cellules ES (H2A.Z1 20 fois plus exprimé que H2A.Z2 (Subramanian et al., 2013; Surface et al., 2016) tend à corroborer la deuxième hypothèse.

Vardabasso et ses collaborateurs ont montré, en 2015, un rôle spécifique de H2A.Z2 dans le contrôle de la prolifération des mélanomes. Ils ont montré que *H2AFZ* (H2A.Z1) et *H2AFV* (H2A.Z2) sont surexprimés dans les tissus de patients atteints de mélanome ainsi que dans les modèles cellulaires de ce mélanome. Cependant seule la déplétion de H2A.Z2 inhibe la prolifération de ces cellules en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. De plus, la déplétion de H2A.Z2 entraîne la dérégulation de l'expression d'un plus grand nombre de gènes que celle de H2A.Z1 (1000 versus 200) alors que *H2afv* (H2A.Z2) est 10 fois moins exprimé que *H2afz* (H2A.Z1) dans ces cellules (Figure 43A). Enfin, ils ont montré que H2A.Z2 permet le recrutement et/ou le maintien du facteur de transcription E2F1 et du cofacteur BRD2 aux promoteurs de leurs cibles (Vardabasso et al., 2015). Cette étude montre donc le rôle spécifique de H2A.Z2 sur le transcriptome et la prolifération des cellules de mélanome.

De même, une étude dans les neurones corticaux de rats a montré des effets spécifiques de chaque isoforme. La déplétion de H2A.Z1 ou de H2A.Z2 entraîne la dérégulation de l'expression de 338 et 271 gènes, respectivement. Sur ces 600 gènes dérégulés, seulement 24 voient leurs expressions dérégulées de la même manière par la déplétion des 2 isoformes (Figure 43B). En analysant plus précisément l'expression d'un gène induit par l'activité neuronale, les auteurs ont observé que son expression est diminuée seulement lors de la déplétion de H2A.Z2. Cette régulation spécifique est médiée par le recrutement de l'ARN PolII au niveau de ce promoteur seulement par H2A.Z2. Il a également été montré dans cette étude que H2A.Z1 et H2A.Z2 régulent la même fonction synaptique (ici l'amplitude de l'activité électrique) mais en contrôlant l'expression de sets de gènes différents. Ils sont donc ici impliqués dans la robustesse de ce processus physiologique. Enfin les auteurs ont démontré que dans ce contexte cellulaires H2A.Z1 et H2A.Z2 interagissent avec des formes différentes de H2B. En effet, un Western-Blot après co-immunoprécipitation (co-IP) de H2A.Z2, révèle 2 formes différentes de H2B alors qu'il n'y en a qu'une lors de la co-IP avec H2A.Z1 (Figure 44). Cela suggère que H2A.Z2 interagit dans ce contexte avec une forme de

H2B post-traductionnellement modifiée et que l'étude de ces formes différentes de H2B pourrait révéler un nouveau mécanisme de spécificité des 2 isoformes (Dunn et al., 2017).

Très récemment, il a également été montré que H2A.Z2, et pas H2A.Z1, est essentiel au développement crâniofacial *in vivo* chez le xénope, notamment en permettant l'expression de facteurs de transcription essentiels à la formation de la crête neurale (Greenberg et al., 2019). Les auteurs ont aussi montré que, dans ce contexte, SRCAP (dont la déplétion phénocopie celle de H2A.Z2) permet l'incorporation spécifique de H2A.Z2 aux enhancers des gènes sous-exprimés lors de la déplétion de H2A.Z2. Les auteurs ont également montré que la différence de rôles de H2A.Z1 et H2A.Z2, dans ce contexte, est due principalement à la différence T38S (Greenberg et al., 2019). Comme lors des analyses *in vitro* (Horikoshi et al., 2013), les rôles spécifiques des isoformes de H2A.Z pourraient donc être expliqués, au moins en partie, par la différence de vitesse d'échange des nucléosomes contenant l'une ou l'autre isoforme.

Enfin, mon équipe d'accueil a également montré une différence de sets de gènes régulés par H2A.Z1 et 2 dans plusieurs types cellulaires. Cette différence semble être expliquée, au moins en partie, par l'interaction de H2A.Z1 et H2A.Z2 avec des effecteurs différents (Lamaa et al., en révision, communication personnelle).

Toutes ces études montrent que les 2 isoformes de H2A.Z peuvent avoir des effets spécifiques, notamment sur l'expression des gènes, ce qui a pour conséquence de réguler différemment les mêmes fonctions biologiques ou affecter des processus physiologiques différents. Ces effets peuvent être expliqués par des localisations génomiques différentes, par des dynamiques d'incorporation/éviction différentes, par des expressions différentes selon le type cellulaire ou encore par des interacteurs/effecteurs différents. L'étude approfondie des rôles de ces 2 isoformes semble donc essentielle à la compréhension du rôle de H2A.Z, et plus largement, de la dynamique chromatinienne dans les processus biologiques.

Problématique : Quelle est le rôle de la dynamique du variant d'histone H2A.Z et de ses isoformes dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal ?

RESULTATS

I- H2A.Z1 contrôle l'homéostasie de l'épithélium intestinal

1) Contexte

L'homéostasie de l'épithélium intestinal est dépendante de l'équilibre entre la prolifération des cellules de la crypte et la différenciation des cellules spécialisées dans la villosité. Le changement d'identité cellulaire au cours de la différenciation est dynamiquement contrôlé notamment par des voies de signalisation et des facteurs de transcription spécifiques. Cependant, les mécanismes contrôlant ces dynamiques, notamment la liaison des facteurs de transcription sur leur séquences génomiques cibles, ne sont pas totalement connus. Les modifications chromatinienne sont de bonnes candidates pour réguler, au moins en partie, la dynamique de cette fixation. Dans ce contexte, une étude du laboratoire de Natalia Soshnikova a analysé la dynamique de plusieurs marques chromatinienne durant la différenciation des cellules souches intestinales (ISC) en entérocytes matures. Cette étude a montré que l'expression du variant d'histone H2A.Z diminue durant la différenciation, de même que son incorporation aux niveaux des promoteurs d'un grand nombre de gènes plus exprimés dans les cellules différenciées (Kazakevych et al., 2017). La dynamique très particulière de ce variant d'histone laisse donc penser qu'il pourrait être impliqué dans la régulation de l'expression de ces gènes au sein de l'épithélium intestinal. En accord avec le fait que H2A.Z régule la transcription de gènes de manière dépendante de ses modifications post-traductionnelles (Dalvai et al., 2013; Valdés-Mora et al., 2012), mon équipe a montré que le complexe de remodelage de la chromatine p400 et l'histone acétyltransférase Tip60, qui régulent l'incorporation et l'acétylation de H2A.Z respectivement, contrôlent la prolifération des cellules de cancers colorectaux. Ce contrôle se fait via la régulation de la voie de signalisation essentielle à la prolifération des cellules de la crypte intestinale normale : la voie Wnt (Chevallard-Briet et al., 2014). Nous avons donc analysé le rôle du variant d'histone H2A.Z dans le contrôle de l'homéostasie de l'épithélium intestinal en contexte physiologique.

2) Résultats

Dans cet article, publié dans le journal Nature Communications, nous avons caractérisé le rôle de H2A.Z1 dans le contrôle de l'homéostasie épithéliale intestinale. Pour cela, nous avons analysé l'expression des marqueurs spécifiques des cellules différenciées ainsi que la prolifération des cellules de la crypte dans l'épithélium intestinal de souris KO pour *H2afz* (gène codant pour H2A.Z1). Nous avons également analysé le mécanisme de régulation de l'expression des gènes de différenciation entérocytaire ainsi que le mécanisme de contrôle de la dynamique de H2A.Z1 en utilisant le modèle cellulaire Caco-2/15.

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09899-z>

OPEN

The H2A.Z histone variant integrates Wnt signaling in intestinal epithelial homeostasis

Jérémie Rispal¹, Lucie Baron¹, Jean-François Beaulieu ², Martine Chevillard-Briet¹, Didier Trouche^{1,3} & Fabrice Escaffit^{1,3}

The Tip60/p400 chromatin-modifying complex, which is involved in the incorporation and post-translational modification of the H2A.Z histone variant, regulates cell proliferation and important signaling pathways, such as Wnt. Here, we study the involvement of H2A.Z in intestinal epithelial homeostasis, which is dependent on the finely-tuned equilibrium between stem cells renewal and differentiation, under the control of such pathway. We use cell models and inducible knock-out mice to study the impact of H2A.Z depletion on intestinal homeostasis. We show that H2A.Z is essential for the proliferation of human cancer and normal intestinal crypt cells and negatively controls the expression of a subset of differentiation markers, in cultured cells and mice. H2A.Z impairs the recruitment of the intestine-specific transcription factor CDX2 to chromatin, is itself a target of the Wnt pathway and thus, acts as an integrator for Wnt signaling in the control of intestinal epithelial cell fate and homeostasis.

¹LBCMCP, Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse 31062, France. ²Laboratory of Intestinal Physiopathology, Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke J1H 5N4 QC, Canada. ³These authors jointly supervised this work: Didier Trouche, Fabrice Escaffit. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.E. (email: fabrice.escaffit@univ-tlse3.fr)

Epigenetics and chromatin-modifying enzymes are known to be major regulators of physio-pathological processes. We recently showed¹ that the Tip60/p400 enzymatic complex plays a critical role in colon cancer, regulating susceptibility to chemically-induced pre-neoplastic lesions and adenomas. We demonstrated that these effects are dependent on the Wnt pathway, a well-known signaling pathway involved in cancer, but also critical for the development and homeostasis of the normal intestine.

The Tip60/p400 complex is a multimolecular complex containing several chromatin-modifying enzymes², such as the Tip60 histone acetyltransferase or the p400 ATPase, which participates in the incorporation of the histone variant H2A.Z^{3,4}. This protein is one of two histone variants, which are conserved from yeast to human and its enrichment at the Transcription Start Site (TSS) of genes is dependent on their expression levels, indicative of a major role in gene transcription. Recent studies suggest or point out the role of H2A.Z incorporation dynamics in several biological processes, such as senescence, stem cell specification or the learning process^{5–7}.

The enzymatic activities present in the Tip60 complex participate in the control of transcription in a complex manner. Indeed, while histone acetylation by Tip60 is globally associated with the activation of transcription⁸, the incorporation of H2A.Z can differently affect gene expression depending on the gene, chromatin context or post-translational modification of H2A.Z itself^{3,5,9–11}.

p400 and H2A.Z have been shown to be important for cell proliferation, since their depletion leads to proliferation arrest in many cell types^{1,3,10–14}. We previously demonstrated that p400 favours some pro-proliferative pathways: in particular, p400 plays a central role in the control of Wnt activity by preventing oxidative stress¹⁵, which antagonizes the activity of the Wnt pathway¹⁶, as well as through the direct regulation of Wnt target genes.

In mammals, intestinal stem cell niche maintenance and terminal differentiation of epithelial lineages are dependent on the Wnt pathway, in cooperation with other signaling pathways, such as BMP¹⁷ for example. Intestinal stem cells are located in the crypts, interspersed with Paneth cells, which serves as a niche. These stem cells lead to the production of progenitor cells, which actively proliferate. Migration of these cells into the upper compartments of the intestinal epithelium leads to their differentiation into specific intestinal lineages, including enterocytes, goblet cells, or entero-endocrine cells. This process is controlled by intestine-specific transcription factors, such as members of the CDX homeobox gene family, which are crucial for embryogenesis and differentiation of the intestinal epithelium^{18,19}. Indeed, CDX1 and CDX2 are essential for the maintenance of intestinal identity and regulate compartment-specific differentiation²⁰. For instance, CDX2 functionally interacts with other transcription factors, such as HNF1 α and GATA4, to regulate the expression of terminal differentiation markers of enterocytes (Sucrase-Isomaltase (SI), Lactase-Phlorizin Hydrolase, μ -ProtoCadherin, etc.)^{21–23}. Ectopic expression of Cdx2 in the mouse stomach triggers the replacement of the gastric mucosae by cells harboring features of intestinal secretory or absorptive lineages²⁴. Moreover, Cdx2^{-/+} heterozygous mice were found to be more sensitive to tumorigenesis in the distal colon induced either by azoxymethane treatment or Apc mutation^{25,26}. It has also been shown that CDX2 positively regulates the expression of the Wnt inhibitors APC and AXIN2²⁷. Considering the p400-dependent induction of the Wnt pathway, this suggests a link between CDX2, p400 and thus H2A.Z dynamics to modulate Wnt activity.

Interestingly, a recent study⁵ has shown that the global loss of H2A.Z is a signature for differentiation of intestinal stem cells.

Moreover, we recently showed¹ that p400 plays a critical role in colon carcinogenesis through its function in the Wnt pathway. These data underline the potential importance of H2A.Z dynamics in intestinal homeostasis. However, nothing is known about the exact role of H2A.Z in the regulation of gene expression and the set-up of the differentiation-specific transcriptional pattern in this context.

In this study, we investigate the role of H2A.Z dynamics in intestinal epithelial homeostasis. We demonstrate that H2A.Z is essential for the proliferation of intestinal epithelial progenitors and that defects in its expression trigger deregulation of a subset of terminal differentiation marker expressions. We also demonstrate that H2A.Z incorporation into chromatin negatively regulates CDX2 binding to its target genes promoters, thereafter repressing their transcription. Finally, we find that the activity of the Wnt pathway promotes the expression of H2A.Z and impacts the H2A.Z-dependent gene expression. Thus, taken together, we demonstrate an epistatic relationship between histone variant incorporation and binding of the crucial transcription factor CDX2, demonstrating that the H2A.Z histone variant exerts a central role in tissue homeostasis by integrating key signaling by the Wnt pathway.

Results

H2A.Z regulates proliferation of intestinal epithelial cells. We have previously uncovered a major role of some components of the Tip60 chromatin-modifying complex (Tip60 itself and the chromatin remodeler p400) on the proliferation of both normal and colon cancer cells in culture^{1,14}, and also in vivo, affecting the early steps of colon tumorigenesis¹. Interestingly, it has recently been shown that the differentiation of intestinal epithelial cells is characterized by a global loss of histone variant H2A.Z⁵, a major substrate of both Tip60 and p400. We thus intended to characterize the role of the histone variant H2A.Z in normal intestine homeostasis.

We first analyzed the impact of H2A.Z knockdown on relevant intestinal cell proliferation. We took advantage of the HIEC normal human intestinal crypt cells²⁸, a unique normal epithelial model harboring features of progenitor cells²⁸ and which are able to proliferate in culture until confluence without committing into any differentiation process. Transfection of siRNAs directed against H2A.Z mRNA (see knockdown efficiencies in Supplementary Fig. 1) greatly reduces the proliferation of these cells (Fig. 1a), indicating that H2A.Z expression is required for the proliferation of this normal intestinal epithelial crypt cell model.

Similarly, we found that H2A.Z expression is essential for the proliferation of Caco-2/15 cells (Fig. 1b, see Fig. 2a for siRNA efficiency), a human colon cancer-derived cell line. This cell line is largely used to study enterocyte differentiation, which is spontaneously induced when these cells reach confluence. Importantly, in these cells, overexpression of siRNA-resistant H2A.Z reverses, at least in part, the cell proliferation arrest (Supplementary Fig. 2), confirming that the decrease in cell proliferation observed upon H2A.Z siRNA transfection is indeed due to the decrease in H2A.Z expression. Analysis of the mechanism underlying this decrease in cell proliferation does not reveal any induction of apoptosis (assessed by PARP cleavage) nor of markers of senescence (Supplementary Fig. 3). Rather, we observed that depletion of H2A.Z leads to an accumulation of cells in the G0/G1 phase of the cell cycle (Supplementary Fig. 4), suggesting a defect in cell cycle progression.

Thus, all together, these observations indicate that the histone variant H2A.Z is required for the proliferation of both normal and cancer epithelial cells, independently of their differentiation potential.

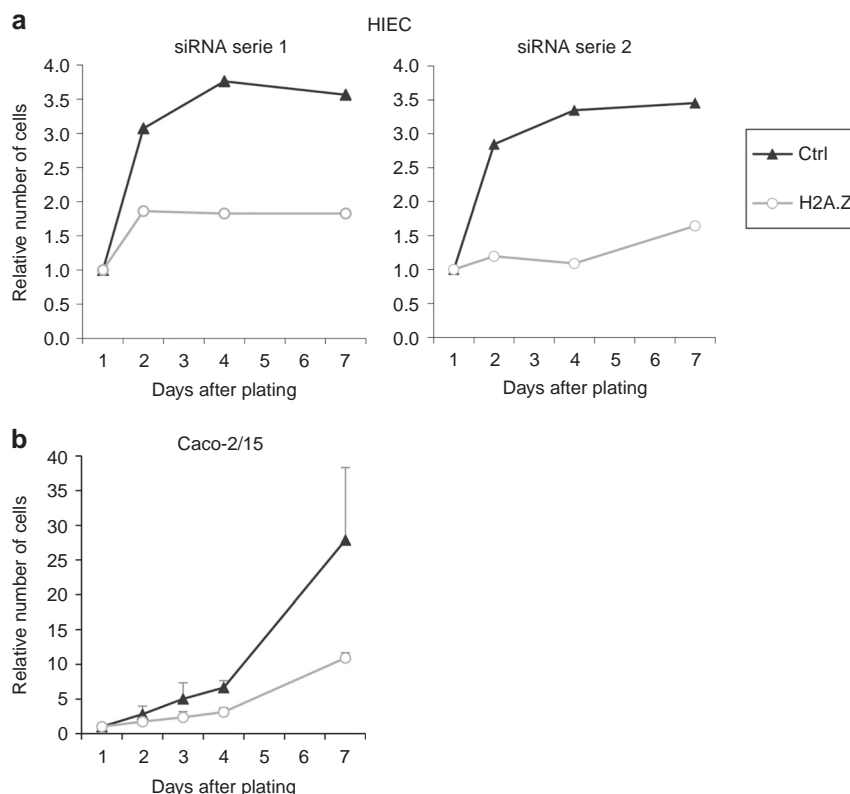


Fig. 1 H2A.Z-dependent regulation of intestinal epithelial cell proliferation. **a** HIEC cells were transfected using siRNAs targeting H2A.Z mRNA or control. Two different series of siRNAs were used. Cell number was measured and represented relative to 1 for day 1 after transfection and plating. One representative experiment out of two is shown for each series. **b** Caco-2/15 cells were transfected using siRNAs control or directed against H2A.Z and the cell number was measured and represented relative to 1 for day 1 after transfection and plating. The mean and standard deviation are shown ($n = 3$ independent experiments)

H2A.Z is a negative regulator of intestine differentiation. The H2A.Z histone variant has important roles in transcription, inducing positive or negative effects on gene expression depending on chromatin context as well as its post-translational modifications⁹.

A very recent study⁵ demonstrated that, among chromatin marks that are affected during the intestinal differentiation process, a global genome-wide decrease in H2A.Z incorporation is a signature of Intestinal Stem Cells (ISC) differentiation that correlates with the activation of enterocyte-specific genes. Thus, to investigate the role of H2A.Z in differentiation, we analyzed the impact of H2A.Z down-regulation on the expression of enterocyte differentiation markers. By RT-qPCR and western blot, we observed that, in Caco-2/15 cells, H2A.Z knockdown greatly induced the expression of the terminal enterocyte differentiation marker SI (Fig. 2a), as well as another key protein for enterocyte functions, Lactase Phlorizin Hydrolase (LPH).

Similar results were obtained using another independent siRNA against H2A.Z (Supplementary Fig. 5A), ruling out the possibility of off-target effects. Note that these inductions are much higher than the induction occurring after confluence (in Supplementary Fig. 5B, compare H2A.Z siRNAs to control, cells being seeded at sub-confluence (75%) and Day 0 corresponding to the siRNAs transfection). Importantly, this increase in differentiation markers expression is not due to H2A.Z-depleted cells (Supplementary Fig. 5C) reaching confluence earlier than controls, since proliferation is decreased upon H2A.Z depletion, as shown in Fig. 1b. H2A.Z depletion also results in a weak but significant increase in CDX2 expression (Fig. 2a and Supplementary Fig. 6), which could play a role in the expression of the

differentiation markers (SI and LPH genes being known CDX2 targets). Analysis of other genes bound by H2A.Z⁵ revealed an increased expression of KLF4, but not of ARHGEF2 and LDHA (Supplementary Fig. 7), indicating that strong binding of H2A.Z does not determine regulation upon H2A.Z knock-down in Caco-2/15 cells, as already published in other systems²⁹. Strikingly, KLF4 is known to be regulated by CDX2³⁰, which reinforce the link between activation upon H2A.Z depletion and regulation by CDX2.

We next tested the effect of H2A.Z depletion in HIEC2F cells, a non-transformed model derived from HIEC cells. HIEC2F cells express the CDX2 and HNF1 α transcription factors in an inducible manner³¹, both being important for the differentiation of the intestinal epithelium and for the expression of enterocyte differentiation markers²¹. In the absence of the inducer (Fig. 2b, -dox), HIEC2F cells express CDX2 and HNF1 α at moderate levels due to the leakiness of the inducible system (as previously shown by Benoit et al.³¹). We found that, in these non-transformed cells also, depletion of H2A.Z leads to an increase in the expression of differentiation markers SI and LPH (Fig. 2b). This induction requires the presence of CDX2 and HNF1 α , since no SI or LPH expression is detected in the parental HIEC wild-type cells which do not express these factors (Benoit et al.³¹). Importantly, in HIEC2F cells, H2A.Z depletion does not induce CDX2 nor HNF1 α expression (Fig. 2b). This result indicates that the induction of differentiation markers upon H2A.Z depletion is not mediated by changes in CDX2 and HNF1 α expression levels, at least in this cell model. It also suggests that H2A.Z is a direct negative modulator of the expression of the SI or LPH genes.

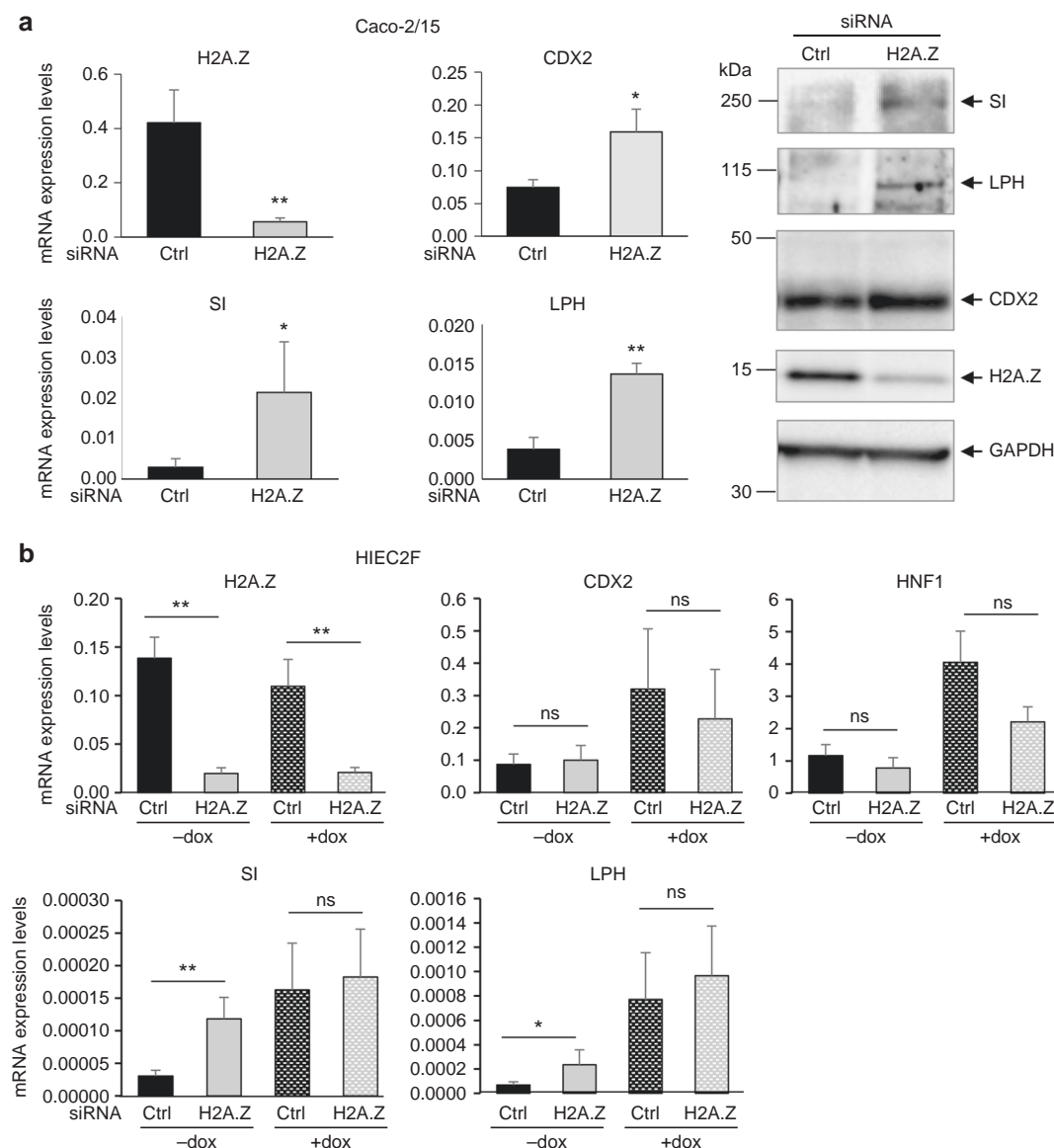


Fig. 2 Negative control of differentiation marker expression by H2A.Z. **a** Caco-2/15 cells were transfected using siRNA targeting H2A.Z or control. 72 h later, total RNA was extracted and subjected to RT-qPCR analysis for the expression of the indicated genes (calculated relative to β 2m mRNA level). The mean and standard deviation are shown ($n = 5$ independent experiments). Statistical analysis was done using the Student's *t*-Test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.02$ vs control siRNA). Also shown is the expression of the corresponding proteins analyzed by western blot from total extracted proteins of the same samples. **b** HIEC2F cells were transfected using siRNA control or targeting H2A.Z, and treated or not with 10 μ g/ml doxycycline for 3 days. Total RNA was extracted and RT-qPCR analysis for the expression of the indicated genes was performed as in **a**

Note that, in the context of the overexpression of CDX2 and HNF1 α following doxycycline addition (Fig. 2b, +dox), leading to the induction of enterocyte differentiation markers as previously shown³¹, the expression of markers cannot be further increased by H2A.Z knockdown. This absence of effect is probably due to the fact that, when CDX2/HNF1 α are strongly overexpressed in the presence of Dox, CDX2/HNF1 α -dependent activation of their target genes is maximal and cannot be further increased by H2A.Z depletion. Such a mechanism could suggest a relationship between CDX2/HNF1 activity and H2A.Z effect (see below).

Taken together, these data suggest that H2A.Z acts as a negative regulator of enterocyte differentiation in vitro, both in transformed and non-transformed contexts, by a mechanism dependent on intestine-specific transcription factors.

H2a.z controls the intestinal epithelial homeostasis in vivo. We next wondered whether H2A.Z could have the same function in vivo, in the integrated context of the entire organ and organism. We generated a mouse strain allowing the inducible knockout of *H2a.z* in the intestine. We crossed mice homozygously floxed on the *H2afz* gene³² with the *Lgr5-CRE^{ERT2}* mouse strain³³, expressing the CRE recombinase specifically in the intestinal stem cells under the control of the endogenous promoter (heterozygous knock-in) of the intestinal stem cell marker *Lgr5*. Moreover, the CRE recombinase used in this mouse strain is fused to a modified version of the estrogen receptor ligand binding domain, which sequesters the enzyme in the cytoplasm in the absence of tamoxifen. Thus, the deletion of the *H2a.z* gene is also temporally controlled and induced by the

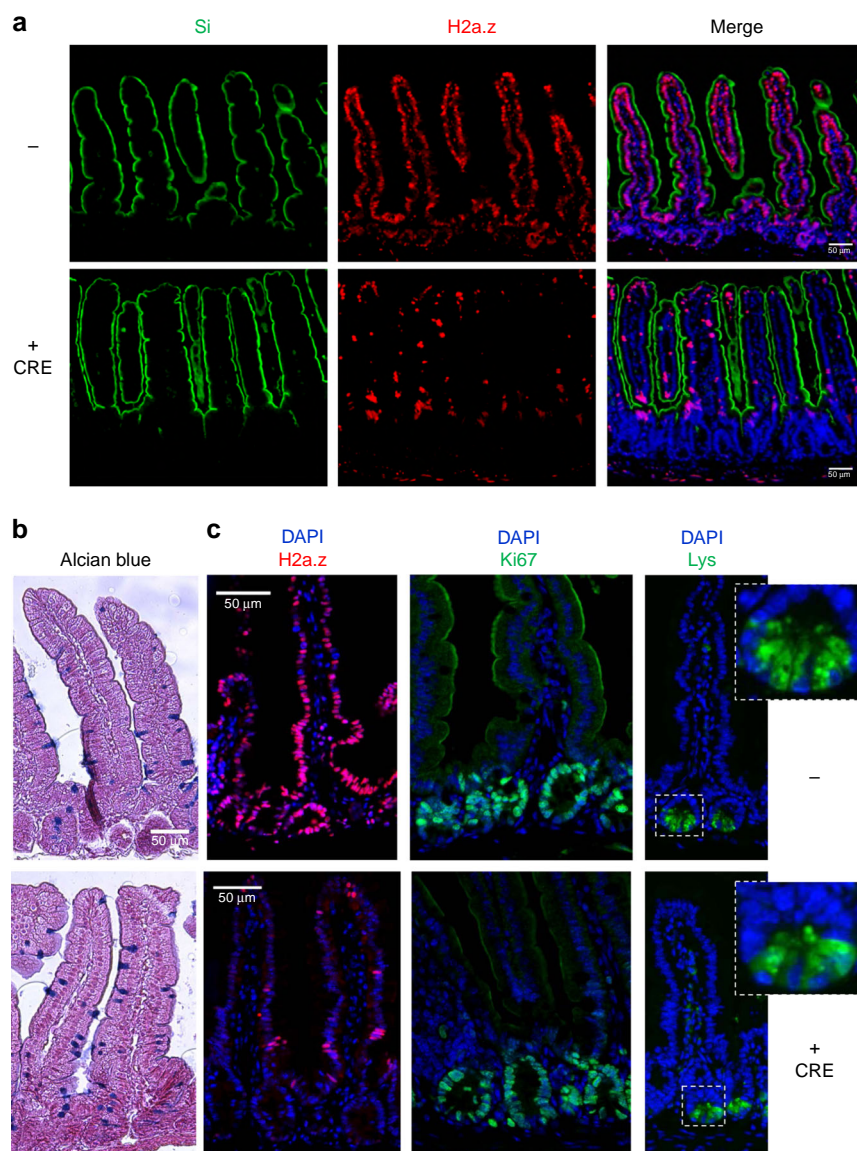


Fig. 3 Regulation of markers accumulation in tissues upon H2a.z depletion. **a** Immunofluorescence experiments on sections of small intestine from mice expressing (+CRE) or not (–) the CRE recombinase and treated for 10 days with a tamoxifen-containing feed before dissection. The indicated specific antibodies were used, as well as DAPI to stain nuclei (in blue in merge panels), for staining tissues from representative individuals. **b** Alcian blue staining, counterstained with nuclear fast red, was performed on sections, obtained as in **a**, to reveal mucin-producing cells. **c** Same as in **a** using the indicated antibodies and DAPI staining. All panels are representative of the same animals than in **b**

administration of tamoxifen in the food (see Supplementary Fig. 8 for typical genomic recombination efficiency).

We thus obtained an original *in vivo* model to specifically induce, on demand, the knock-out of H2a.z in intestinal stem cells. Upon tamoxifen treatment, we observed a mosaic disappearance of H2a.z staining as early as 10 days after induction (see central panels of Fig. 3a), in agreement with the fact that LGR5-CRE is known to induce a mosaic knock-out. No obvious change in the size of the crypt-villus structure was observed (see panels of Fig. 3), nor in the number or the position of the Ki67 positive cells, in the crypts or in the remaining H2a.z-positive cells of the villi (Fig. 3c), suggesting that stem cell maintenance and progenitor cell proliferation was not greatly impaired *in vivo*. Note however that when we analyzed H2a.z expression one and two months following induction of recombination, we found that knock-out cells were gradually replaced by cells expressing H2a.z (Supplementary Fig. 9),

indicating that H2a.z is required for optimal stem cell maintenance or proliferation.

Interestingly, we observed that H2a.z gene deletion leads to a significant increase Sucrase Isomaltase (Si) expression both at the protein and mRNA levels (Figs. 3a and 4a), providing evidence that, as previously observed in cell culture, H2a.z depletion also induces some enterocyte-specific markers *in vivo*. Note, however, that *Lph* gene expression is not significantly affected by H2a.z knock-out (Fig. 4a), perhaps because regulatory mechanisms are species- or context-specific. Alternatively, the weak phenotype of these mice when analyzing mRNA expression could be due to the variegated incomplete recombination of the H2a.z gene we describe above.

Interestingly, deregulating H2A.Z levels also leads to an increase in the number of goblet cells (another important epithelial lineage of the mature intestine) all along the villi (Fig. 3b). At the mRNA level, we found that messengers encoding

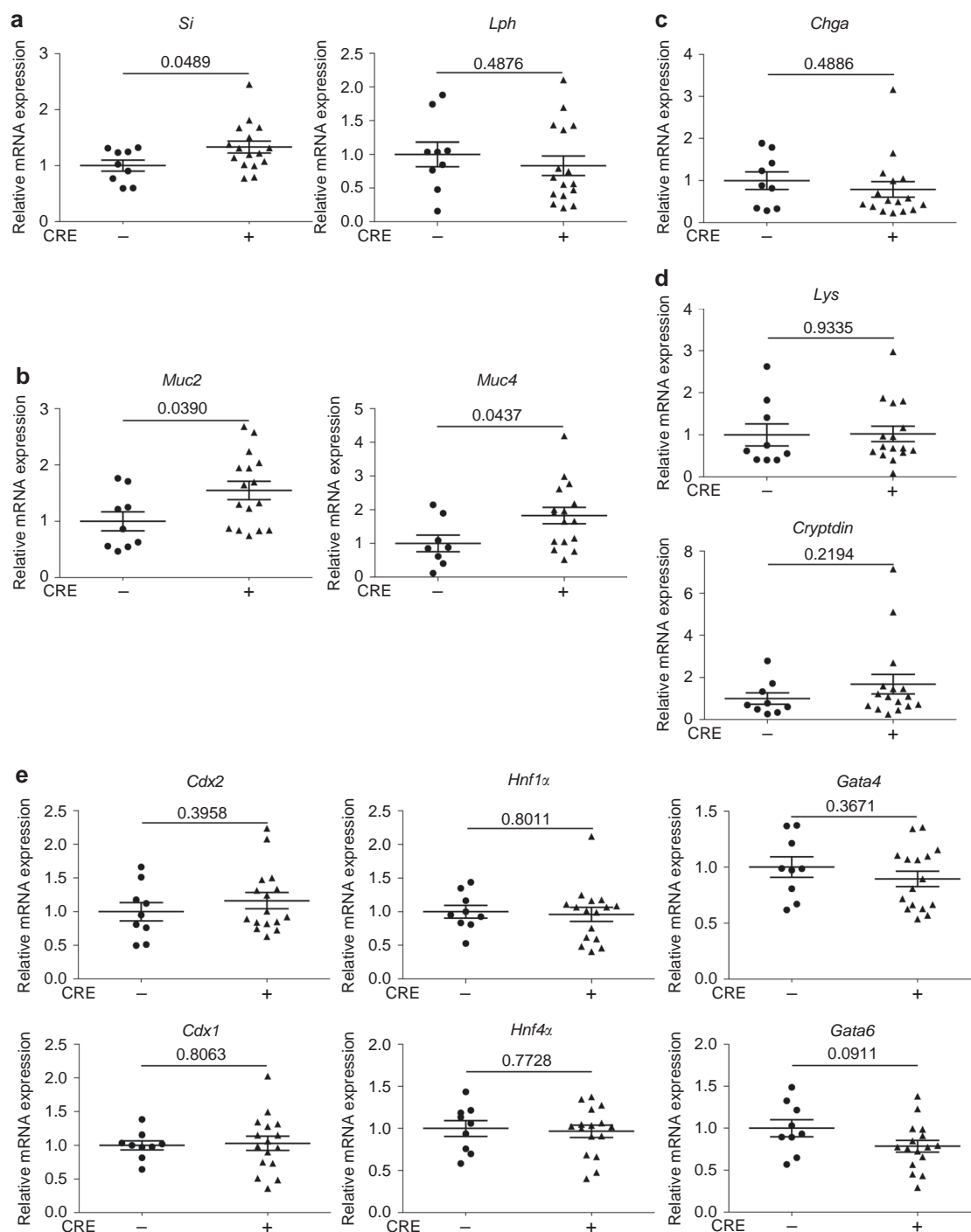


Fig. 4 H2a.z controls the expression of differentiation marker mRNAs in vivo. 10–15 mice per indicated genotypes were fed a tamoxifen-containing diet for 10 days, sacrificed and the small intestinal mucosae were harvested and total RNA extracted, as indicated in the Materials and Methods. qPCR was then performed for the detection of enterocyte (**a**), goblet (**b**), entero-endocrine (**c**), and Paneth (**d**) cell markers. β 2m-normalized values for each mouse were plotted relative to 1 for the mean of control (-CRE) mice. Means and standard errors are represented and the Student's *t*-Test *p*-value is indicated for each gene. **e** Same as in **a–d** for intestine-specific transcription factors

the Muc2 and Muc4 proteins, two differentiation markers for goblet cells are also induced upon H2a.z knock-out (Fig. 4b).

Differentiation markers for entero-endocrine cells (Chromogranin A) (Fig. 4c) or Paneth cells (Cryptdin or Lysozyme) (Figs. 4d and 3c) are unchanged whatever the expression level of H2a.z.

Altogether, these data suggest that H2a.z inhibits the expression of some differentiation markers of enterocyte and goblet cell lineages in the intestinal epithelium in vivo.

H2A.Z inhibits CDX2 binding to its target promoters. We next intended to characterize the mechanism by which H2A.Z regulates the expression of intestinal differentiation markers.

Analysis of the mRNA expression of intestine-specific transcription factors (Fig. 4e) does not reveal any obvious changes upon H2a.z depletion in vivo, suggesting that the effect of H2A.Z on differentiation markers is not mediated by the regulation of the expression of such transcription factors.

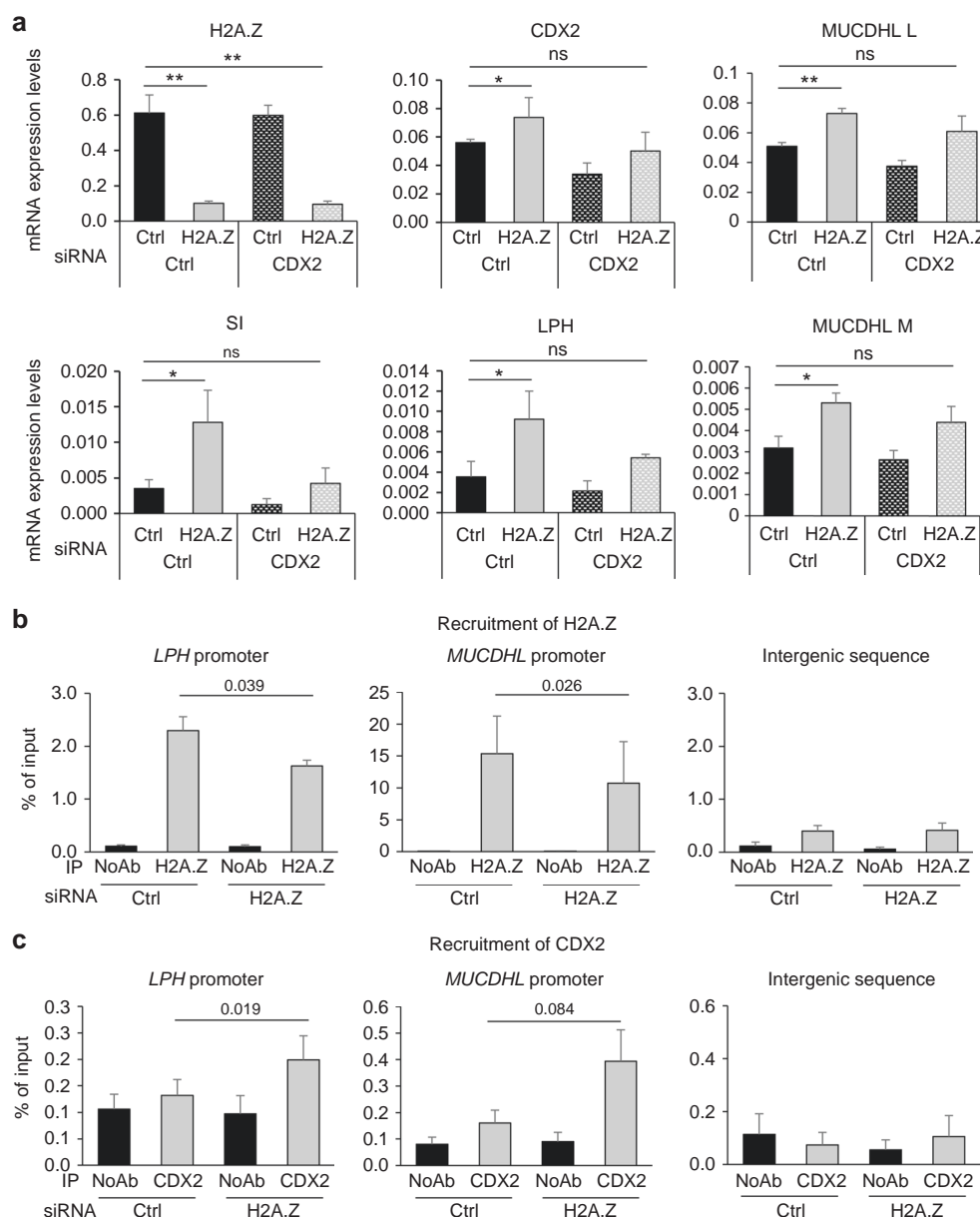


Fig. 5 Epistatic relationship between H2A.Z and CDX2. **a** Caco-2/15 cells were transfected using siRNA targeting CDX2 mRNA or control, upon or not siRNA-mediated H2A.Z depletion. 72 h later, total RNA was extracted and subjected to RT-qPCR analysis for the expression of the indicated genes (calculated relative to β 2m mRNA level). The mean and standard error are shown ($n = 3$ independent experiments). Statistical analysis was done using Student's *t*-Test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.02$ vs control siRNA). **b** Caco-2/15 cells were transfected using siRNA targeting H2A.Z or control, as indicated. 72 h later, ChIPs were performed using an H2A.Z antibody or no antibody as a control (No Ab). The amount of *LPH* or *MUCDHL* promoters, or an intergenic sequence were analyzed by qPCR, and the percentage of input was calculated. The mean and standard error are shown ($n = 3$ independent experiments). Statistical analysis was done using unilateral Student's *t*-Test. **c** Same in **b** for CDX2 ChIP samples

Strikingly however, CDX2 is a critical transcription factor for the two cell lineages (enterocytes and goblet cells) which we found affected by H2A.Z depletion and is known to directly regulate the genes induced by H2A.Z depletion in Caco2/15 cells. We thus postulated that CDX2 could mediate the effect of H2A.Z on the expression of these genes. Such an epistatic relationship between CDX2 and the H2A.Z would be consistent with our findings from Fig. 2b that no effect of H2A.Z depletion could be observed upon strong overexpression of CDX2.

In order to test whether H2A.Z effects are dependent on CDX2, we co-transfected Caco-2/15 cells with siRNAs directed against H2A.Z and CDX2 alone or in combination (Fig. 5a). CDX2 siRNA indeed induces a detectable decrease in CDX2

expression at the mRNA and protein levels (Fig. 5a and Supplementary Fig. 6), as well as its target genes (Fig. 5a). We observed that the induction of SI and LPH mRNA resulting from H2A.Z knockdown is largely reversed by the concomitant reduction of CDX2 expression. Similarly, the expression of μ -protocadherin (MUCDHL spliced isoforms L and M), an adhesion molecule known to be expressed by differentiated colorectal epithelial cells, is also found to be upregulated upon H2A.Z knockdown in a CDX2-dependent fashion.

This result thus indicates that the effects of H2A.Z knock-down on the expression of enterocyte-specific genes are dependent on CDX2 activity.

CDX2 directly binds to the promoters of differentiation-specific genes^{21,34,35}. We thus tested whether H2A.Z could regulate the binding of CDX2 to its target promoters.

We transfected Caco-2/15 cells with a siRNA directed against H2A.Z and analyzed H2A.Z presence (Fig. 5b) and CDX2 recruitment (Fig. 5c) to the promoters of CDX2 target genes by ChIP. H2A.Z depletion leads to a weak but significant decrease in the presence of H2A.Z-containing nucleosomes at the *LPH* and *MUCDHL* promoters (Fig. 5b), indicating that the global decrease of H2A.Z levels induced by siRNAs translates into a local decrease in H2A.Z genomic occupancy at these promoters. For unclear reasons, we were unable to detect significant ChIP signals at the *SI* promoter, even using previously published primers and with total histone H3 antibodies.

Strikingly, upon H2A.Z knockdown (which induced markers expression as expected (Supplementary Fig. 10), we observed a specific increase in the recruitment of CDX2 to these two promoters (Fig. 5c), as well as to the *KLF4* promoter (Supplementary Fig. 7B), which, as shown above, was also activated upon H2A.Z depletion (Supplementary Fig. 7A).

Thus, this result suggests that reducing H2A.Z at the promoters reduces the chromatin recruitment of the CDX2 intestine-specific transcription factor, at least for its targets *LPH* and *MUCDHL*.

H2A.Z integrates the Wnt-dependent control of homeostasis.

The results described above indicate that artificial modulations of H2A.Z expression can affect intestinal homeostasis. We next tested whether the molecular circuitry we uncovered was targeted by signaling pathways that control intestinal homeostasis.

Interestingly, we previously uncovered a link between the H2A.Z-incorporating p400 ATPase and the Wnt pathway. We thus intended to analyze the impact of Wnt pathway activity on H2A.Z expression. We transfected into Caco-2/15 cells a siRNA directed against β -catenin (a central actor of the Wnt pathway). As expected, transfection of this siRNA reduced the expression of β -Catenin (*CTNNB1*) mRNA (Fig. 6a), as well as Wnt target genes (Fig. 6b). Strikingly, we found that this depletion also decreased the expression of H2A.Z, while *SI*, *LPH* and *MUCDHL* expression increased (Fig. 6c and Supplementary Fig. 7C). The same effects were observed using another β -Catenin-targeting siRNA (Supplementary Fig. 11A) or FH535 Wnt pathway inhibitor (Supplementary Fig. 11B). These results provide evidence that Wnt/ β -Catenin signaling favours the expression of H2A.Z and concomitantly represses the expression of differentiation markers.

In order to test whether the regulation of H2A.Z expression by the Wnt/ β -Catenin/TCF pathway could be direct, we analyzed published TCF7L2 (TCF4) ChIP-Seq data³⁶. Interestingly, a strong TCF4 signal was observed around the H2A.Z promoter in HCT116 cells (Fig. 7a), which are derived from colorectal cancer, as Caco2 cells: a major TCF4 peak could be seen about 500 bp upstream from the H2A.Z transcription start site (TSS), whereas weaker binding was observed downstream from the TSS. Strikingly, no binding could be observed in cells originating from other tissues whereas the binding on the well-known target gene *LGR5* was observed in all cell types (Fig. 7a). Importantly, the regulation of H2A.Z expression by the Wnt pathway was conserved in HCT116 cells, as in Caco-2/15 cells, since depletion of β -Catenin also induced a significant decrease in H2A.Z mRNA expression (Fig. 7b). We confirmed by ChIP-qPCR experiments that TCF4 binds to the H2A.Z promoter in HCT116 cells, and also observed significant binding at the H2A.Z promoter in Caco2 cells (Fig. 7c).

In order to show that the regulation of H2A.Z expression by β -Catenin siRNA is indeed due to the binding of TCF4 to the H2A.

Z promoter, we used CRISPR-mediated genome editing to remove the TCF4 strong binding site in HCT116 cells (see Supplementary Fig. 12 for characterization of the cell line). ChIP experiments indeed showed that the binding of TCF4 to the H2A.Z promoter was decreased in genome edited cells compared to parental cells (Fig. 8a), although not abolished presumably because of the second TCF4 binding site present downstream from the TSS. We next transfected genome-edited cells and parental cells using siRNA directed against β -Catenin. We found that knock-down efficiency was similar in both cell lines, resulting in a similar decrease in the Wnt target genes *LGR5* and *CCND1* (Fig. 8b). However, the decrease in H2A.Z expression is significantly lower in the genome-edited cells compared to control cells (Fig. 8b), the residual decrease being probably due to the residual binding observed in TCF4 ChIP experiments. Altogether, these data indicate that the H2A.Z promoter is a direct target of TCF4/ β -Catenin, the main transcriptional effectors of the classical Wnt pathway.

Interestingly, we further found that the upregulation of differentiation markers expression we observed upon β -Catenin knock-down was counteracted by the concomitant overexpression of H2A.Z, at least in part (Fig. 9a). This effect does not rely on an indirect effect of H2A.Z overexpression on Wnt signaling, since proliferative Wnt target genes, such as *LGR5* or *CCND1*, are not affected by H2A.Z overexpression (Fig. 9b).

Taken together, our data show that the activation of H2A.Z expression is one of the mechanisms by which the Wnt signaling pathway controls progenitor maintenance and differentiation of the intestinal epithelium. As a consequence, they point towards a central integrative role of H2A.Z in the control of intestine homeostasis (Fig. 9c).

Discussion

In this work, we demonstrate the functional importance of H2A.Z expression in preventing terminal differentiation into various lineages of intestinal progenitor cells. To our knowledge, this is the first demonstration of such a causal role of H2A.Z in vivo.

We propose a model in which the presence of H2A.Z impairs the binding of the intestine specific transcription factor CDX2 to its target promoters. The first question raised by our finding is about the mechanism by which H2A.Z prevents CDX2 binding. In vitro experiments using recombinant nucleosomes indicate that both H2A- and H2A.Z-containing nucleosomes block binding of CDX2 to its target site (Supplementary Fig. 13). These data show that it is not by merely replacing canonical H2A that H2A.Z blocks CDX2 binding.

We can thus envision some non-exclusive possibilities. First, the depletion of H2A.Z upon siRNA or upon differentiation could lead to the decrease of local nucleosome occupancy, resulting in higher binding of CDX2 to its target sites. Interestingly and in agreement with this possibility, we found that H2A.Z depletion induces a significant reduction in H3 enrichment around the TSS of differentiation markers genes (Supplementary Fig. 14). Thus, the eviction of nucleosomes in the CDX2 targeted regions of promoters could be, at least in part, involved in the induction of these genes upon decrease of H2A.Z levels.

However, we can also speculate that post-translational modifications of H2A.Z or of the H2A molecule, which replaces it could be involved in regulating the recruitment of CDX2. H2A.Z has indeed been shown to be modified by acetylation or sumoylation, and one of these modifications could directly or indirectly (through the recruitment of specific proteins) prevent CDX2 binding. Alternatively, the histone H2A that replaces H2A.Z could be modified in such a way that this modification favours CDX2 binding. Investigating these possibilities clearly opens a

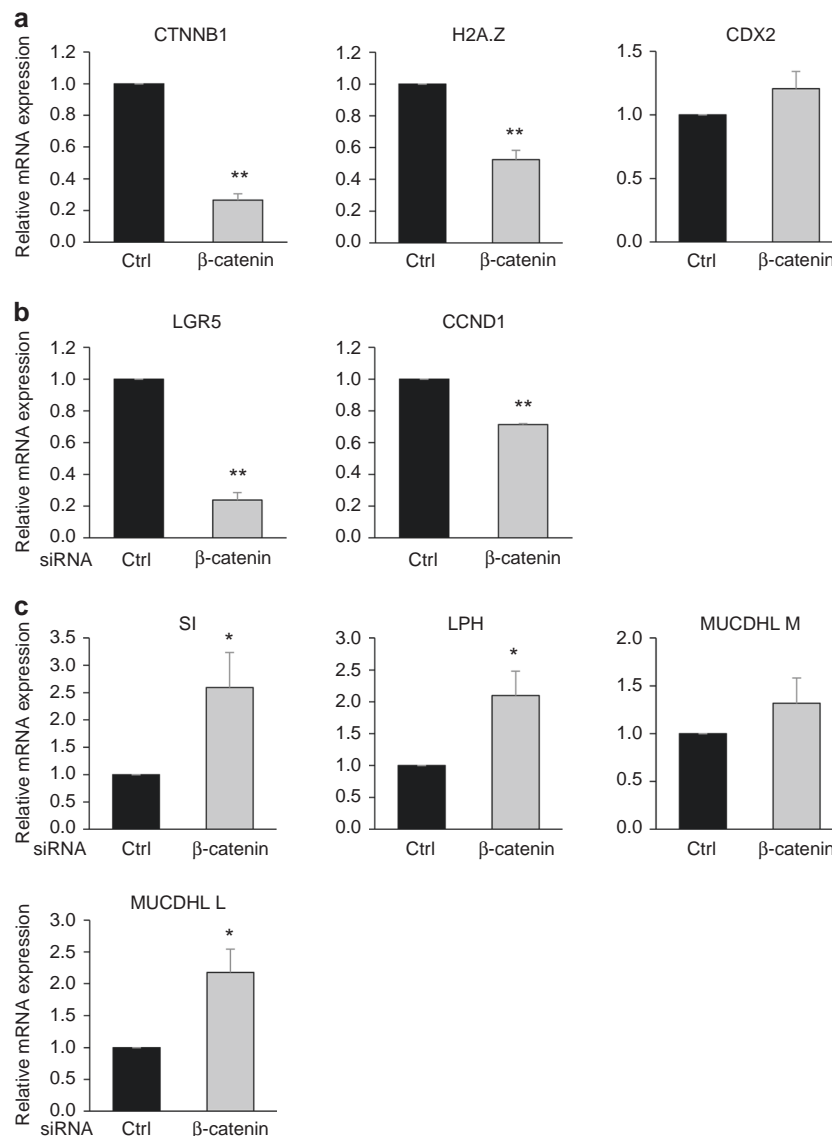


Fig. 6 β-catenin positively regulates H2A.Z and impairs differentiation marker expression. **a** Caco-2/15 cells were transfected using siRNA targeting β-catenin mRNA or control. 72 h later, total RNA was extracted and subjected to RT-qPCR analysis for expression of the indicated genes (calculated relative to β2 M and RPLP0 (p0) mRNA levels). The mean and standard errors are shown ($n = 4$ independent experiments). Statistical analysis was done using Student's *t*-Test (** $p < 0.02$ vs control siRNA). **b** Same as in **a** for Wnt target genes (** $p < 0.02$ vs control siRNA). **c** Same as in **a** for enterocytes differentiation marker genes (* $p < 0.05$ vs control siRNA)

new research avenue on the regulation of CDX2 binding to its target genes and the consequent control of intestine homeostasis.

Our study allows us to propose that the role of H2A.Z on the differentiation process is probably to avoid the ectopic expression of differentiation markers in the crypts. Interestingly, a recent work of Kazakevych et al.⁵ uncovered a strong correlation between intestinal stem cell differentiation and a reduction of H2A.Z expression levels. Moreover, previous works have shown that the Tip60/p400 complex, which is a critical actor in H2A.Z dynamics, being involved both in H2A.Z incorporation into and removal from the chromatin, is involved in the renewal of normal ES cells³⁷. In these cells, the knockdown of some subunits of the complex induces a decreased proliferation rate, the reduction of stemness abilities and the ectopic expression of differentiation markers.

Together with these findings, our data demonstrate that H2A.Z dynamics is a major determinant of cell fate control in an integrated model. Although it has already been shown that other

chromatin marks can be determinant for stemness maintenance or the induction of differentiation in the context of the intestinal epithelium^{38,39}, our work demonstrates that a structural chromatin-related feature, i.e. H2A.Z incorporation, serves as a key event in the maintenance of progenitors in the intestinal epithelium.

Whether H2A.Z plays a similar role in other tissues or contexts is clearly an open issue. The role of the Tip60/p400/H2A.Z complex in the renewal of normal ES cells described above is consistent with a general role for H2A.Z in preventing the expression of differentiation markers. However, some recent data suggest that this role cannot be generalized to all tissues. Indeed, Shen et al.³² describe the exact opposite role for H2A.Z in neurogenesis since they demonstrated that the depletion of H2A.Z in transgenic mice enhances the proliferation of neural progenitors and triggers important defects in neuron differentiation, as well as in learning and memory. It has also been shown⁴⁰ that the depletion of H2A.Z in MDCK canine kidney epithelial cells can

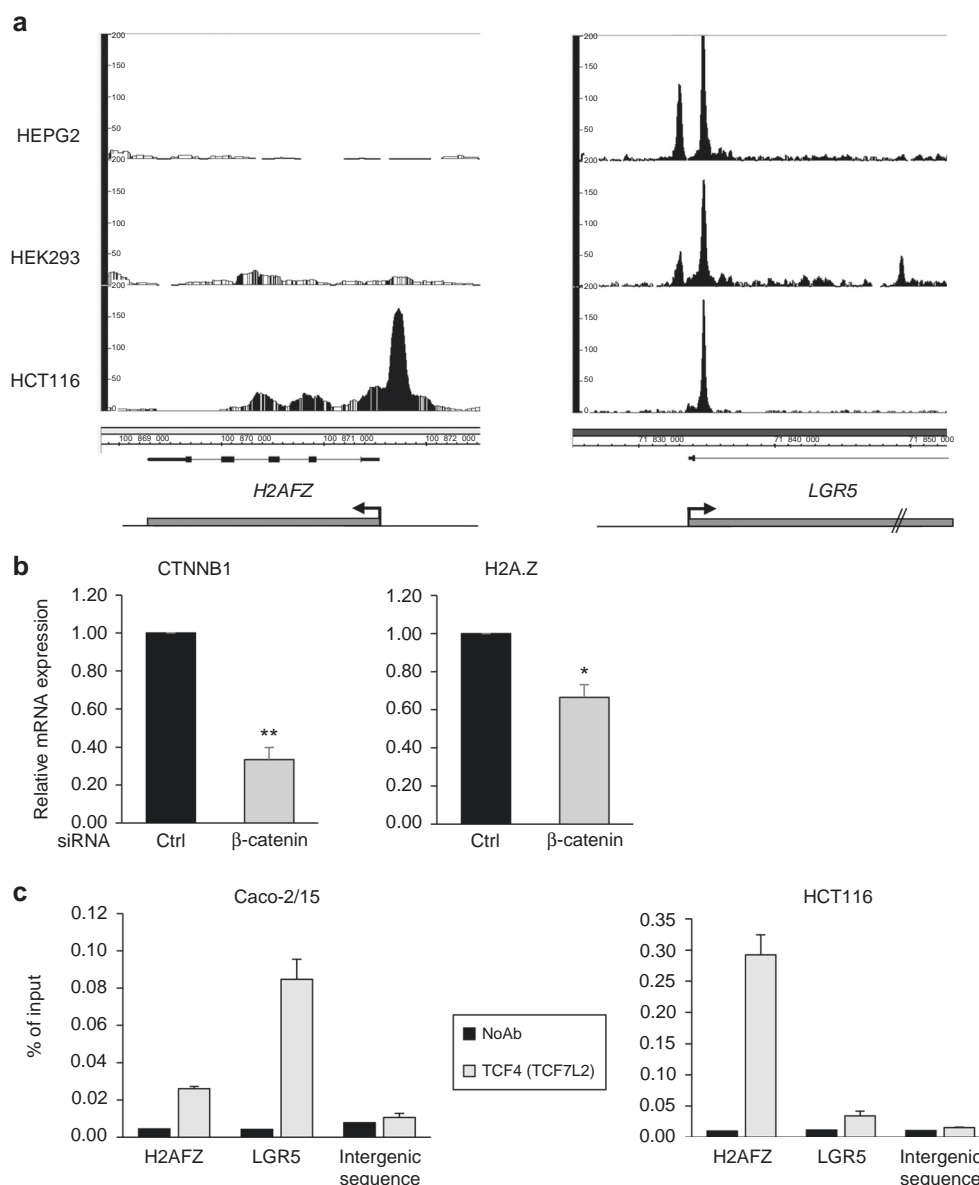


Fig. 7 H2A.Z is a target of the Wnt pathway. **a** Analysis of ChIP-seq data from Fietze et al.³⁶ for the binding of TCF7L2 on *H2AFZ* and *LGR5* gene promoters in three cell lines (HEPG2, HEK293, and HCT116). Representation of peaks of enrichment were obtained using Integrated Genome Browser 9.0.2 (BioViz, <https://bioviz.org>). Note that the drawing scale is not identical due to the relative sizes of both genes. **b** HCT116 cells were transfected using β -catenin -targeting or control siRNA. 72 h later, total RNA was extracted and subjected to RT-qPCR analysis for expression of the indicated genes (calculated relative to β 2 M and RPLP0 (pO) mRNA level). The mean and standard errors are shown ($n = 3$ independent experiments). Statistical analysis was done using Student's *t*-Test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.02$ vs control siRNA). **c** Chromatin from sub-confluent HCT116 and Caco-2/15 cells were harvested and ChIPs were performed using a TCF7L2(TCF4) antibody. The amount of *H2AFZ* or *LGR5* promoters, or an intergenic sequence were analyzed by qPCR, and the percentage of input was calculated. The mean and standard errors are shown ($n = 3$ technical replicates)

favor epithelial-mesenchymal transition (EMT) and promote the invasive properties of these cells. On the contrary, and in accordance with our work, it has been demonstrated that H2A.Z can exhibit an oncogenic potential and can be required for the EMT in hepatocellular carcinoma⁴¹. Thus, H2A.Z is probably widely involved in tissue homeostasis and in the regulation of key physiological functions, but its biological role is organ-specific and probably dependent on the local context (chromatin landscape, proteins recruited to chromatin, etc.).

Our data also provides clues on the relationship between the Wnt signaling pathway and intestinal homeostasis. The data presented here show that Wnt signaling favours H2A.Z

expression and, since we found that H2A.Z prevents CDX2 binding to promoters, this pathway also regulates the expression of CDX2-target genes. Thus, we found that some of these genes, associated with enterocyte differentiation, such as *Sucrase-Isomaltase* or *MUCDHL*, are repressed by Wnt signaling. We also demonstrated the causative role of H2A.Z repression in the effects observed upon β -Catenin knock-down. These data indicate that the control of H2A.Z expression is an important molecular event by which the Wnt signaling pathway controls intestinal homeostasis. Whether H2A.Z could also play such a role outside of intestinal homeostasis is clearly worth investigating.

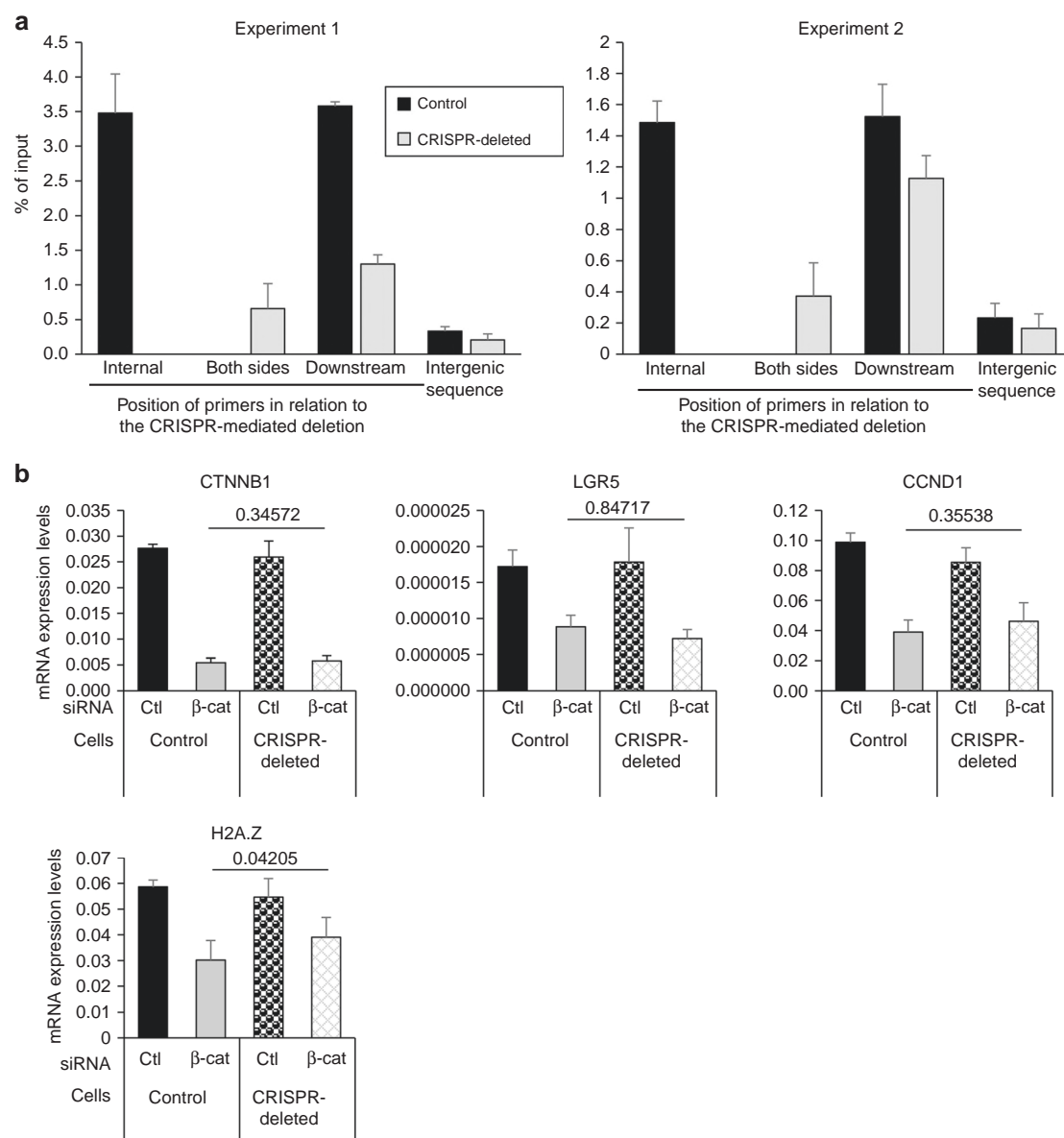


Fig. 8 H2A.Z is an effector of the Wnt pathway on differentiation markers. **a** Chromatin from sub-confluent CRISPR-Cas9-modified HCT116 cells to homozygously delete the major TCF7L2 binding region of the *H2AFZ* gene promoter, using indicated *H2AFZ* promoter—specific or intergenic sequence—targeting primers. Results and standard errors ($n = 3$ technical replicates) are shown for two independent experiments. **b** Control or CRISPR-modified HCT116 cells were transfected using β -catenin—targeting or control siRNA. 72 h later, total RNA was extracted and subjected to RT-qPCR analysis for expression of the indicated genes (calculated relative to GAPDH and β -actin mRNA levels). The mean and standard errors are shown ($n = 4$ independent experiments). The Student's *t*-Test *p*-value was calculated (for β -catenin -depleted samples from control vs CRISPR-modified cells) and is indicated for each gene

Finally, it has been shown that MUCDHL, which we found to be induced upon H2A.Z knockdown in Caco-2/15 cells, is a CDX2 target gene and an important modulator of Wnt-dependent homeostasis²³. Indeed, it acts as a negative Wnt regulator, by sequestering β -Catenin at the plasma membrane, and its expression is also inhibited by Wnt signaling⁴². Thus, H2A.Z could control, at least in part, Wnt-dependent proliferation by the same mechanism as differentiation, i.e. by regulating CDX2 binding to the *MUCDHL* promoter. This would indicate that H2A.Z can also be upstream of Wnt signaling, consistent with our previous finding¹ that p400 is a crucial regulator of the Wnt signaling pathway. Altogether, these data indicate that H2A.Z dynamics and Wnt signaling are strongly interconnected, raising the possibility that other Wnt-dependent processes are also controlled by H2A.Z dynamics and its regulators.

Methods

Ethics statement. The experiments involving animals were conducted according to French governmental norms. Authors have complied with all relevant ethical regulations for animal testing and research. This study was approved by the Ethics Committee of the institute “Centre de Biologie Intégrative” (FR3743) and was authorized by the French Ministry of Education and Research (approval APAFIS #4528-2016031109479615 v3). We have complied with all relevant ethical regulations.

Animals. Mice homozygously floxed on the *H2afz* and *H2afv* genes were obtained from RIKEN BRC (Ibaraki, Japan) and back-crossed with C57Bl/6 J mice (Charles-River, L’Arbresle, France). The F1 offspring were then crossed with each other to generate *H2afz*^{fl/fl} mice. These mice were then crossed with the *Lgr5-Cre*^{ERT2} mouse model (from Jackson Laboratory) to obtain F1 littermates also crossed with each other to obtain *Lgr5-Cre*^{ERT2}/*H2afz*^{fl/fl} mice. Genotyping for *H2afz* and *Cre* alleles was done by PCR analysis of tail DNA samples (see Supplementary Table 1 for primer sequences).

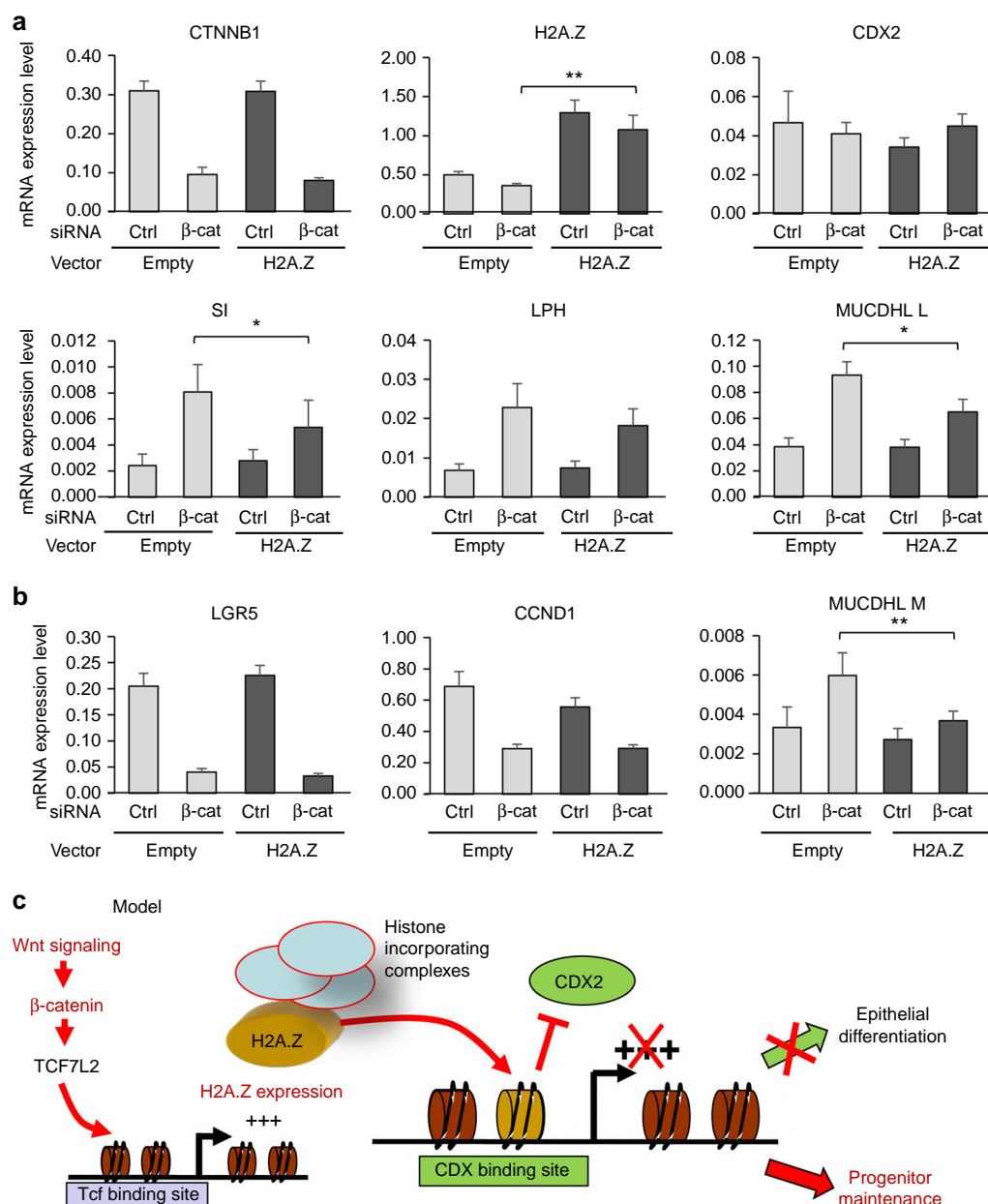


Fig. 9 H2A.Z is an effector of the Wnt pathway on differentiation markers. **a** Caco-2/15 were treated using siRNA targeting β -catenin mRNA or control and transfected with vectors encoding or not H2A.Z to analyse the impact of H2A.Z forced expression on the effects of β -catenin knockdown. The expression of the indicated genes was measured for each condition (calculated relative to β 2 M and RPLP0 (p0) mRNA levels). The mean and standard error are shown ($n = 6$ independent experiments). Statistical analysis was done using Student's *t*-Test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.02$ vs β -catenin siRNA + empty vector condition). **b** Same as in **a** for Wnt target genes. **c** Working model: in our study, we showed that the Wnt/ β -catenin/TCF7L2 (TCF4) signaling pathway positively regulates the expression of the H2A.Z histone variant. The incorporation of the variant, mediated by chromatin modifying complexes, is then increased and responsible for the low recruitment of the intestine-specific transcription factor CDX2 on its target genes and thus, limits the expression of such genes. Since it is known that H2A.Z occupancy of a specific promoter is a signature for intestinal stem cells and that this enrichment is reduced upon differentiation, our data show that H2A.Z participates in the regulation of epithelial differentiation through Wnt signaling. Thus, our study demonstrates that a structural chromatin mark can control the cell fate of normal progenitors and, thereafter, intestinal epithelial homeostasis

In experiments, 6–8-week-old male mice were fed a Tamoxifen-containing diet (Tam Diet TD130857 (500 mg/kg), ENVIGO, USA) for ten days. The administration route and dosage had previously been studied and validated⁴³. During treatment, macro-physiological parameters (weight, behavior, activity, aspect, etc.) of mice were monitored daily.

Tissue sampling. After treatment, the mice were euthanized, dissected and the second third of the small intestine (jejunum) was opened longitudinally. Then, cells were harvested by scraping the mucosae using a scalpel blade, before being subjected to DNA, RNA or protein extraction. The proximal part of each tissue sample

was fixed in formalin before being paraffin-embedded, sectioned and used in immunofluorescence experiments.

Tissue sections and immunofluorescence. Fixed intestines were dehydrated and embedded in paraffin before being cut into 5 μ m sections. For immunofluorescence, tissue sections were deparaffinized with Histo-clear II (Euromedex) and then rehydrated in successive baths of ethanol (100, 95, and 70%) and distilled water. The slides were heated in unmasking solution (Eurobio) with a pressure cooker to reveal antigens. Then the tissue sections were permeabilized for 5 min with Triton X-100 1% and blocked with BSA 1% for 45 min. The sections were incubated with primary antibodies (diluted 1:500) for 2 h at room temperature. The

following antibodies were used: H2A.Z (ab4174, Abcam), SI (sc-393470, Santa-Cruz), Lysosyme (ab108508, Abcam) and Ki67 (ab15580, Abcam). The sections were incubated with secondary antibodies (dilution 1:500) coupled with Alexa Fluor® (Fisher Life Science, anti-mouse -AF488 #A21202 and -AF594 #A11032; anti-rabbit -AF488 #A11034 and -AF594 #A11037) for 1 h at room temperature, and the nuclei were stained with DAPI for 3 min at room temperature.

For Alcian Blue staining, rehydrated sections were incubated with acetic acid 3% for 3 min at room temperature before incubation with Alcian Blue (1% in acetic acid, pH 2.5, Sigma-Aldrich) for 30 min. Then the sections were counterstained with nuclear fast red (0.1%, 5 min, Sigma-Aldrich), dehydrated in ethanol (70%, 95%, 100%) and clarified in Histo-clear II. Finally the slides were mounted with ProLong® (Fisher life Science) and stored at 4 °C.

Cell culture and treatments. The colorectal cancer cell lines Caco-2/15 and HCT116, and the human intestinal crypt cell line HIEC, were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). The Caco-2/15 and HCT116 cells were passed every 3 days at sub-confluence. Cells were transfected with siRNA (see Supplementary Table 2 for sequences) or an H2A.Z expression vector (kind gift from Peter Cheung, University of Toronto, ON Canada) by electroporation (Amaxa) and analysis was performed 3 days after transfection. For proliferation assays, transfected cells were seeded in 96-well plates (2000 cells per well). Then at each day of the kinetics, cells were incubated with the cell proliferation reagent WST-1 (Sigma) for 2 h at 37 °C, and cell numbers were measured by optical density at 450 nm.

Caco-2/15 and HIEC cells were from the Jean-François Beaulieu's lab (Université de Sherbrooke, Québec, Canada) and HCT116 were obtained from Patrick Calsou's lab (IPBS, Toulouse, France).

RT-qPCR and western blot analysis. Genotyping for *H2afz* alleles in intestinal epithelial samples was done by PCR analysis of DNA samples (see Supplementary Table 1 for primer sequences).

For RT-qPCR, the RNA from cells or tissues was extracted using the RNeasy Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol, then it was reverse transcribed into cDNA using AMV reverse transcriptase (Promega). Finally quantitative PCR was performed using specific primers (see Supplementary Tables 3 and 4), and β 2m was used as housekeeping gene.

For western-blot, the proteins were extracted in lysis buffer (Triton X100 1%, SDS 2%, NaCl 150 mM, NaOrthovanadate 200 μ M, Tris/HCl 50 mM). The proteins were separated in NuPage BisTris 4–12% gels (Invitrogen), then transferred onto PVDF membranes. These membranes were incubated with primary antibodies (diluted 1:500): SI (Novus, NBP1–62362), LPH (Biorbyt, orb184881), CDX2 (Abcam, ab88129), H2A.Z (Abcam, ab4174), PARP (Cell Signalling, 9542), CDKN2A^{p16INK4a} (Abcam, ab108349) and GAPDH (Chemicon, Mab374). Finally, they were incubated with secondary antibodies (dilution 1:500) coupled with HRP (BioRad, anti-mouse-HRP #1706516 and anti-rabbit-HRP #1706515), and revealed with Lumi-light^{PLUS} substrate (Roche). Original uncropped and unprocessed images are presented in Supplementary Fig. 15.

Chromatin immunoprecipitation. ChIP experiments were performed classically⁴⁴. Cells were fixed with formaldehyde 1% for 15 min, then cells and nuclei were lysed. The recovered chromatin was sonicated: 10 cycles of 10 s (1 s on, 1 s off) and precleared. Fifty micrograms for H2A.Z and 200 μ g for CDX2 of chromatin were used for immunoprecipitation with 2 μ g of antibodies (H2A.Z: Abcam, ab4174; CDX2: Bethyl, A300–691A; TCF7L2: Cell signaling, C48H11; Histone H3: Abcam, ab1791). Then, the chromatin was incubated with A/G beads for 2 h. Crosslinking was reversed by incubation of the beads with SDS at 70 °C and proteins were degraded with proteinase K. Finally, DNA was purified using the GFX™ DNA purification kit (GE Healthcare), and ChIP was analyzed by qPCR using specific primers (see Supplementary Table 5).

CRISPR-Cas9-mediated genome editing. HCT116 cells were made defective for the TCF7L2 binding region on the H2A.Z promoter by using CRISPR-Cas9 technology adapted from Agudelo et al.⁴⁵. Briefly, cells were transfected using JetPEI (Polyplus) and plasmids encoding for Cas9, PAM and guide for NA/K ATPase and PAM sequences allowing the targeting of the TCF7L2 peak on the H2A.Z promoter (Supplementary Table 6). Three days after transfection, 0.4 μ M ouabain was added for 72 h to select recombinant resistant clones and homozygote knock-out cell lines were screened by sequencing.

Cycle cycle analysis by EdU staining. Caco-2/15 cells were transfected using siRNA directed against H2A.Z. Three days later, cells were treated with 10 μ M of EdU for 2 h. Cells were prepared for cell cycle analysis using Click-iT™ EdU Kit (ThermoFisher) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were recovered with trypsin and treated with Click-iT™ Fixative for 15 min. Fixed cells were permeabilized using Click-iT™ saponin-based reagent, and incubated with the Click-iT™ Reaction cocktail (CuSO₄ 100 mM, AlexaFluor 488), for 30 min at room temperature, to detect EdU. Cells were then incubated with Propidium iodide (BD Biosciences) for 30 min at 37 °C to stain DNA. EdU and PI stainings were

measured using FACSCalibur™ (BD Biosciences) and data were analyzed with FlowJo software.

In vitro binding of CDX2 to nucleosomes. DNA fragments corresponding to proximal *SI* and *LPH* promoters, of 150bp and 156bp respectively, were generated by PCR on HIEC genomic DNA using Cy5-labelled forwardprimers (Supplementary Table 7).

To generate mononucleosomes containing H2A or the H2A.Z variant, H3-H4 tetramers and H2A-H2B or H2A.Z-H2B dimers (1 μ g/ μ l each, Diagenode) were assembled with labelled PCR products, in a histones/DNA weight ratio of 0.2 in a solution containing 2 M NaCl and 10 mM Tris-HCl (pH7.5), and incubated 10 min at 37 °C. Then, the mixture was diluted at 0.5 M NaCl and incubated 30 min at the same temperature and finally dialysed at 4 °C against 10 mM Tris-HCl (pH7.5) + 1 mM EDTA for 2 h.

Recombinant His-tagged CDX2 protein was expressed in *E.coli* and purified on nickel-NTA resin.

Labelled PCR products from *SI* or *LPH* promoters, free or integrated in nucleosomes, were then incubated with or without CDX2 recombinant protein for 30 min at room temperature in 20 mM Hepes (pH7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT and carrier DNA.

For gel shift mobility assays, 4% polyacrylamide (acrylamide-bisacrylamide, 29:1 [wt/wt], BioRad) slab gels in TBE buffer were used. After a 1 h pre-run at 200 V, samples were loaded and electrophoresis was then performed at the same voltage for 3 h at room temperature. Then, gels were analysed using Typhoon device (Perkin Elmer).

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The authors declare that all data supporting the findings of this study are available within the paper and its supplementary information files or from the corresponding author upon request.

Received: 26 June 2018 Accepted: 2 April 2019

Published online: 23 April 2019

References

- Chevillard-Briet, M. et al. Interplay between chromatin-modifying enzymes controls colon cancer progression through Wnt signaling. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 2120–2131 (2014).
- Ikura, T. et al. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* **102**, 463–473 (2000).
- Gevry, N., Chan, H. M., Laflamme, L., Livingston, D. M. & Gaudreau, L. p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev.* **21**, 1869–1881 (2007).
- Kobor, M. S. et al. A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol.* **2**, E131 (2004).
- Kazakevych, J., Sayols, S., Messner, B., Krienke, C. & Soshnikova, N. Dynamic changes in chromatin states during specification and differentiation of adult intestinal stem cells. *Nucleic Acids Res.* **45**, 5770–5784 (2017).
- Lazorthes, S. et al. A vlinRNA participates in senescence maintenance by relieving H2AZ-mediated repression at the INK4 locus. *Nat. Commun.* **6**, 5971 (2015).
- Stefanelli, G. et al. Learning and age-related changes in genome-wide H2A.Z binding in the mouse hippocampus. *Cell Rep.* **22**, 1124–1131 (2018).
- Sapountzi, V., Logan, I. R. & Robson, C. N. Cellular functions of TIP60. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 1496–1509 (2006). [pii]10.1016/j.biocel.2006.03.003.
- Dalvai, M. et al. H2A.Z-dependent crosstalk between enhancer and promoter regulates cyclin D1 expression. *Oncogene* **32**, 4243–4251 (2013).
- Faast, R. et al. Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr. Biol.* **11**, 1183–1187 (2001).
- Fan, J. Y., Gordon, F., Luger, K., Hansen, J. C. & Tremethick, D. J. The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 172–176 (2002). nsb767 [pii].
- Chan, H. M., Narita, M., Lowe, S. W. & Livingston, D. M. The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53 → p21 senescence pathway. *Genes Dev.* **19**, 196–201 (2005).
- Fujii, T., Ueda, T., Nagata, S. & Fukunaga, R. Essential role of p400/mDomino chromatin-remodeling ATPase in bone marrow hematopoiesis and cell-cycle progression. *J. Biol. Chem.* **285**, 30214–30223 (2010). [pii]10.1074/jbc.M110.104513.

14. Mattera, L. et al. The p400/Tip60 ratio is critical for colorectal cancer cell proliferation through DNA damage response pathways. *Oncogene* **28**, 1506–1517 (2009).
15. Mattera, L. et al. The E1A-associated p400 protein modulates cell fate decisions by the regulation of ROS homeostasis. *PLoS Genet.* **6**, e1000983 (2010).
16. Almeida, M., Han, L., Martin-Millan, M., O'Brien, C. A. & Manolagas, S. C. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **282**, 27298–27305 (2007). [pii]10.1074/jbc.M702811200.
17. Auclair, B. A., Benoit, Y. D., Rivard, N., Mishina, Y. & Perreault, N. Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage. *Gastroenterology* **133**, 887–896 (2007).
18. Xu, F., Li, H. & Jin, T. Cell type-specific autoregulation of the Caudal-related homeobox gene Cdx-2/3. *J. Biol. Chem.* **274**, 34310–34316 (1999).
19. Beck, F. The role of Cdx genes in the mammalian gut. *Gut* **53**, 1394–1396 (2004).
20. Hryniuk, A., Grainger, S., Savory, J. G. & Lohnes, D. Cdx function is required for maintenance of intestinal identity in the adult. *Dev. Biol.* **363**, 426–437 (2012).
21. Boudreau, F. et al. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *J. Biol. Chem.* **277**, 31909–31917 (2002).
22. van Wering, H. M. et al. Complex regulation of the lactase-phlorizin hydrolase promoter by GATA-4. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **287**, G899–G909 (2004).
23. Hinkel, I. et al. Cdx2 controls expression of the protocadherin Mucdh1, an inhibitor of growth and beta-catenin activity in colon cancer cells. *Gastroenterology* **142**, 875–885 e873 (2012).
24. Mutoh, H. et al. Cdx2 specifies the differentiation of morphological as well as functional absorptive enterocytes of the small intestine. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 867–871 (2005).
25. Bonhomme, C. et al. The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* **52**, 1465–1471 (2003).
26. Aoki, K. et al. Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its nontranscriptional function that stabilizes p27Kip1. *Cancer Res.* **71**, 593–602 (2011).
27. Olsen, A. K. et al. Regulation of APC and AXIN2 expression by intestinal tumor suppressor CDX2 in colon cancer cells. *Carcinogenesis* **34**, 1361–1369 (2013).
28. Beaulieu, J. F. & Menard, D. Isolation, characterization, and culture of normal human intestinal crypt and villus cells. *Methods Mol. Biol.* **806**, 157–173 (2012).
29. Coleman-Derr, D. & Zilberman, D. Deposition of histone variant H2A.Z within gene bodies regulates responsive genes. *PLoS Genet.* **8**, e1002988 (2012).
30. Faber, K. et al. CDX2-driven leukemogenesis involves KLF4 repression and deregulated PPARGamma signaling. *J. Clin. Invest.* **123**, 299–314 (2013).
31. Benoit, Y. D. et al. Cooperation between HNF-1alpha, Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **298**, G504–G517 (2010). [pii]10.1152/ajpgi.00265.2009.
32. Shen, T. et al. Brain-specific deletion of histone variant H2A.z results in cortical neurogenesis defects and neurodevelopmental disorder. *Nucleic Acids Res.* **46**, 2290–2307 (2018).
33. Barker, N. et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003–1007 (2007).
34. Mesquita, P. et al. Human MUC2 mucin gene is transcriptionally regulated by Cdx homeodomain proteins in gastrointestinal carcinoma cell lines. *J. Biol. Chem.* **278**, 51549–51556 (2003).
35. Nguyen, T. T. et al. Cdx2 regulates gene expression through recruitment of Brg1-associated switch-sucrose non-fermentable (SWI-SNF) chromatin remodeling activity. *J. Biol. Chem.* **292**, 3389–3399 (2017).
36. Fietze, S. et al. Cell type-specific binding patterns reveal that TCF7L2 can be tethered to the genome by association with GATA3. *Genome Biol.* **13**, R52 (2012).
37. Fazio, T. G., Huff, J. T. & Panning, B. An RNAi screen of chromatin proteins identifies Tip60-p400 as a regulator of embryonic stem cell identity. *Cell* **134**, 162–174 (2008). [pii]10.1016/j.cell.2008.05.031.
38. Benoit, Y. D. et al. Polycomb repressive complex 2 impedes intestinal cell terminal differentiation. *J. Cell Sci.* **125**, 3454–3463 (2012).
39. Roostae, A., Benoit, Y. D., Boudjadi, S. & Beaulieu, J. F. Epigenetics in intestinal epithelial cell renewal. *J. Cell Physiol.* **231**, 2361–2367 (2016).
40. Domasch, R., Kurscheid, S., Nekrasov, M., Han, S. & Tremethick, D. J. The histone variant H2A.Z is a master regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Rep.* **21**, 943–952 (2017).
41. Yang, H. D. et al. Oncogenic potential of histone-variant H2A.Z.1 and its regulatory role in cell cycle and epithelial-mesenchymal transition in liver cancer. *Oncotarget* **7**, 11412–11423 (2016).
42. Montorsi, L. et al. Expression of mu-protocadherin is negatively regulated by the activation of the beta-catenin signaling pathway in normal and cancer colorectal enterocytes. *Cell death Dis.* **7**, e2263 (2016).
43. Andersson, K. B., Winer, L. H., Mork, H. K., Molkenin, J. D. & Jaisser, F. Tamoxifen administration routes and dosage for inducible Cre-mediated gene disruption in mouse hearts. *Transgenic Res.* **19**, 715–725 (2010).
44. Tyteca, S., Vandromme, M., Legube, G., Chevillard-Briet, M. & Trouche, D. Tip60 and p400 are both required for UV-induced apoptosis but play antagonistic roles in cell cycle progression. *EMBO J.* **25**, 1680–1689 (2006).
45. Agudelo, D. et al. Marker-free coselection for CRISPR-driven genome editing in human cells. *Nat. methods* **14**, 615–620 (2017).

Acknowledgements

We thank Elizabeth Herring for reviewing the manuscript, Cécile Coiffait and Rémi Boudou for their help in the set-up of the in vivo and preliminary experiments, and also Dr Violette Morales (CBI—LMGM) and Dr Yvan Canitrot (CBI—LBCMCP) for their technical support in nucleosome mobility assays and CRISPR-Cas9 experiments, respectively. We thank the ABC animal facility of the CBI and ANEXPLO for housing the mice. Microscopy experiments were performed at the Toulouse Réseau Imagerie TRI facility located at the Centre for Integrative Biology (CBI) of Toulouse. This work was supported by a grant from the Fondation ARC as a “Programme ARC” to DT. JR is recipient of a studentship from the French Ministry of Research.

Author contributions

J.R., L.B., M.C.-B., F.E.: Acquisition of data, analysis and interpretation of data. J.F.B.: Technical and material support. J.F.B., M.C.-B., D.T., F.E.: Critical revision of the manuscript for important intellectual content. J.R., F.E.: Statistical analysis, drafting of the manuscript. D.T., F.E.: Study supervision. D.T.: Obtained funding

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09899-z>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Journal peer review information: *Nature Communications* thanks Olivier Binda and the other anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



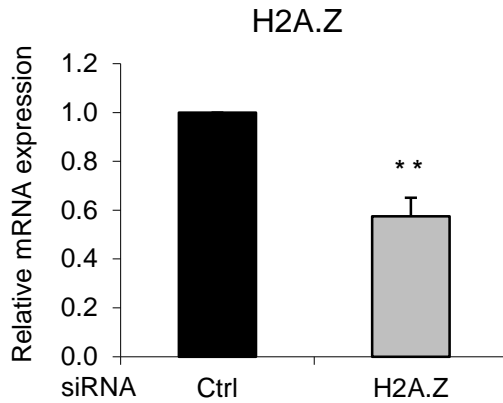
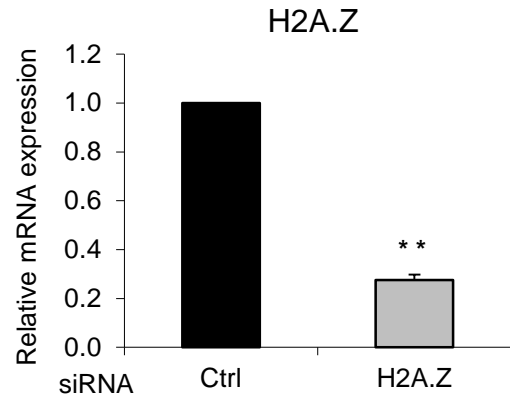
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Central role of H2A.Z in intestinal homeostasis : an epistatic relationship with CDX2 integrates Wnt signaling

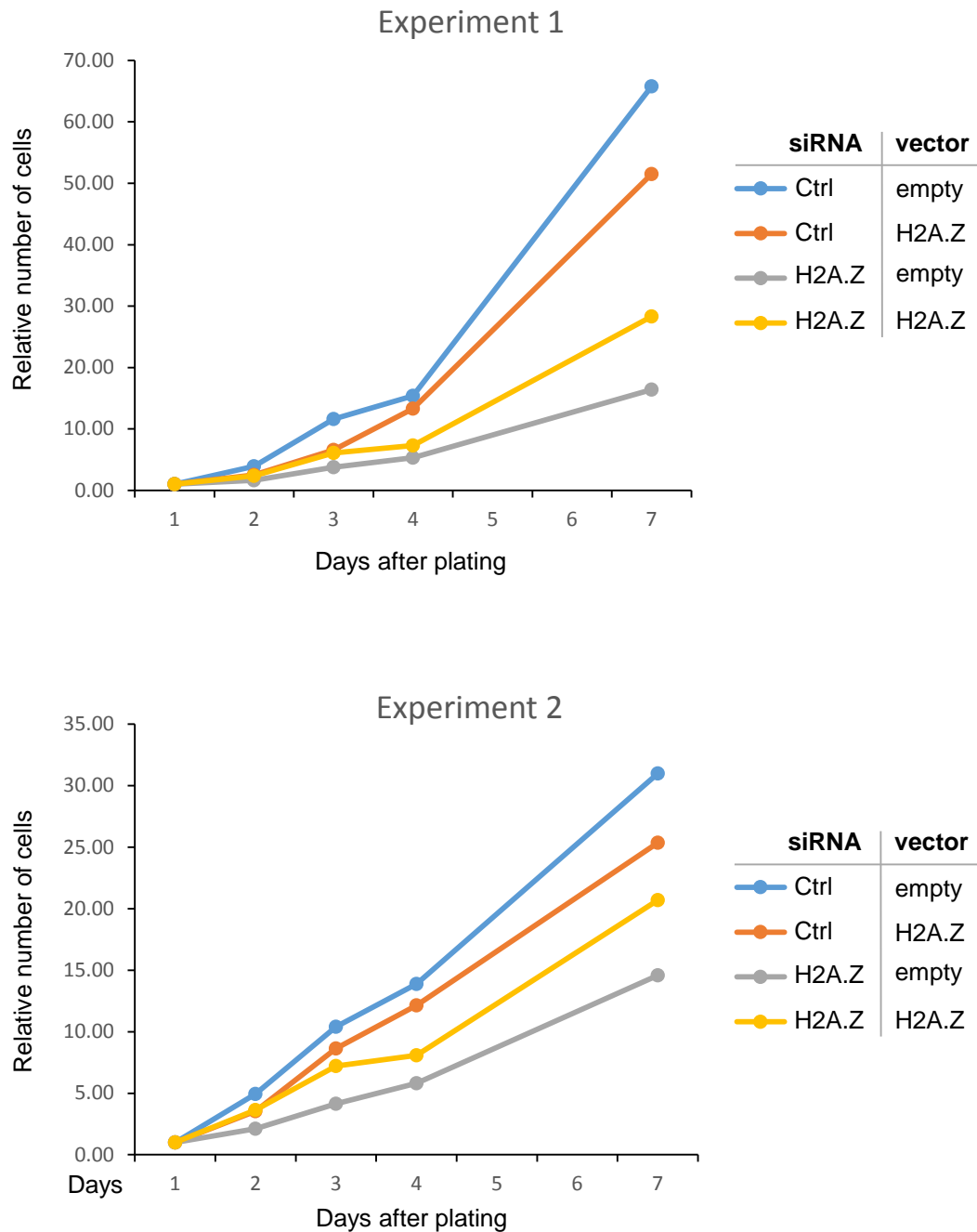
Rispa J. *et al.*

Supplementary Information

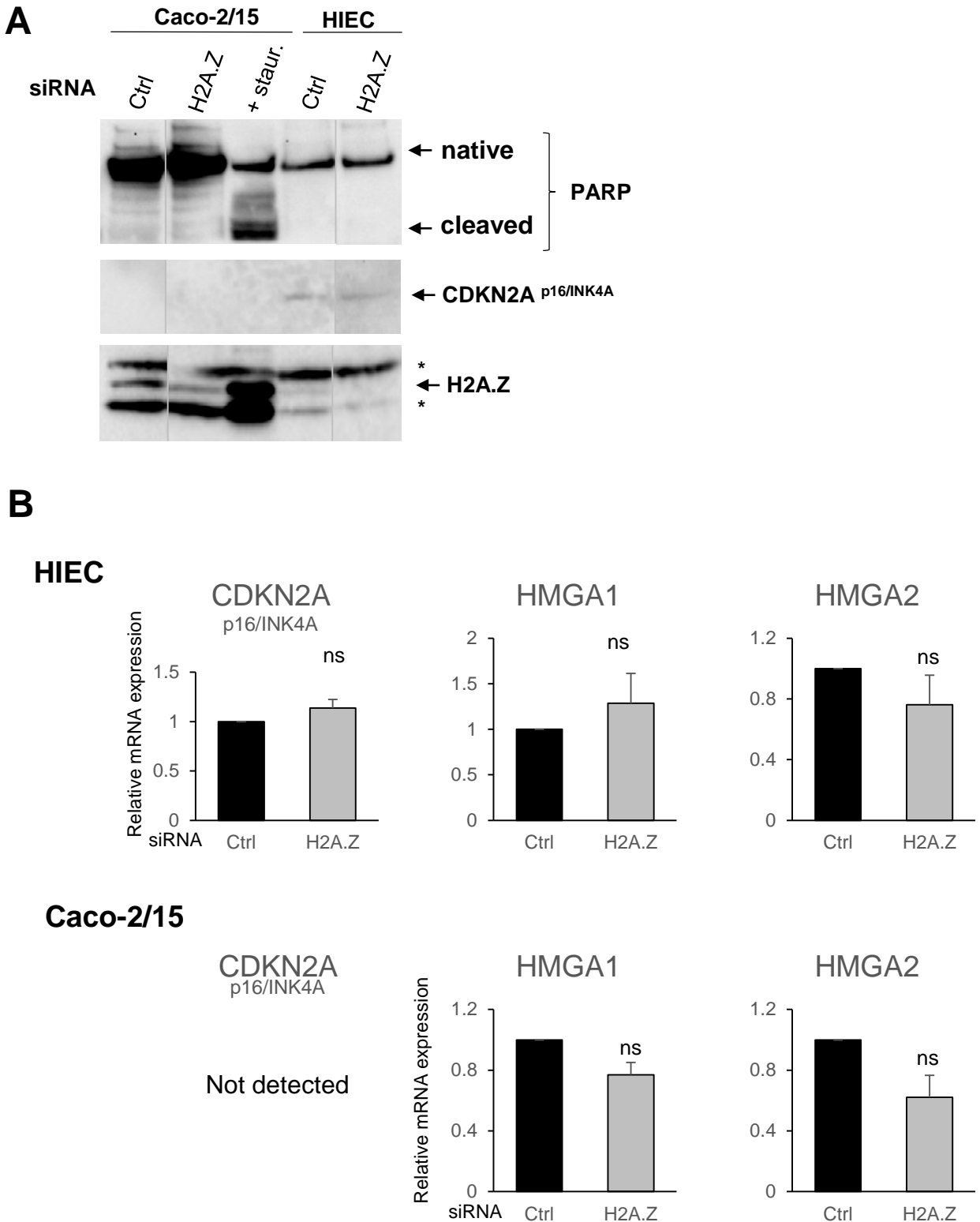
siRNA serie 1**siRNA serie 2**

Supplementary Figure 1: Silencing, in HIEC cells, of siRNA-targeted H2A.Z messenger.

Two different series of siRNA were used to test the proliferation abilities of cells (see Figure 1A). The mean and standard error are shown (n=5 independent experiments). Statistical analysis was done using Student's t-Test (**, $p < 0.02$ vs control siRNA).

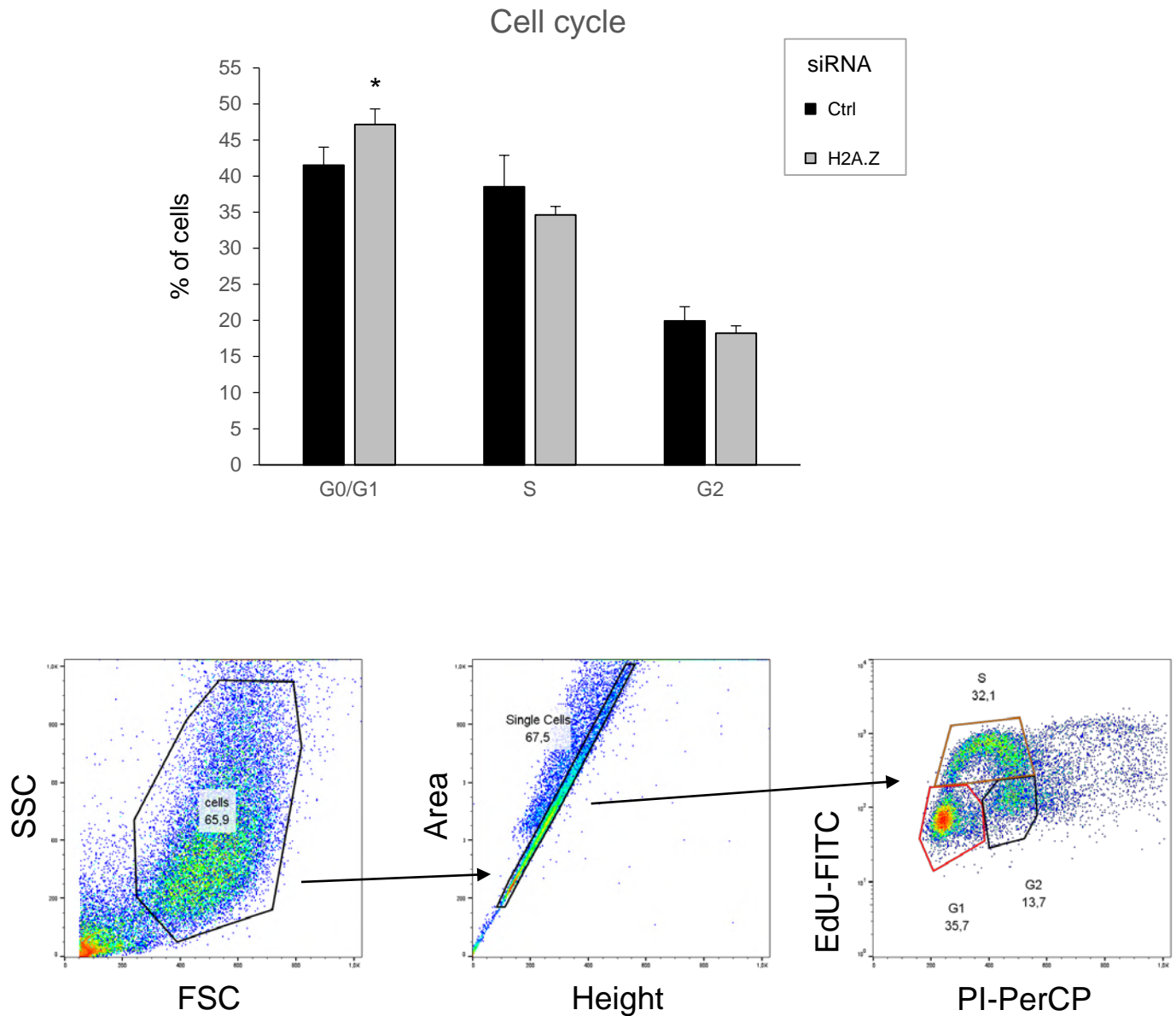


Supplementary Figure 2: Complementation of H2A.Z knock-down partially reverses the growth impairment. Caco-2/15 cells were transfected using siRNAs control or directed against H2A.Z and the cell number was measured and represented relative to 1 for the day 1 after transfection and plating. Two independent representative experiments are shown.



Supplementary Figure 3: Expression of apoptosis and senescence markers upon siRNA treatment.

A) Caco-2/15 and HIEC cells were transfected using indicated siRNAs and proteins were harvested 3 days later and analyzed by western-blot using indicated antibodies. A batch of Caco-2/15 cells were treated using 200nM staurosporine (+stauro) for 16 hours to induce apoptosis and serve as positive control. Stars indicate non specific bands. B) HIEC and Caco-2/15 cells were transfected using indicated siRNA. Three days later, mRNA were harvested and analyzed by RT-qPCR. The mean and standard error are shown (n=3 independent experiments).

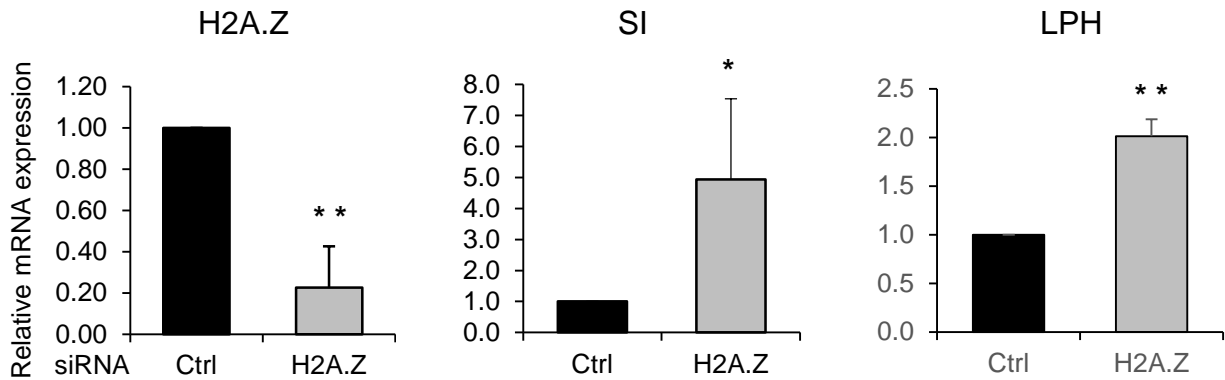
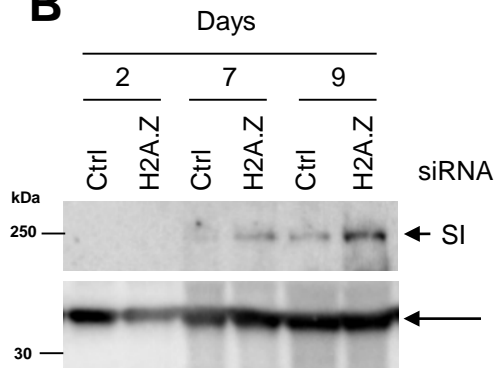
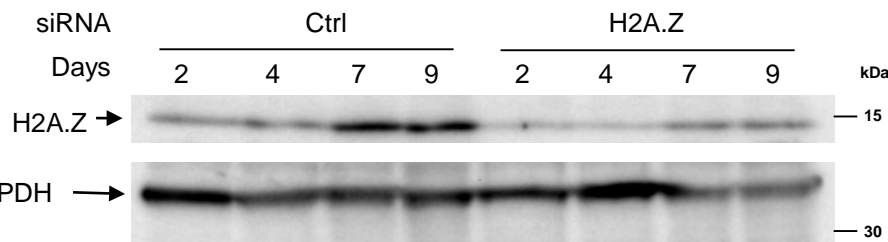


Supplementary Figure 4 : Impact of H2A.Z knock-down on the cell cycle in Caco-2/15 cells.

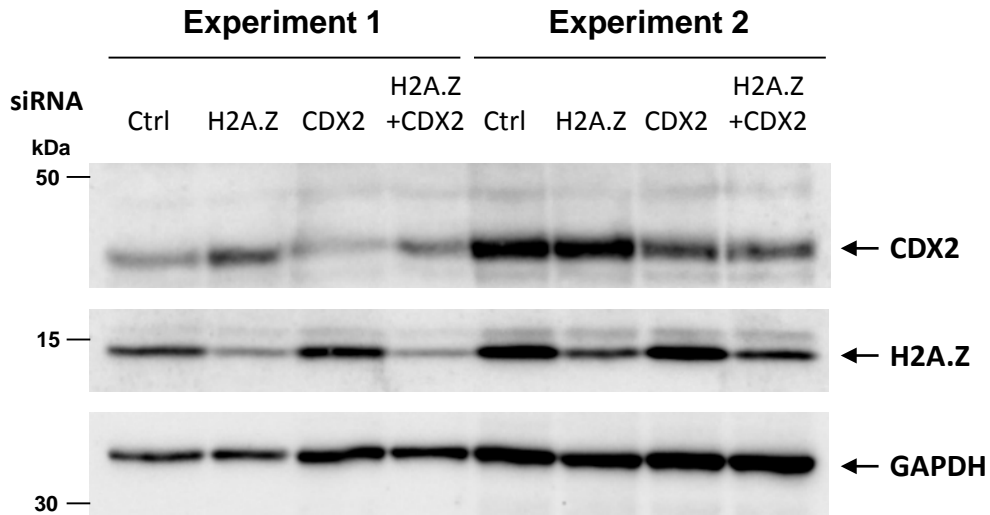
Caco-2/15 cells were transfected using indicated siRNA. 72 hours later, cells were treated using EdU for 2 hours and harvested for cell cycle analysis (upper panel) by flow cytometry (using FACScalibur).

The mean and standard error from three independent experiment are shown (*, $p < 0.05$ vs control siRNA).

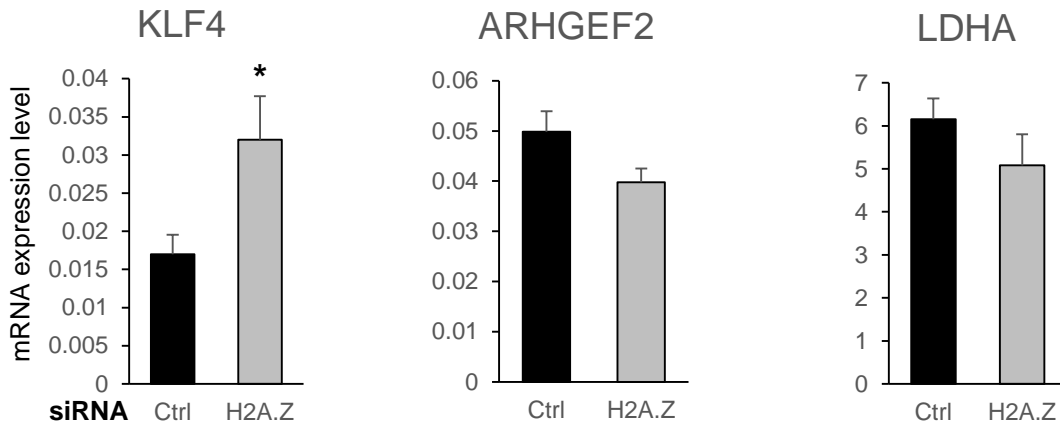
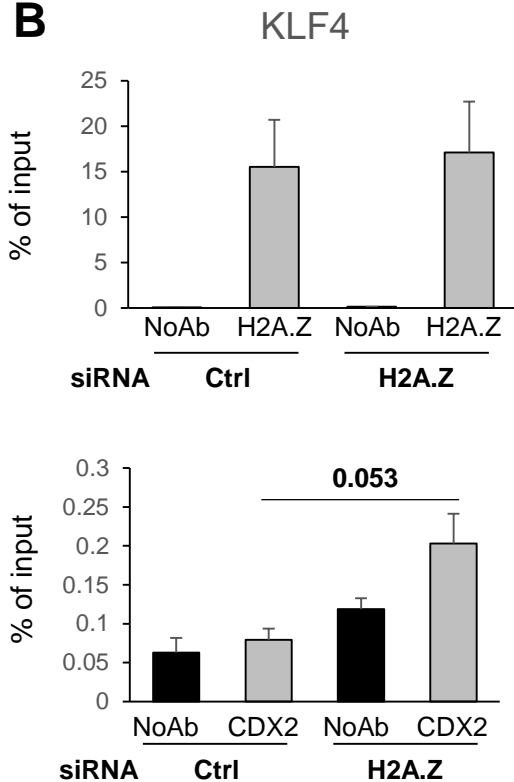
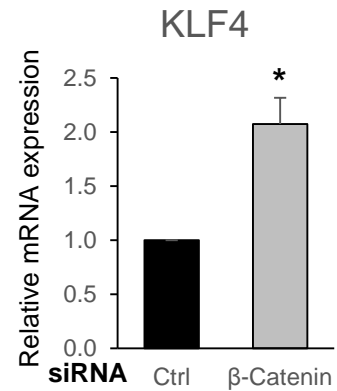
The gating strategy is also shown in lower panels.

A**B****C****Supplementary Figure 5:** Impact of H2A.Z knock-down on gene expression.

A) As in Figure 2A, gene expression in Caco-2/15 transfected using another H2A.Z-targetting siRNA (72h after transfection). B) Kinetic analysis of Sucrase-Isomaltase induction upon indicated siRNAs transfection, at mRNA (lower panel) or protein (upper one) levels. The mean of 3 independent experiments is shown for RT-qPCR experiments. C) As in B, kinetic analysis, by western blot (protein) and RT-qPCR (mRNA), of H2A.Z expression in Caco-2/15 transfected using H2A.Z siRNA at Day 0. Results for a representative experiment (western-blot) or the mean of 3 experiments (RT-qPCR) are shown.

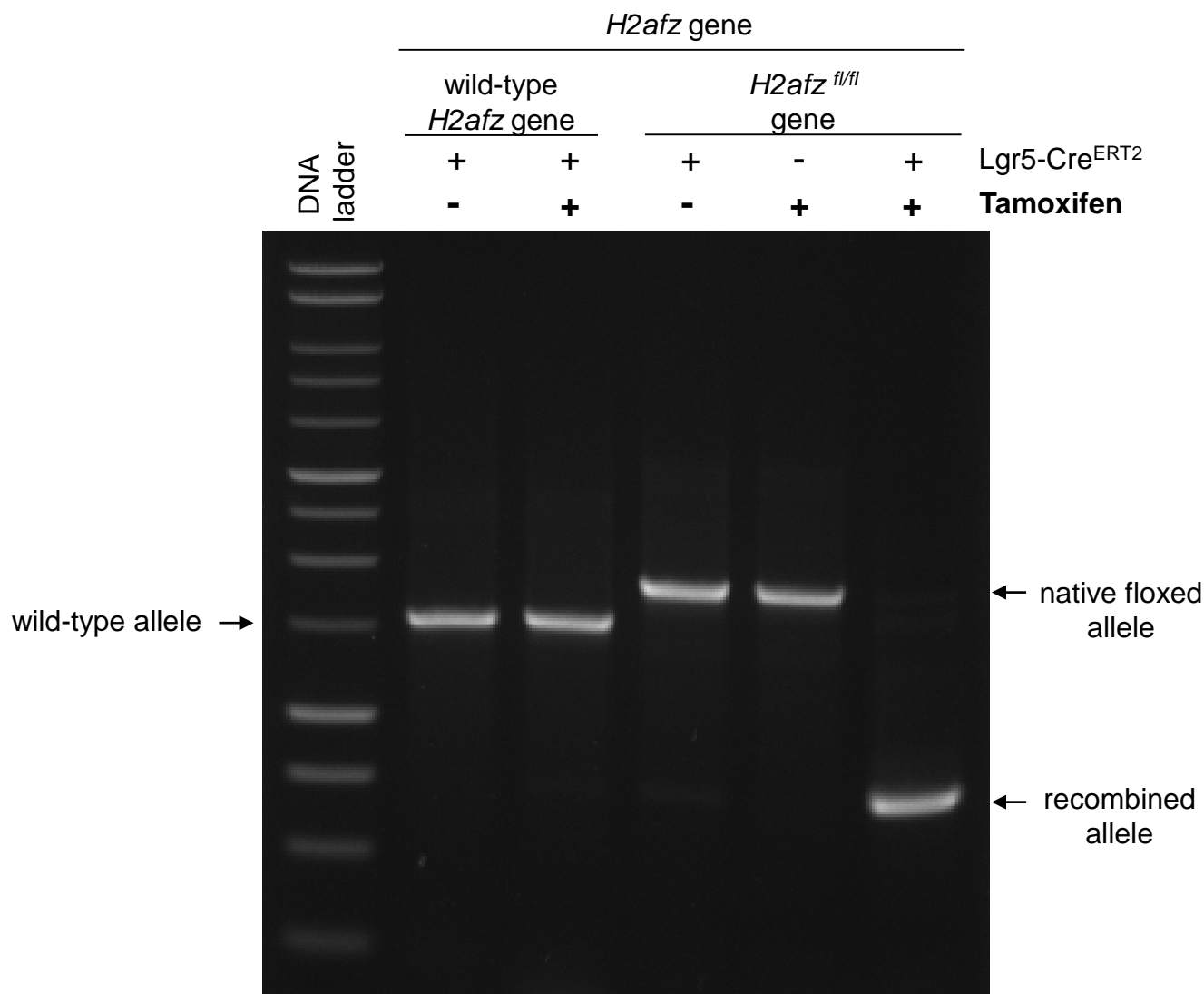


Supplementary Figure 6: Western-blot analysis of H2A.Z and CDX2 protein levels upon siRNA treatments. Caco-2/15 cells were transfected using indicated siRNAs. Three days later, proteins were harvested and analyzed by western-blot using antiH2A.Z or anti-CDX2 antibodies. GAPDH serves as loading control. Results of two independent experiments are shown.

A**B****C**

Supplementary Figure 7 : Analysis of mRNA expression and promoter enrichment of other H2A.Z target genes.

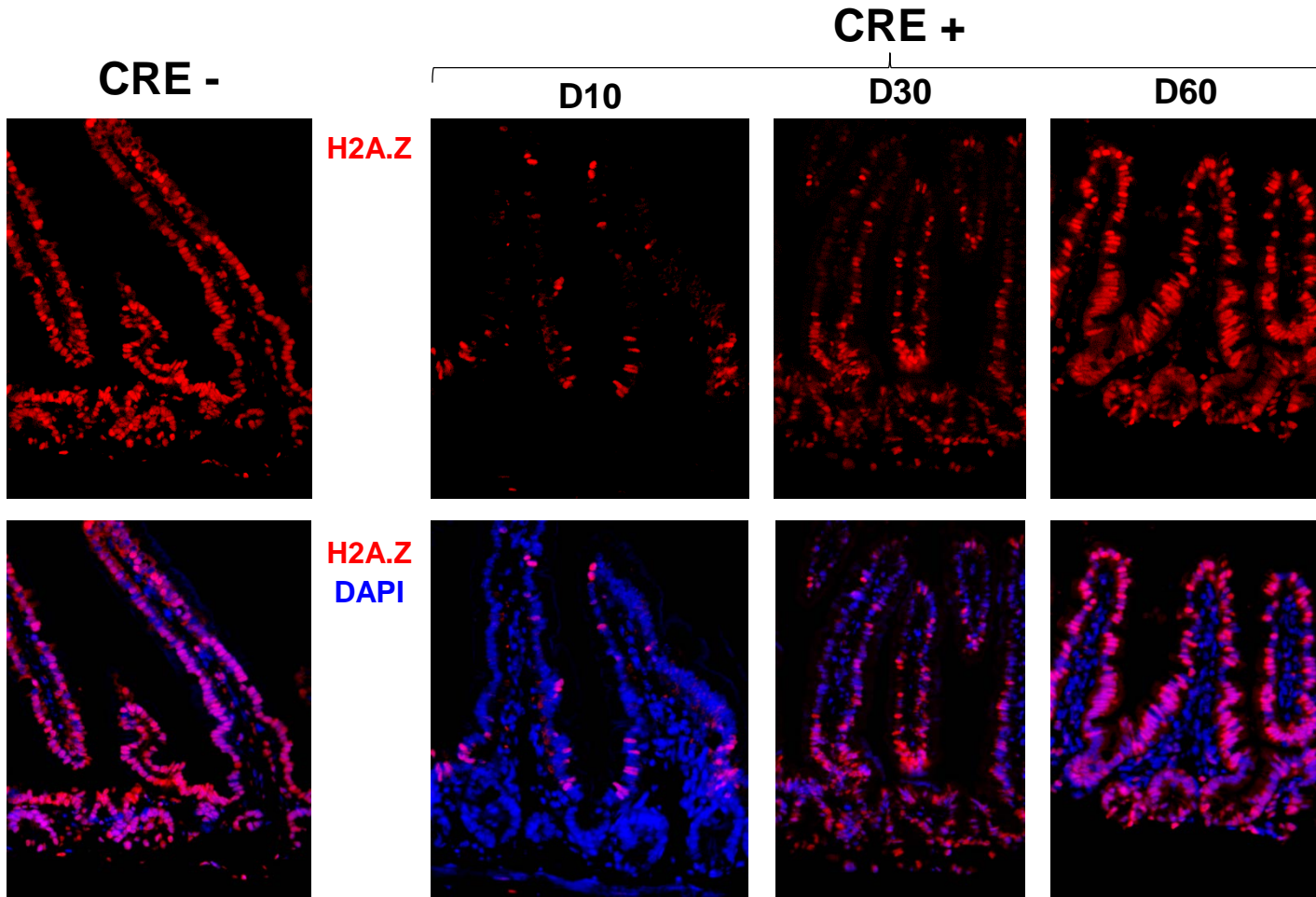
A) mRNA of Caco-2/15 cells were obtained and analyzed by RT-qPCR for KLF4, ARHGEF2 and LDHA mRNA levels, as described for Figure 2A. B) As for Figures 5B and 5C, for promoter of *KLF4*. C) Same as Figure 6C for *KLF4* expression.



Supplementary Figure 8 : Genotyping of *H2afz* gene.

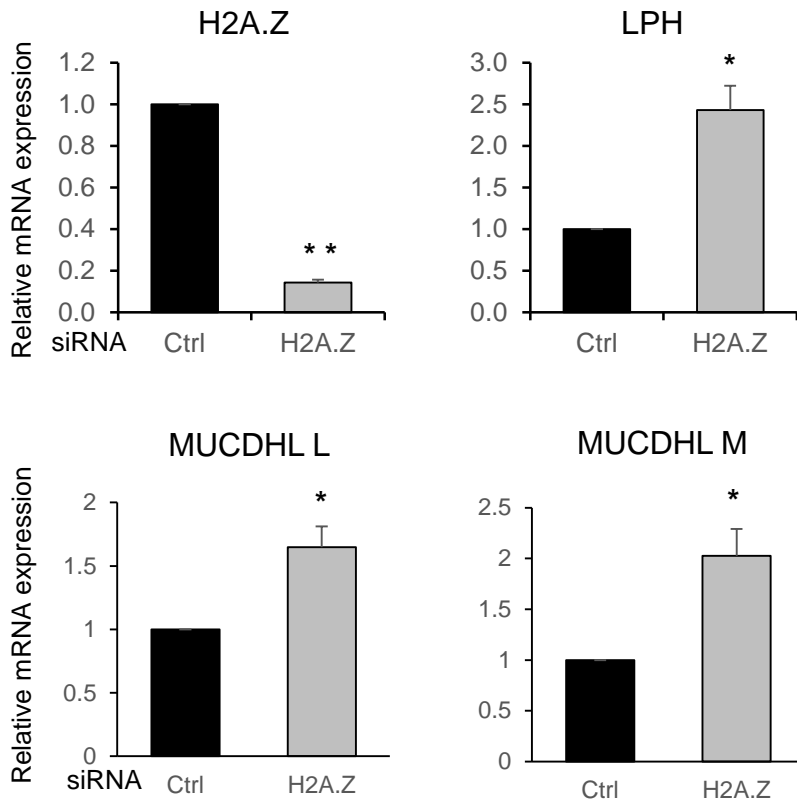
Genomic DNA extracted from intestinal epithelium of representative mice, harbouring the indicated genotypes, and after Tamoxifen treatment or not, was analyzed by PCR. The DNA recombination is observed only in *H2afz*^{fl/fl} + *Lgr5*-CRE^{ERT2} strain upon Tamoxifen treatment.

Note however that the larger non-recombined allele will certainly have disadvantage for amplification compared to the shorter recombined band and could be minored in this panel (recombination efficiency may be overestimated).



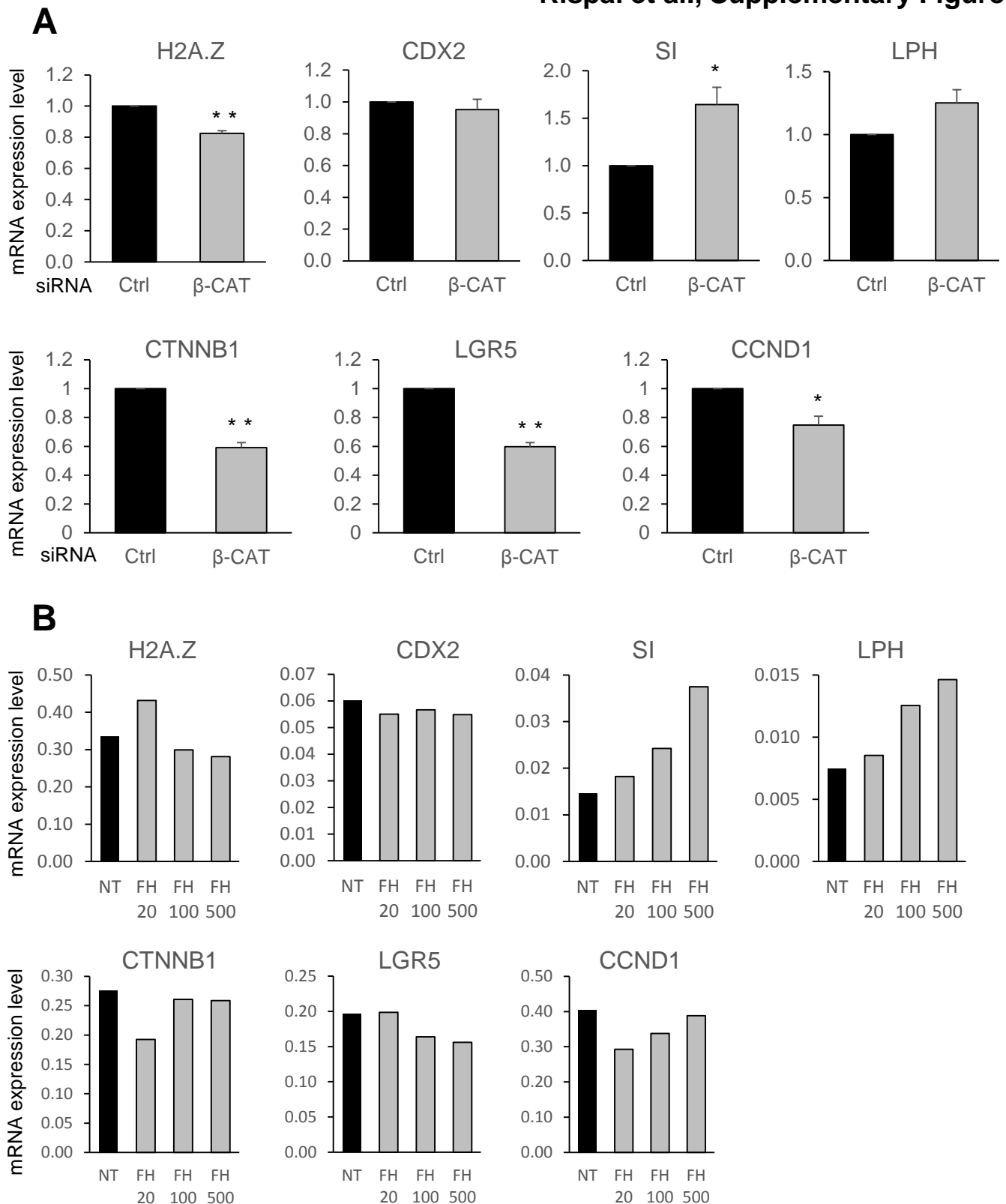
Supplementary Figure 9 : Long-term evolution of H2A.Z staining in tamoxifen-induced mice.

Mice were subjected to tamoxifen treatment for 10 days, as described for Figure 3. Mice were then euthanized immediately or after a 20 days or a 50 days recovery period (mice being fed with normal food during these recovery periods). Then, intestine were dissected and stained using an H2A.Z antibody or DAPI. A representative panel for each time is shown.

A

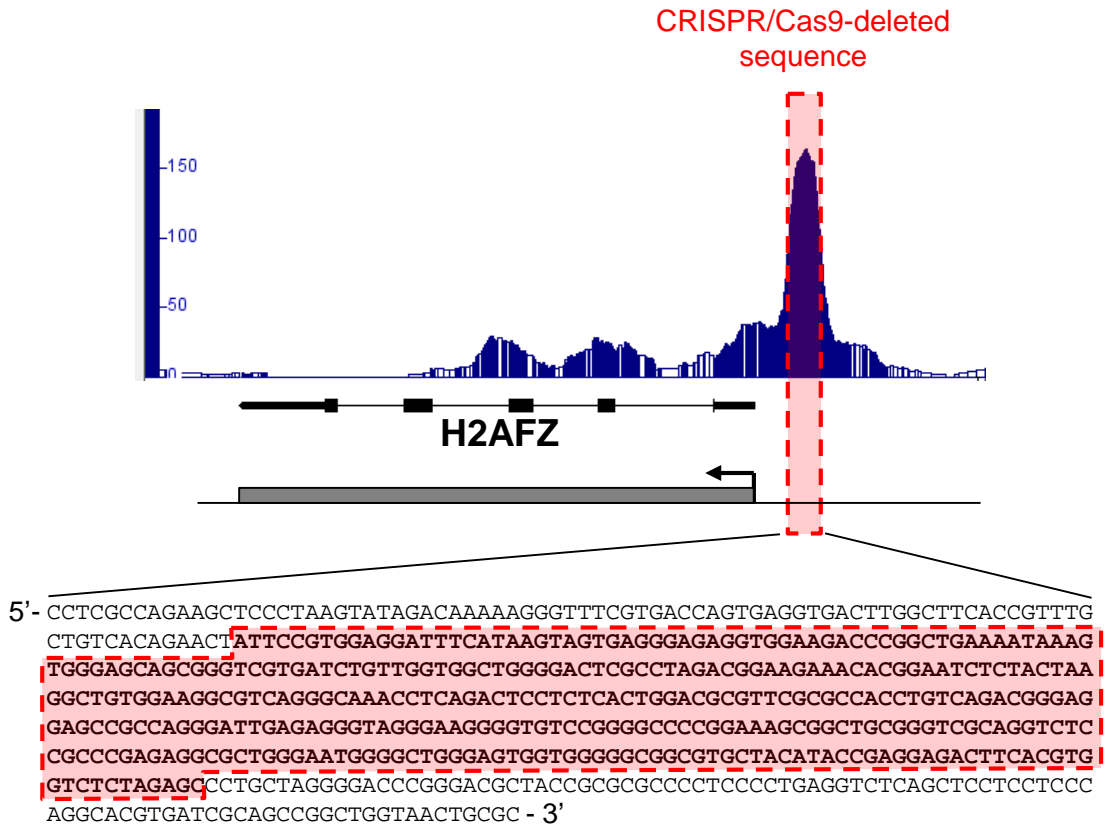
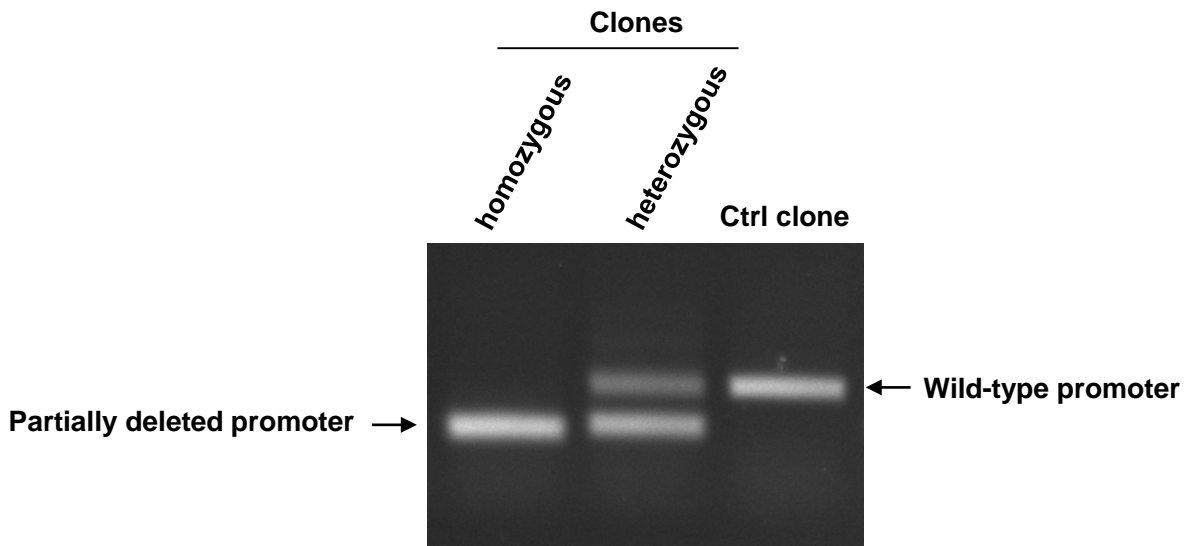
Supplementary Figure 10 : Gene expression upon siRNA-mediated H2A.Z silencing in Caco-2/15 cell samples used in ChIP experiments.

The mean and standard error of 3 experiments is shown (**, $p < 0.02$; *, $p < 0.05$ vs control siRNA).



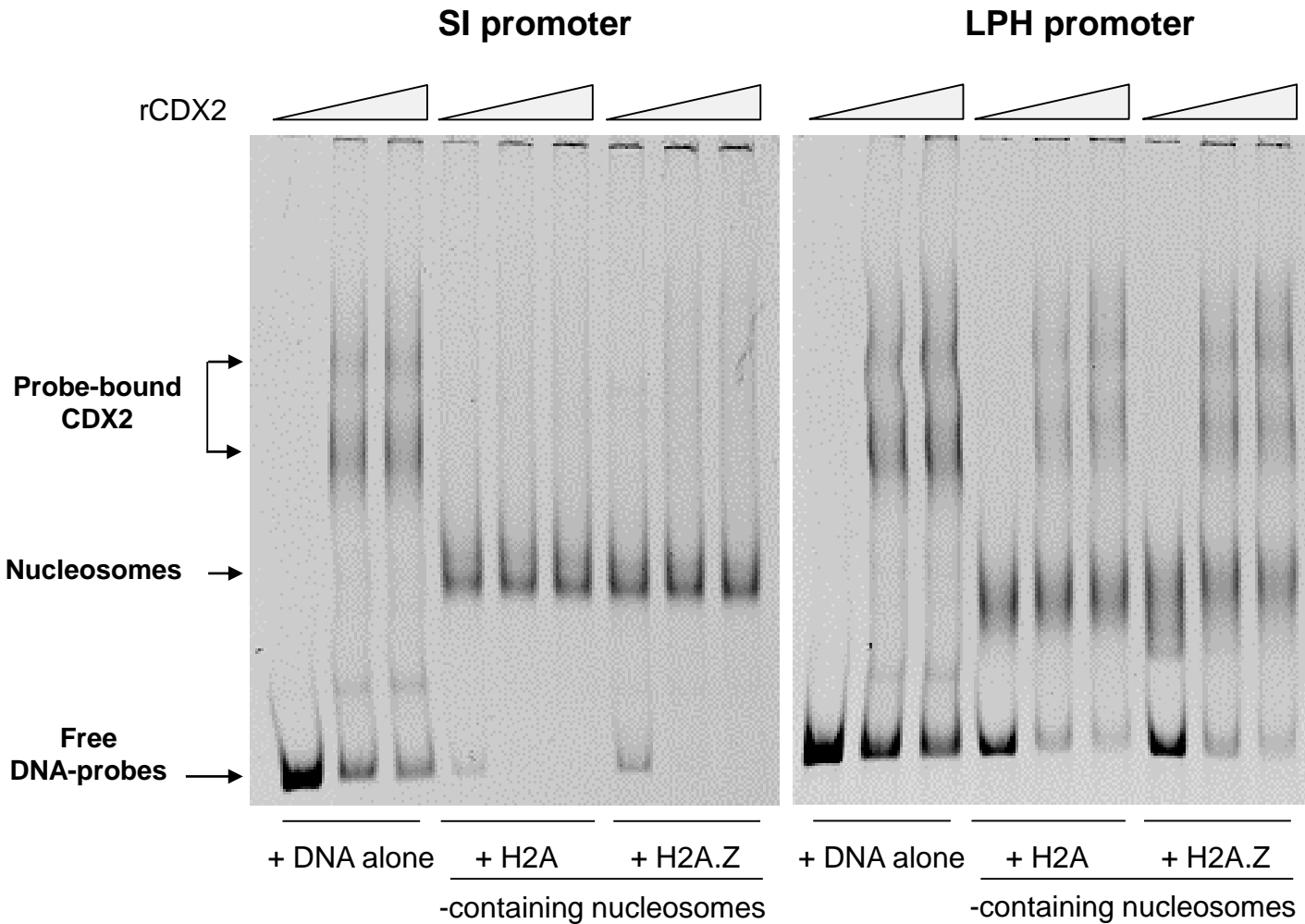
Supplementary Figure 11: Gene expression upon inhibition of the Wnt pathway activity.

A) Using another β -catenin -targetting siRNA, RT-qPCR analysis was done as in Figure 6, to control the silencing efficiency on β -catenin (*CTNNB1* gene expression), the expected impacts on Wnt targets (*LGR5* and *CCND1*) and to study the effects on indicated genes expression in Caco-2/15. The mean and standard error of 4 experiments is shown (**, p<0.02; *, p<0.05 vs control siRNA). B) Gene expression upon dose-response of FH535-mediated Wnt inhibition in Caco-2/15 cells. A representative experiment is shown.

A**Tcf7L2 enrichment in HCT116 cells****B**

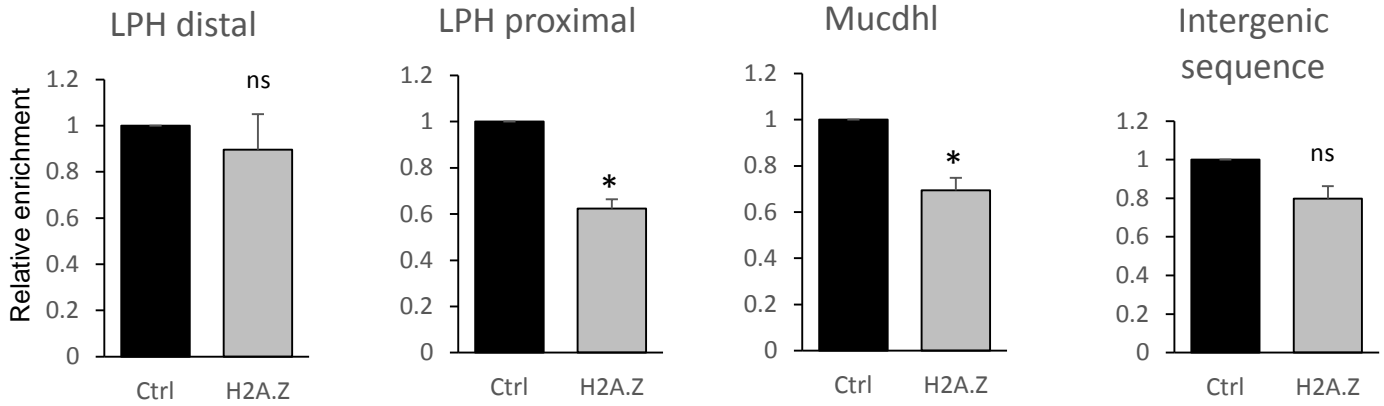
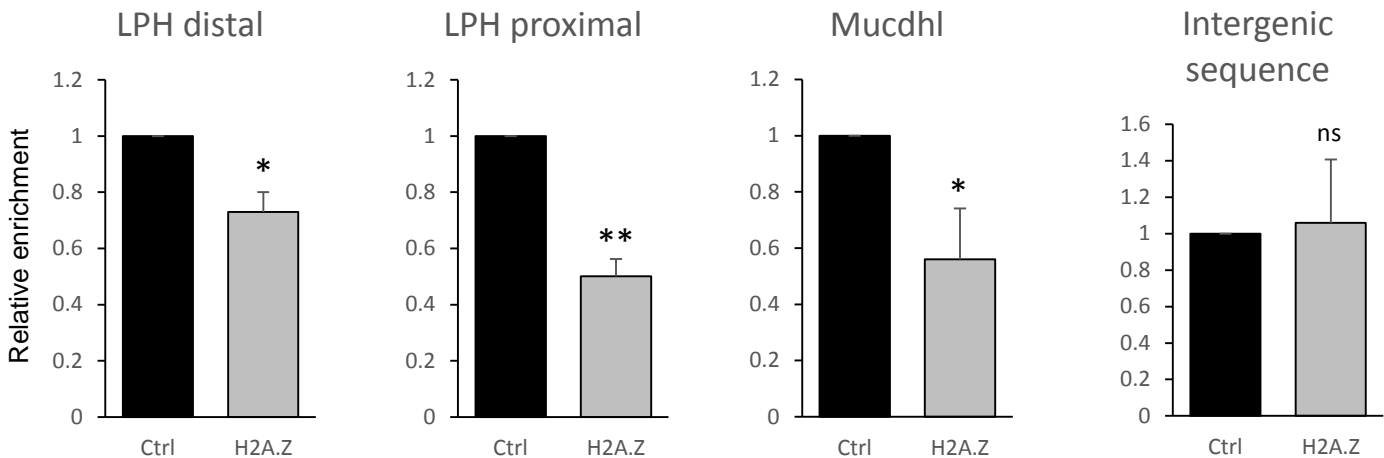
Supplementary Figure 12 : CRISPR-Cas9 -mediated deletion of the TCF7L2-binding region on the H2A.Z promoter in HCT116 cells.

A) The strategy of is drawn. Data from Frietze et al., 2012 were analyzed using Integrated Genome Browser 9.0.2 to visualize the peaks. B) Clones of CRISPR-edited HCT116 cells were isolated, grown, and genomic DNA were harvested and tested by PCR using primers described in Supplementary Table 6.



Supplementary Figure 13: *In vitro* nucleosomes reconstitution and assays for CDX2 binding

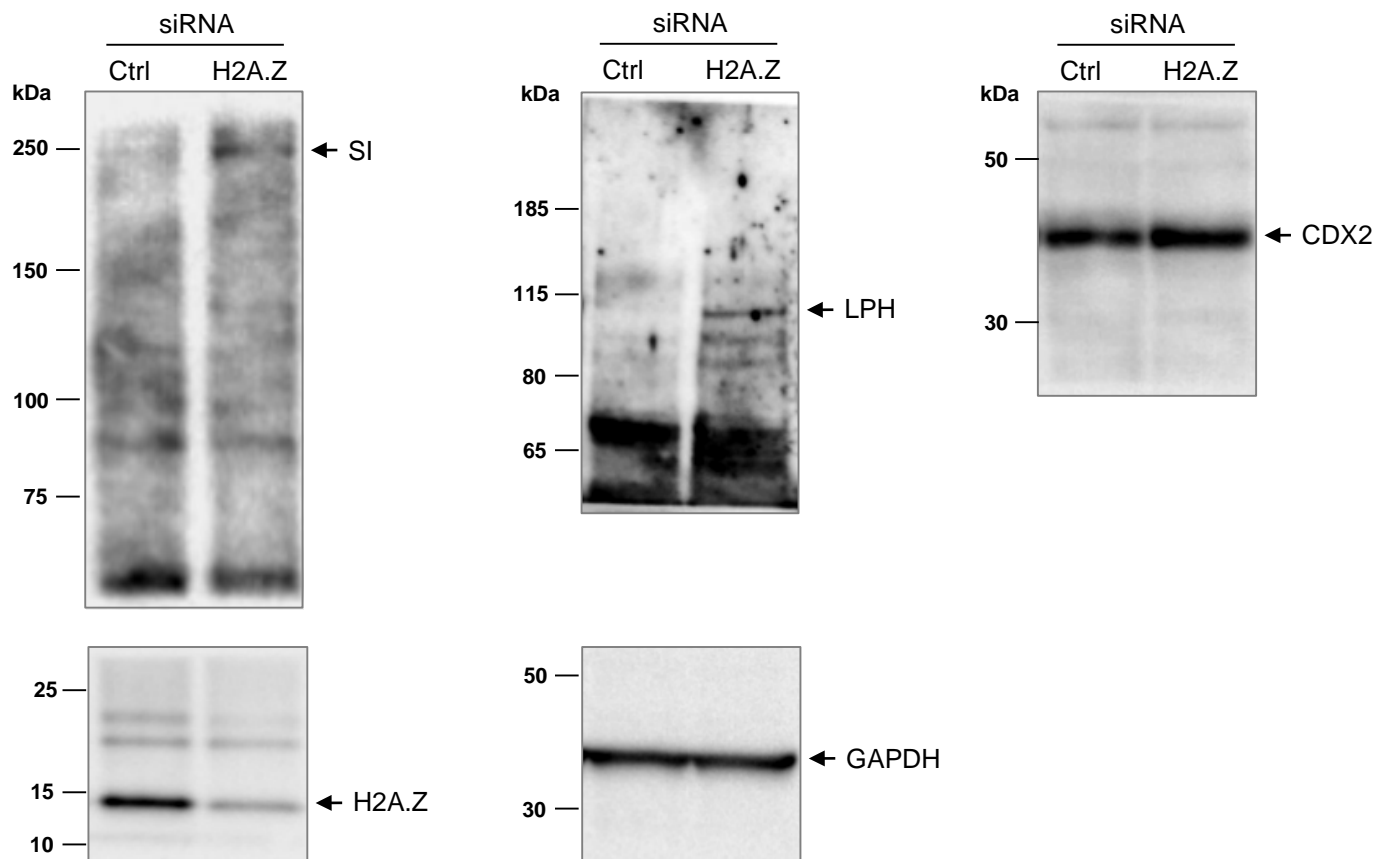
Nucleosomes were reconstituted using recombinant H2A-H2B or H2A.Z-H2B, added to H3-H4 tetramers and fluorescence-labelled DNA probes for *SI* or *LPH* promoters, as described in the manuscript. Then, increasing quantities of recombinant CDX2 were added to such nucleosomes or to free DNA probes. Gels were analyzed using Typhoon device.

A**H3 enrichment****B****H2A.Z enrichment**

Supplementary Figure 14 : ChIP analysis of H3 and H2A.Z binding on target genes promoters upon H2A.Z knock-down

A) Caco-2/15 cells were transfected using H2A.Z-targetting or control siRNA and enrichment in H3 binding on chromatin was analyzed, 72 hours later, by ChIP experiments, as described in the Methods section of the manuscript. Results are presented as the mean of percentage of input and standard error in three experiments.

B) Same as in A for H2A.Z ChIP on the same chromatin samples.



Supplementary Figure 15: Original unprocessed western-blot panels from Figure 2A.

Genotyping primers

Gene	Forward primers	Reverse primers
Tail samples		
<i>wild-type or floxed H2afz</i>	CGCCTTGgTAATTCTATCTTCTCC	CGCCAGTTAACACACATGTGATC
wild-type Lgr5	ATACCCCATCCCTTTTGAGC	CTGCTCTCTGCTCCCAGTCT
Lgr5-CRE insert	GAACTTCAGGGTCAGCTTGC	CTGCTCTCTGCTCCCAGTCT
Intestinal epithelium		
<i>wild-type and (native or recombined) floxed H2afz</i>	CGCCTTGgTAATTCTATCTTCTCC	AAGCCTCCAACCTTGCTCAAA

Supplementary Table 1: Genotyping primer sequences.

siRNA sequence

siRNA	Sequence
Ctrl (1)	CAUGUCAUGUGUCACAUCU
Ctrl (2)	ACUCAAACUCACGAAGGAA
H2A.Z (1)	GUAGUGGGUUUUGAUUGAG
H2A.Z (2)	AAAGGACAACAGAAGACUG
CDX2	CCAGGACGAAAGACAAUA
β-CATENIN (1)	GGAGCUAAAAUGGCAGUGC
β-CATENIN (2)	GUGGGUGGUAUAGAGGCUC

Supplementary Table 2: Sequences of siRNAs.

Human primers

Gene	Forward primers	Reverse primers
<i>β2M</i>	AAAGATGAGTATGCCTGCCG	CCTCCATGATGCTGCTTACA
<i>H2A.Z</i>	CCTTTTCTCTGCCTTGCTTG	CGGTGAGGTA CTCCAGGATG
<i>CDX2</i>	TCCCTCGGCAGCCAAGTGAA	TCGGCTTTCTCCGGATGGT
<i>SI</i>	ATGTGAAGGTTGCCCAAAC	AAAATTGGCCATGTTTTCCA
<i>LPH</i>	CCAGGAGATATGTTCA GTTC	CACTCTCTGTAAATTCTGGC
<i>HNF1α</i>	GCCCTGTACACCTGGTACGT	GCTCATCACCTGTGGGCTCT
<i>MUCDHL L</i>	CTCCCACCAACCAACCAC	CATATCCACCACCGAGAAGC
<i>MUCDHL M</i>	TGGAGGGAGAGGTTGTGCT	GGCCGCCACCTGTGGAGG
<i>CTNNB1</i>	TTCGTGCACATCAGGATACC	CTGCACAAACAATGGAATGG
<i>LGR5</i>	TGCTCTTCACCAACTGCATC	CTCAGGCTCACCAGATCCTC
<i>CCND1</i>	CGTGGCCTCTAAGATGAAGG	CTGGCATTTTGGAGAGGAAG
<i>CDKN2A</i>	CTGCCCAACGCACCGAATAG	ACCACCAGCGTGTCAGGAA
<i>HMGA1</i>	ATGAGTGAGTCGAGCTCGAAG	TAGGTGTTGGCACTTCGCTG
<i>HMGA2</i>	AAGCCACTGGAGAAAAACGGC	ATCCA ACTGCTGCTGAGGTAG
<i>KLF4</i>	CCGCTCCATTACCAAGAGC	TGCCTTGAGATGGGA ACTCT
<i>ARHGEF2</i>	ATCTACCCCTCCGACAGCTT	GGATTCCACGGATAGGGTTC
<i>LDHA</i>	TTGGTCCAGCGTAACGTGAAC	CCAGGATGTGTAGCCTTTGAG

Murine primers

Gene	Forward primers	Reverse primers
<i>β2m</i>	CCTGGTCTTTCTGGTGCTTG	TATGTTCTGGCTTCCCATTCT
<i>Si</i>	GCTGGTCGATGGGGAGGA	CCAACGAGCACAGAGGTGGTAT
<i>Lph</i>	CCTTGAGCCCAAAGTGAAAG	GGACGTACAGCTCAGGAAGG
<i>Chga</i>	TTTTTGCCCTTCCTGTGAAC	GGTGTCGCAGGATAGAGAGG
<i>Muc2</i>	TGATGGCCATTGAGGTGGAG	CTGGCCCTTTGTGTTGTTGC
<i>Muc4</i>	GCTACAGAGCCAAGTGACAC	AAGCCCATGAGCACCCGGTT
<i>Lys</i>	TGGCTGACTGGGTGTGTTTA	CACTGCAATTGATCCCACAG
<i>Cryptdin</i>	GCACAGAAGGCTCTGCTCTT	ACCCAGATTCCACATTCAGC
<i>Cdx2</i>	TCCCTAGGAAGCCAAGTGAA	CTGCGGTTCTGAAACCAAAT
<i>Hnf1α</i>	GCACACCCATGAAGACACAG	GGTTCCTACGCCCTTCTTA
<i>Gata4</i>	CTGTGCCAACTGCCAGACTA	GCTTCCGTTTTCTGGTTTGA
<i>Cdx1</i>	TAAGACCCGAACCAAGGACA	GATCTTTACCTGCCGCTCTG
<i>Hnf4α</i>	GGTCAAGCTACGAGGACAGC	ATGTACTTGGCCCACTCGAC
<i>Gata6</i>	CAGCAAGCTGTTGTGGTC	GTCTGGTACATTCCTCCG

ChIP primers

Gene promoter	Forward primers	Reverse primers
<i>LPH</i>	AAAATTAGCCAGGCATCGTG	TTCAGACATTTTCCGGGTTTC
<i>MUCDHL</i>	ACCCATGAGCCGCTCTCCAGTC	TCTGGCGTCTAGGACTGGCGCAGT
<i>Intergenic</i>	AGCACATGGGATTTTGCAGG	TTCCCTCCTTTGTGTCACCA
<i>KLF4</i>	ACTCGCCTTGCTGATTGTCT	CCCCAAAGTCAACGAAGAGA
<i>H2AFZ (internal)</i>	GCGTGCTACATACCGAGGAG	CGGGAGGGAAGAAACAGAG
<i>H2AFZ (both sides)</i>	ACTGATTGCATTGCATGGAC	CGGGAGGGAAGAAACAGAG
<i>H2AFZ (downstream)</i>	TGAGGTCTCAGCTCCTCCTC	CGGGAGGGAAGAAACAGAG

CRISPR-Cas9 tools

Distal PAM :	5'-CACCG GTCACAGAACTATTCCGTGG -3'	
	5'-AAAC CCACGGAATAGTTCTGTGAC C-3'	
Proximal PAM :	5'-CACCG CATACCGAGGAGACTTCACG -3'	
	5'-AAAC CGTGAAGTCTCCTCGGTATG C-3'	
Screening primers	5'-ACTGATTGCATTGCATGGAC-3'	5'- CGGGAGGGAAGAAACAGAG -3'

Gene	Forward primers	Reverse primers
<i>Si</i>	Cy5-CTACTTTCAGGGTTAAGGCTTTT	TTGGATAAGGCTGCCAAAAT
<i>Lph</i>	Cy5-CGGCCCTGATCTTTACATTT	AGGAGGTATGTGGAACCCTTA

Supplementary Table 7 : Mouse genomic DNA amplification primer sequences.

3) Conclusion

Dans cet article, nous avons montré le rôle de H2A.Z1 dans le contrôle de l'homéostasie de l'épithélium intestinal. En effet, ce variant d'histone est essentiel à la prolifération des cellules épithéliales intestinales et à l'inhibition de la différenciation. Nous avons montré que H2A.Z1 contrôle la différenciation en inhibant l'expression de gènes de différenciation du lignage absorbant (*Si*, *Lct*) mais aussi du lignage sécrétoire (*Muc2*, *Muc4*) *in vivo* chez la souris. *In cellulo*, nous avons également montré que cette régulation est épistatique avec le facteur de différenciation clé de la différenciation intestinale : CDX2. Pour cela, H2A.Z1 inhibe la fixation de CDX2 aux niveaux des promoteurs de ses gènes cibles. Enfin, nous avons montré que la dynamique de H2A.Z1 est régulée par la voie Wnt, qui favorise son expression directement via la liaison du facteur de transcription important de la voie : TCF4. Pour conclure, nous avons donc montré, pour la première fois, la régulation de la dynamique de liaison d'un facteur de transcription clé de l'homéostasie épithéliale (CDX2) par une marque chromatinienne (H2A.Z1), sous le contrôle d'une voie de signalisation (Wnt).

II- H2A.Z1 et H2A.Z2 ont des rôles redondants et spécifiques dans le contrôle de l'identité des cellules intestinales

1) Contexte

Nous avons montré que le variant d'histone H2A.Z1 régule l'homéostasie de l'épithélium intestinal en réprimant l'expression de certains gènes de différenciation via l'inhibition de la fixation du facteur de transcription CDX2 aux niveaux des promoteurs de certaines de ses cibles. H2A.Z1 est également important pour la prolifération des cellules épithéliales intestinales, ce qui en fait un régulateur majeur du maintien de l'identité non différenciée des cellules intestinales (Rispal et al., 2019). Or, le variant d'histone H2A.Z est synthétisé sous 2 isoformes, H2A.Z1 et H2A.Z2, codées par 2 gènes différents (respectivement *H2afz* et *H2afv*). Ces deux isoformes ne comptent que 3 acides aminés de différences (Eirín-López et al., 2009). Malgré la forte similarité de séquences, de plus en plus d'études montrent des rôles spécifiques de H2A.Z1 ou de H2A.Z2 dans la régulation de l'expression de groupes de gènes (Dunn et al., 2017; Greenberg et al., 2019; Vardabasso et al., 2015). Dans ce contexte nous avons analysé les rôles spécifiques ou redondants de H2A.Z1 et H2A.Z2 dans le contrôle de l'identité des cellules de l'épithélium intestinal.

2) Résultats

Pour étudier les rôles de chacune des isoformes de H2A.Z, nous avons analysé le renouvellement de l'épithélium intestinal, *in vivo* chez la souris après KO isoforme-spécifique, ainsi que l'expression des gènes marqueurs des différents types cellulaires. Nous avons également analysé les mécanismes de contrôle de l'homéostasie par les isoformes de H2A.Z dans le modèle organoïde et dans les cellules Caco-2/15. Les organoïdes, récapitulant les caractères principaux du tissu, nous ont principalement permis d'analyser le rôle des isoformes sur le « stemness » des cellules souches, alors que le modèle Caco-2/15 a été utilisé pour des études mécanistiques, notamment le suivi du recrutement de H2A.Z1 ou H2A.Z2 au cours de la différenciation (après étiquetage de chaque isoforme par édition du génome). Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article en préparation, certains résultats nécessitant une confirmation et des expérimentations étant en cours ou encore manquantes (mises en évidence par un cadre vert dans le texte et dans les figures). Les

expérimentations réalisées pour la première fois dans cet article sont décrites dans l'annexe : méthodes supplémentaires.

Control of the switch between stemness and cell fate by the isoforms of H2A.Z histone variant.

Jérémy Rispal¹, Clémence Rives¹, Martine Chevillard-Briet¹, Didier Trouche^{1,#} and Fabrice Escaffit^{1,#,*}

¹ LBCMCP, Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, France

These authors jointly supervised this work

Correspondence:

* Corresponding author: Fabrice Escaffit, LBCMCP-UMR5088-CNRS, 118 Route de Narbonne, 31062

Toulouse Cedex 9, France. Phone: +33-5-61-55-81-84; E-mail: fabrice.escaffit@univ-tlse3.fr

Introduction

The intestinal epithelium is one of the most rapidly regenerating tissue, whose complete renewal occurs each 3 to 5 days. This renewal is mediated by the intestinal stem cells (ISC) located at the bottom of the crypts (Barker et al., 2007), which self-renew or divide into progenitor cells. The commitment of progenitors, i.e. the choice between absorptive or secretory lineage, is mainly monitored by the Notch pathway thanks to the two transcription factors: MATH1 and HES1 (Sancho et al., 2015). Indeed, the presence of MATH1 in cells leads to the appearance of secretory fate, whereas its absence triggers the absorptive properties (Kim and Shivdasani, 2011). The Notch pathway is involved in the inhibition of *Math1* expression via HES1. Finally, after the lineage commitment, progenitor cells migrate in the villi to differentiate into enterocytes for the absorptive cells, or into goblet, enteroendocrine or tuft cells for the secretory lineage. The Paneth cells are the only type of differentiate secretory cells which migrate downward.

The role of signaling pathways or transcription factors in the control of the intestinal epithelial homeostasis is well characterized but the involvement of the chromatin is still poorly understood. Indeed, during the identity change of the ISC differentiation, the transcriptome of cells is greatly modified, so chromatin modifications can play an important role (Kazakevych et al., 2017). Recently, we have shown that the histone variant H2A.Z1 is essential for the control of intestinal epithelial homeostasis. Indeed, H2A.Z1 maintains the undifferentiated state of the crypt cells by favoring the proliferation and inhibiting the expression of differentiation genes. The decrease of H2A.Z1 during the migration toward the villi, at least in part due to decrease of Wnt activity, allows the cells to differentiate (Rispoli et al., 2019).

However, the role of H2A.Z2, another isoform of H2A.Z which is encoded by a paralog gene and diverge from H2A.Z1 by only 3 amino acids (Eirín-López et al., 2009), is totally unknown in such context. Recently, some studies have shown specific roles for each isoform in the control of gene expression in melanoma cells (Vardabasso et al., 2015), neurons (Dunn et al., 2017) or neural crest cells (Greenberg et al., 2019). So, in this study, we analyzed the functional specificities or redundancy of each H2A.Z isoform in the intestinal epithelial homeostasis. We have shown that both isoforms are redundant in promoting the proliferation and in the inhibition of secretory cell lineage, but they exert opposite effects in the control of the enterocyte gene expression. Finally, the decrease of total H2A.Z has a positive impact on the epithelial differentiation and the increase of H2A.Z2/H2A.Z1 ratio favors the enterocyte lineage.

Results and discussion

H2A.Z isoforms are essential for the intestinal epithelium maintenance in a redundant manner.

We have previously shown that H2A.Z1⁺ cells have a proliferative advantage compared to H2A.Z1-deficient cells, in cultured cells as well as *in vivo* (Rispalet et al., 2019). This suggests that expression of H2A.Z2 isoform cannot fully compensate this deficiency. But recently, Zhao and collaborators have shown that the intestinal epithelial structure is highly affected (i.e. decreased size of villi) in constitutive double knock-out mice (*Villin-Cre ; H2afz^{fl/fl}/H2afv^{fl/fl}*), whereas H2A.Z1-deficient mice developed normally sized structures (Zhao et al., 2019). Thus, this suggests a partially redundant role *in vivo* of H2A.Z isoforms on intestinal epithelial renewal and maintenance. To precisely characterize the role of each H2A.Z isoform in the maintenance of the intestinal epithelium, we used knock-out mice

models for one or both isoforms in an inducible manner, specifically in the intestinal epithelial stem cells (*Lgr5-Cre^{ERT2}*; *H2afz^{fl/fl}* and/or *H2afv^{fl/fl}*). Ten days after tamoxifen induction, and thus genomic recombination, we observed a strong decrease of the villus height in the double KO mice (Fig.1A and 1B). Note the mosaic pattern of the H2A.Z expression, which is the result of the crypt-villus structures colonization by cells originating from both recombined and wild-type stem cells (typical for such models). However, we did not observe any major effect on the structure size upon H2A.Z1 ((Rispalet al., 2019), Fig.1B and SuppFig.1A) or H2A.Z2 (Fig.1B and SuppFig.1A) independent KO. Note that the analysis of H2A.Z2 KO is complicated due to the lack of specific antibody discriminating this isoform from H2A.Z1. Thus, in immunohistofluorescence experiments, we cannot see the recombined cells for H2A.Z2 with the staining of total H2A.Z (SuppFig.1A), probably due to the big difference of expression between both isoforms (Fig.7D, H2A.Z2/H2A.Z1 ratio = 0.25). However, the difference between H2A.Z1 single KO and H2A.Z1/H2A.Z2 double KO allowed us to study specific H2A.Z2 roles. These results, accordingly with Zhao's work, confirm that the H2A.Z isoforms have redundant and essential roles on the abilities of stem cells to ensure the tissue maintenance.

In intestinal organoids derived from these mice, the induction of the genomic recombination, in all cell types, using a Tat-CRE recombinant protein caused a strong decrease of the growth, here again only in H2A.Z1&2-depleted organoids (Fig.1C and SuppFig.1B,C). Indeed, we observed an increase of the number of organoids whose growth was less than 2-fold six days after the induction (i.e. 13.3% in Ctrl versus 30.8% in double KO). As *in vivo*, the single KO of H2A.Z1 has no effect. These data confirmed the redundant effects of both isoforms in complex cultured structures.

Then, we wanted to know if this double mutant phenotype is due to proliferation defect of the progenitors or a global decrease of the stemness. First, by analyzing Ki67 staining, we observed a defect upon the induction of the double KO, especially at the base of the crypts (Fig. 2A), whereas H2A.Z1-specific KO alone (Rispalet et al., 2019) had no major effect, in accordance with the lack of effect of this individual KO on the epithelial structure. The same result was observed in *in vitro* models since the double KO in organoids leads also to the decrease of Ki67 staining (SuppFig.2), confirming the redundant role of H2A.Z isoforms on the intestinal cell proliferation.

Then, we analyzed the role of H2A.Z isoforms in stemness maintenance by analyzing the staining for the stem cell marker Olfm4. We observed a decrease of Olfm4 staining in double KO mice compared to control (Fig.2B). In organoids, the double KO leads to the decrease of the expression of the stem cells markers Lgr5 and Olfm4 (Fig.2C), whereas the single deletion of H2A.Z1 have no significant decreasing effects on such markers (Fig.2D).

To confirm the role of H2A.Z in the stemness, in addition to transcriptional regulation of these genes, we are going to seed organoids upon Tat-CRE treatment and count the number of formed organoids six days later. We are expecting a translation of the observed transcriptional effects on stem cell properties to form organoids ...

(If so) Altogether, these results showed the major and redundant role of both isoforms of H2A.Z in the renewal of the intestinal epithelium by contributing to normal proliferation and stemness maintenance.

Antagonistic control of enterocytes differentiation by H2A.Z1 and H2A.Z2

Recently, we have shown the essential role of H2A.Z1 in the intestinal homeostasis by mediating the inhibition of terminal differentiation, through the negative control of the

binding of the transcription factor Cdx2 (Rispal et al., 2019). Thus, we wanted to analyze the redundancy or the specificity of each H2A.Z isoform on the intestinal differentiation. The induction of double KO in mice leads to the decrease of Sucrase-Isomaltase (SI) (markers of enterocyte terminal differentiation) staining compared to control in immunohistofluorescence experiments on intestinal tissues (Fig.3A), in contrast to the increase we previously observed in specific H2A.Z1 KO (Rispal et al., 2019). This difference of phenotype between single and double KO suggests opposite roles of both isoforms on terminal differentiation of the enterocytes.

These data were confirmed using a well characterized epithelial cell model, Caco-2/15 cells, which expressed markers of enterocyte differentiation when they reach confluence, and in which the siRNA-mediated knock-down of H2A.Z1 and/or H2A.Z2 (Fig.3B) allows us to decipher the complex relationship between these isoforms. The SI or LPH (Lactase Phlorizin Hydrolase, another enterocyte specific differentiation marker) induction observed upon H2A.Z1 knock-down (as in Rispal et al, 2019) was partially reverted by concomitant depletion of H2A.Z2. This confirms the antagonistic role of both isoforms on markers expression, H2A.Z1 depletion effects being, at least in part, dependent on H2A.Z2. However, note that H2A.Z2 knock-down has no effect by itself, suggesting that such expression is partly independent of H2A.Z proteins.

Control of lineage specification by H2A.Z isoforms.

Then, we analyzed the role of H2A.Z isoforms on the secretory lineage differentiation. We observed a huge increase of Muc2⁺ cell number (markers of Goblet cells) in double KO (Fig.4A), stronger than with H2A.Z1 single KO (Rispal et al., 2019). Moreover, the number of Paneth cells (Lys⁺) increases also in the double KO compared to control (Fig.4B), whereas

there was no difference in H2A.Z1 single KO (Rispalet al., 2019). Altogether, these results suggest that both isoforms of H2A.Z are involved, in a redundant manner, in the regulation of lineage choice by inhibiting secretory lineage commitment. However, we didn't observe any major effect (or a slight increase) of H2A.Z KO on the number of enteroendocrine cells (SuppFig.3). This result can be explained by a specific enteroendocrine lineage control or by the intestinal region of analysis (jejunum). Indeed, Kim and Shivdasani have shown that there is a specific regulation of these cells depending of the intestinal region analyzed (duodenum vs ileum) (Kim and Shivdasani, 2011).

We next analyzed more precisely the inhibitory mechanism of secretory differentiation in organoid models. In double KO organoids (Fig.5A), as in mice (Fig.4A), the percentage of Muc2⁺ area increase compared to wild-type samples, demonstrating an increase of the ratio of Goblet cells. The expression of Muc2 is also increased at RNA levels in these organoids (Fig.5B); it seems to be same in the organoids with H2A.Z1 single KO (one experiment, Fig.5C). Interestingly, in organoids derived from another mouse, the H2A.Z1 single KO have no increasing effect on Muc2 expression (Supp.Fig4B). This result can be explained by the KO efficiency between organoids from different individuals, since there is a 50% decrease of H2A.Z1 expression in the first one, whereas there is only a 30% decrease in the second one (SuppFig.4A vs SuppFig.4B). Thus, altogether these results suggest a dose dependent effect of total H2A.Z in the control of goblet cells differentiation. However, neither double KO nor H2A.Z1 KO present defects in the expression of Lys (Fig.5B and 5C). This result can be explained by the low level of organoid development in these assays, with very few mature Paneth cells (SuppFig.4B).

The Notch pathway controls the choice of lineage in the Transit-Amplifying compartment, especially thanks to transcription factors Hes1 and Math1 (Kim and

Shivdasani, 2011). Upon KO induction in organoids, Hes1 expression is not affected but Math1 mRNA strongly increases in organoids KO for both isoforms (Fig.5B); and it seems to increase in H2A.Z1 KO (one experiment, Fig.5C). This result suggests that H2A.Z isoforms control the secretory differentiation by inhibiting the expression of the transcription factors Math1. This is corroborated by the lack of Math1 expression increase in the second lineage of organoids with “ineffective” KO for H2A.Z1, according to the lack of the Muc2 expression increase (SuppFig.4A).

Altogether, these results suggest a dose-dependent effect of total H2A.Z which inhibits Math1 expression in enterocyte progenitors and thus, impairs progenitor commitment in a secretory fate.

Mechanistic of H2A.Z -dependent control of the intestinal epithelium differentiation.

To further decipher the H2A.Z-dependent regulatory mechanisms affecting the expression of differentiation markers, we analyzed these regulations in organoids and cellular models. As already shown in others models (Rispoli et al., 2019), H2A.Z1 KO in organoids leads to the increase of SI and LPH expression (Fig.6B and SuppFig.4A). However, the double KO has no significant increasing effect on the expression of SI in RT-qPCR (Fig.6A), and even a slight decrease in the protein staining by immunofluorescence (Fig.6C). These results suggest a specific effect of each isoform in the control of gene expression of terminal enterocyte differentiation like SI.

Then, we wanted to analyze more precisely the mechanism of this specific regulation by using the human enterocyte differentiation model : Caco-2/15 cells. The results obtained in Fig.3B suggest that H2A.Z2 could replaces H2A.Z1 during enterocyte differentiation, at the gene regulatory regions, to switch from a repressed state, with H2A.Z1 in undifferentiated

cells, to an activated state with H2A.Z2 in differentiated enterocytes. To test this hypothesis, we analyzed the H2A.Z2/H2A.Z1 ratio during the differentiation of Caco-2/15 cells. At global level, by RT-qPCR, we observed an increase of this ratio during Caco-2/15 differentiation, which correlates with the increase of differentiation markers SI and LPH (Fig.7A). The increase of this ratio is also observed in mice between isolated crypts and isolated villus, even if H2A.Z isoforms individually decrease (Fig.7D). The dissociation efficiency is controlled by the increase in villus of differentiation marker expression (Fig.7B) and the decrease of stem cell marker expression (Fig.7C).

Now, we want to analyze this dynamic at the level of regulatory regions of the differentiation marker genes. We then generated Caco-2/15 cell lines endogenously tagged for H2A.Z1 or H2A.Z2 with FLAG-tag, which will allow us to follow the specific dynamic of H2A.Z1 or H2A.Z2 at the protein level. We are going to analyze this dynamic by ChIP experiments during Caco-2/15 differentiation.

Modulating H2A.Z-related enterocytes differentiation by SRCAP and p400.

Finally, we wanted to analyze the mechanism of specific incorporation of each isoform of H2A.Z at the regulatory regions of enterocyte genes. SRCAP and p400 complexes are responsible for the incorporation of H2A.Z into chromatin in mammals; so, we analyzed the role of these complexes in the dynamic of H2A.Z during enterocyte differentiation. Interestingly, the depletion of SRCAP in Caco-2/15 cells, using siRNA, leads to the huge increase of SI expression, as observed for H2A.Z1 depletion (Fig.8A), whereas p400 depletion has no drastic effect, as observed upon H2A.Z2 depletion. But the p400 depletion, in addition of the SRCAP one, reverses the phenotype, as for H2A.Z2 depletion together with the H2A.Z1 one (Fig.8A). Moreover, p400 depletion reverses the increase of SI expression of

H2A.Z1 depletion, whereas H2A.Z2 depletion in addition of SRCAP has no major effect. These results suggest that SRCAP phenocopies H2A.Z1 and inhibits the expression of enterocyte-specific genes, whereas p400 promotes their expression, as observed for H2A.Z2.

These results suggest also that SRCAP could incorporate specifically H2A.Z1 and p400 incorporates specifically H2A.Z2. To test this, we analyzed the binding of H2A.Z isoforms with both incorporator complexes by co-immunoprecipitation in Caco-2/15 cells. We can observe the stronger interaction of p400 with Flag-H2A.Z2 than with Flag-H2A.Z1 (Fig.8B). Unfortunately, we are not able to observe the interaction with SRCAP due to the lack of antibody. We are also not able to visualize Flag-H2A.Z in the p400 immunoprecipitation maybe due to the high fraction of H2A.Z unbound at this complex (Fig.8B). This result suggest a specific incorporation of H2A.Z2 by p400 complex due to a preferential interaction.

To test the hypothesis of specific couples incorporator/H2A.Z isoform in transcriptional effects, we are going to analyze the incorporation of H2A.Z1 and H2A.Z2, after the depletion of SRCAP or p400 in Caco-2/15 tagged for the H2A.Z isoforms, by ChIP experiments. We expect to highlight specific incorporation of each isoform by SRCAP or p400.

(If so) Altogether, these results show that H2A.Z isoforms are differentially involved in intestinal epithelial cell fate. Depending on the isoform, a specific binding to incorporator allows to incorporate this isoform into the chromatin, a specific site, to induce differential effect on transcription. Thus, H2A.Z1 and H2A.Z2 act antagonistically on enterocyte markers expression, but induce similar favoring effects on proliferation and stem cell maintenance, as well as inhibition of secretory lineage establishment (Fig.9).

References:

Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003–1007.

Dunn, C.J., Sarkar, P., Bailey, E.R., Farris, S., Zhao, M., Ward, J.M., Dudek, S.M., and Saha, R.N. (2017). Histone Hypervariants H2A.Z.1 and H2A.Z.2 Play Independent and Context-Specific Roles in Neuronal Activity-Induced Transcription of Arc/Arg3.1 and Other Immediate Early Genes. *ENeuro* 4.

Eirín-López, J.M., González-Romero, R., Dryhurst, D., Ishibashi, T., and Ausió, J. (2009). The evolutionary differentiation of two histone H2A.Z variants in chordates (H2A.Z-1 and H2A.Z-2) is mediated by a stepwise mutation process that affects three amino acid residues. *BMC Evol. Biol.* 9, 31.

Greenberg, R.S., Long, H.K., Swigut, T., and Wysocka, J. (2019). Single Amino Acid Change Underlies Distinct Roles of H2A.Z Subtypes in Human Syndrome. *Cell* 178, 1421-1436.e24.

Kazakevych, J., Sayols, S., Messner, B., Krienke, C., and Soshnikova, N. (2017). Dynamic changes in chromatin states during specification and differentiation of adult intestinal stem cells. *Nucleic Acids Res.* 45, 5770–5784.

Kim, T.-H., and Shivdasani, R.A. (2011). Genetic evidence that intestinal Notch functions vary regionally and operate through a common mechanism of Math1 repression. *J. Biol. Chem.* 286, 11427–11433.

Rispol, J., Baron, L., Beaulieu, J.-F., Chevillard-Briet, M., Trouche, D., and Escaffit, F. (2019). The H2A.Z histone variant integrates Wnt signaling in intestinal epithelial homeostasis. *Nat Commun* 10, 1827.

Sancho, R., Cremona, C.A., and Behrens, A. (2015). Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease. *EMBO Rep.* 16, 571–581.

Vardabasso, C., Gaspar-Maia, A., Hasson, D., Pünzeler, S., Valle-Garcia, D., Straub, T., Keilhauer, E.C., Strub, T., Dong, J., Panda, T., et al. (2015). Histone Variant H2A.Z.2 Mediates Proliferation and Drug Sensitivity of Malignant Melanoma. *Mol. Cell* 59, 75–88.

Zhao, B., Chen, Y., Jiang, N., Yang, L., Sun, S., Zhang, Y., Wen, Z., Ray, L., Liu, H., Hou, G., et al. (2019). Znhit1 controls intestinal stem cell maintenance by regulating H2A.Z incorporation. *Nat Commun* 10, 1–12.

Figure legends:

Figure 1: H2A.Z isoforms are essential for intestinal epithelial renewal

A: Representative H2A.Z immunohistofluorescence of jejunal sections in control or *H2AZ.1*^{-/-} ; *H2A.Z2*^{-/-} mice, ten days after the recombination induced by tamoxifen treatment. Nuclei are stained with DAPI in blue. Scale bar represent 50µm. **B:** Measurements in µm of 30 to 50 villus height for each mice. Genotypes of mice are stated below the diagram. **C:** *H2A.Z1*^{fl/fl} ; *H2A.Z2*^{fl/fl} organoid growth with (+) or without (-) Tat-CRE treatment. Size measurements (around 100 organoids by condition) are monitored the day of treatment (D0) and 6 days after (D6). Organoids are pooled in 2 classes: those who size increase less (-2X) or more (+2X) than 2 fold in 6 days.

Figure 2: H2A.Z isoforms are essential for proliferation and stemness

Representative Ki67 (**A**) and OLFM4 (**B**) immunohistofluorescence of jejunal sections in control or *H2A.Z1*^{-/-} ; *H2A.Z2*^{-/-} mice, ten days after the recombination induced by tamoxifen treatment. Nuclei are stained with DAPI in blue. **C:** Olfm4 and Lgr5 expression in *H2A.Z1*^{fl/fl} ; *H2A.Z2*^{fl/fl} organoids treated (+Tat-CRE) or not (-) with Tat-CRE. **D:** Olfm4 and Lgr5 expression in *H2A.Z1*^{fl/fl} organoids treated (+Tat-CRE) or not (-) with Tat-CRE. The mean of 5 independent experiments is represent. Statistical analysis was done using the one-way Student's t-Test and the p-values of treated organoids compared to untreated are stated in the graphic.

Figure 3: Antagonistic control of enterocytes differentiation by H2A.Z1 and H2A.Z2

A: Representative SI immunohistofluorescence of jejunal sections in control or *H2A.Z1*^{-/-} ; *H2A.Z2*^{-/-} mice, ten days after the recombination induced by tamoxifen treatment. Nuclei are

stained with DAPI in blue. **B:** mRNA expression of SI and LPH in Caco-2/15 cells, 3 days after the transfection of siRNA directed against H2A.Z1, H2A.Z2 or both. The mean of 5 independent experiments is represent. Statistical analysis was done using the one-way Student's t-Test and the p-values of treated organoids compared to untreated are stated in the graphic.

Figure 4: Control of lineage specification by H2A.Z isoforms

Representative MUC2, SI (**A**) and LYS (**B**) immunohistofluorescence of jejunal sections in control or *H2A.Z1^{-/-}* ; *H2A.Z2^{-/-}* mice, ten days after the recombination induced by tamoxifen treatment. Nuclei are stained with DAPI in blue.

Figure 5: H2A.Z isoforms inhibits secretory lineage differentiation in organoids

A: MUC2 immunostaining in *H2A.Z1^{fl/fl}* ; *H2A.Z2^{fl/fl}* organoids 6 days after Tat-CRE treatment or not. The box-plot represent the quantification of MUC2 positive area per organoid. The median of areas of 20 organoids is represent for each condition. Statistical analysis was done using the Mann-Whitney test. **B:** mRNA expression in *H2A.Z1^{fl/fl}* ; *H2A.Z2^{fl/fl}* organoids treated or not with Tat-CRE, 6 days after the treatment. The mean of 5 independent experiments is represent. Statistical analysis was done using the one-way Student's t-Test and the p-values of treated organoids compared to untreated are stated in the graphic. **C:** mRNA expression in *H2A.Z1^{fl/fl}* organoids treated or not with Tat-CRE, 6 days after the treatment. Results of 1 experiment are plotted.

Figure 6: Control of enterocytes differentiation by H2A.Z isoforms in organoids

A: mRNA expression in H2A.Z1^{fl/fl} ; H2A.Z2^{fl/fl} organoids treated or not with Tat-CRE, 6 days after the treatment. The mean of 5 independent experiments is represent. Statistical analysis was done using the one-way Student's t-Test and the p-values of treated organoids compared to untreated are stated in the graphic. **B:** mRNA expression in H2A.Z1^{fl/fl} organoids treated or not with Tat-CRE, 6 days after the treatment. Results of 1 experiment are plotted. **C:** SI and H2A.Z immunostainings in H2A.Z1^{fl/fl} ; H2A.Z2^{fl/fl} organoids 6 days after Tat-CRE treatment or not.

Figure 7: Mechanistic of H2A.Z -dependent control of the intestinal epithelium differentiation

A: mRNA expression of SI, LPH and H2A.Z2/H2A.Z1 ratio during differentiation kinetic of Caco-2/15 cells. Days after confluence are stated below the graphic. The mean of 3 independent experiments is represent. Statistical analysis was done using the Student's t-Test vs Day 2. mRNA expression of differentiation marker genes (**B**), stem cell marker genes (**C**) and H2A.Z isoforms (**D**) in isolated crypts or villus of wild-type mice. The mean of 4 mice is represent. Statistical analysis was done using the paired Student's t-Test vs Crypts.

Figure 8: Modulating H2A.Z-related enterocytes differentiation by SRCAP and p400

A: SI mRNA expression in Caco-2/15 cells transfected with the different combination of siRNA stated above the graphic. The mean of 5 independent experiments is represent. Statistical analysis was done using the Student's t-Test. **B:** Immunoprecipitation with anti-Flag or anti-p400 antibodies in Caco-2/15 cells tagged for H2A.Z1 or H2A.Z2. This immunoprecipitation is

followed by Western-Blot with anti-Flag or anti-p400 antibodies. Noted that protein amount in inputs is too small to visualize bands.

Figure 9: Model of control of intestinal epithelial homeostasis by H2A.Z isoform dynamic

In the crypt, the high quantity of total H2A.Z is essential for maintaining the undifferentiated state of cells by facilitating proliferation and maintain of stemness and by inhibiting the differentiation. During the migration of cells along the villus, the decrease of H2A.Z coupled to the increase of H2A.Z2/H2A.Z1 ratio allow the differentiation and favors the absorptive lineage.

Supp Fig 1:

A: Representative H2A.Z immunohistofluorescence of jejunal sections in control, *H2AZ.1*^{-/-} or *H2A.Z2*^{-/-} mice, ten days after the recombination induced by tamoxifen treatment. Nuclei are stained with DAPI in blue. Scale bar represent 50µm. **B:** Representative picture of growth of *H2A.Z1*^{fl/fl} ; *H2A.Z2*^{fl/fl} organoid treated with (+) or without (-) Tat-CRE. **C:** H2A.Z1 and H2A.Z2 expression in *H2A.Z1*^{fl/fl} ; *H2A.Z2*^{fl/fl} organoids treated (+Tat-CRE) or not (-) with Tat-CRE. The mean of 5 independent experiments is represent. Statistical analysis was done using the one-way Student's t-Test and the p-values of treated organoids compared to untreated are stated in the graphic.

Supp Fig 2:

Representative Ki67 immunostaining in *H2A.Z1*^{fl/fl} ; *H2A.Z2*^{fl/fl} organoids 6 days after Tat-CRE treatment or not.

Supp Fig 3:

Representative ChgA immunohistofluorescence of jejunal sections in control or *H2A.Z1^{-/-}* ; *H2A.Z2^{-/-}* mice, ten days after the recombination induced by tamoxifen treatment. Nuclei are stained with DAPI in blue.

Supp Fig 4:

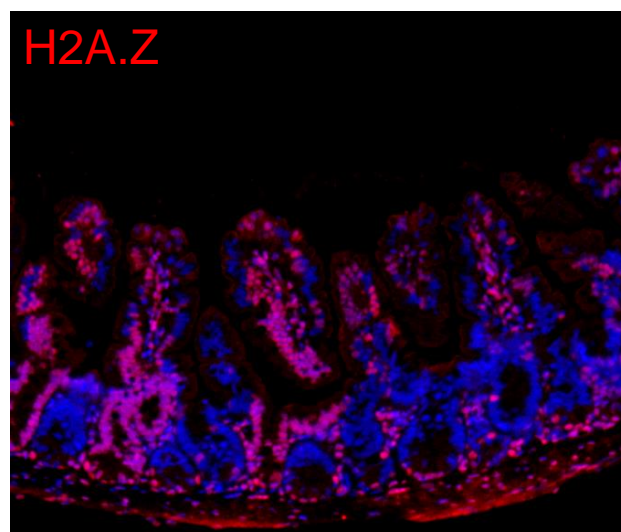
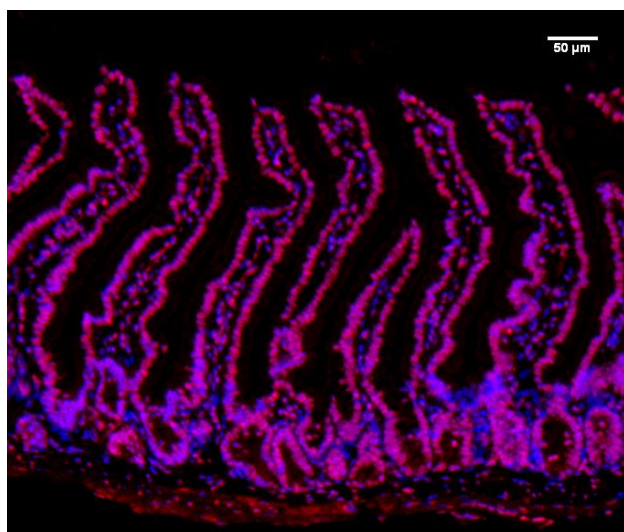
mRNA expression in *H2A.Z1^{fl/fl}* organoids originating for mouse 1 (**A**) or mouse 2 (**B**) treated (+Tat-CRE) or not (-) with Tat-CRE. Results of 1 experiment are plotted in **A**. The mean of 5 independent experiments is represent in **B**. Statistical analysis was done using the one-way Student's t-Test and the p-values of treated organoids compared to untreated are stated in the graphic. **C**: Representative LYS immunostaining in *H2A.Z1^{fl/fl}* ; *H2A.Z2^{fl/fl}* organoids 6 days after Tat-CRE treatment or not.

Figure 1

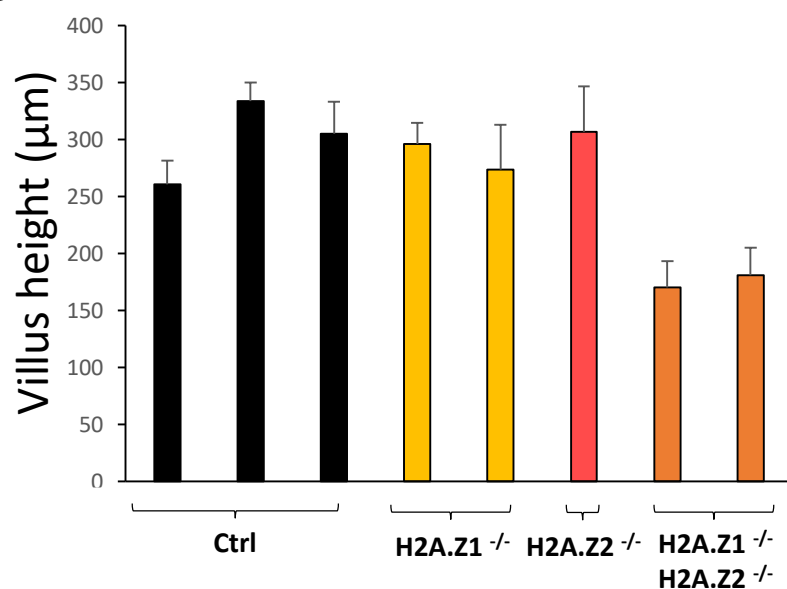
A

Ctrl

H2A.Z1^{-/-}
H2A.Z2^{-/-}

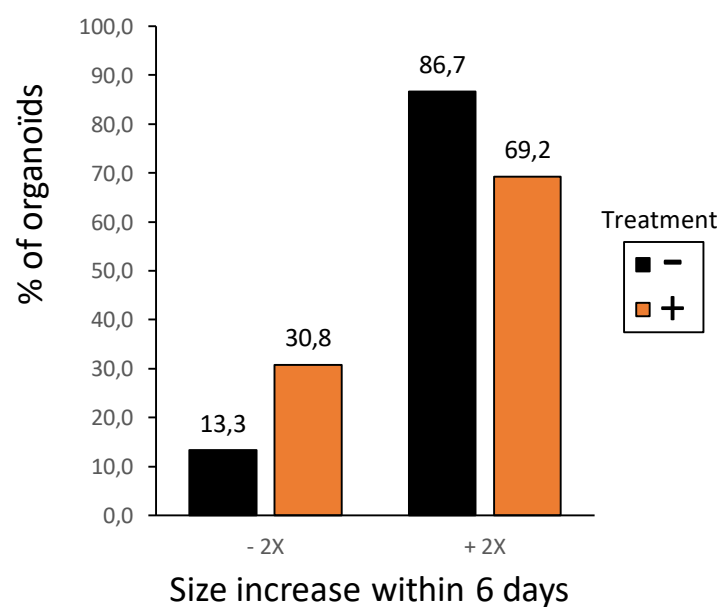


B



C

Growth of Z1&2^{fl/fl} organoids



Growth of Z1^{fl/fl} organoids

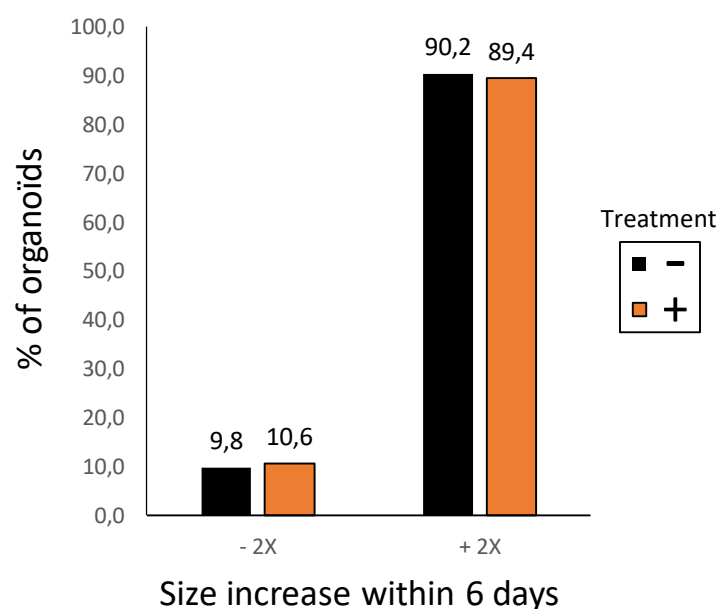
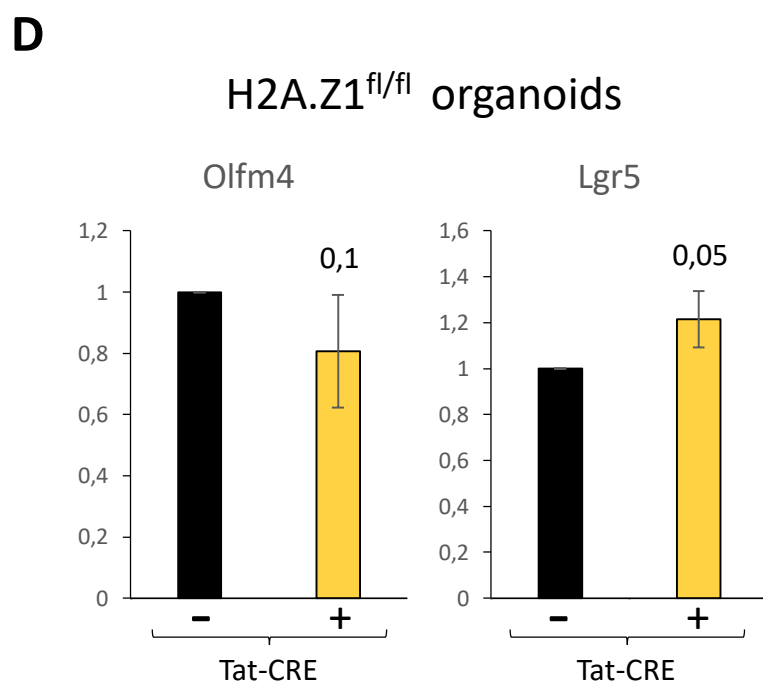
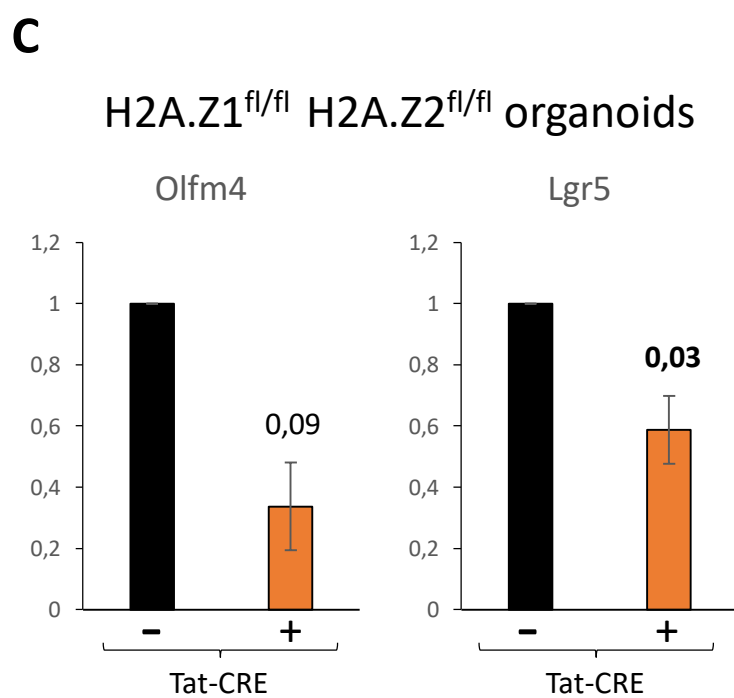
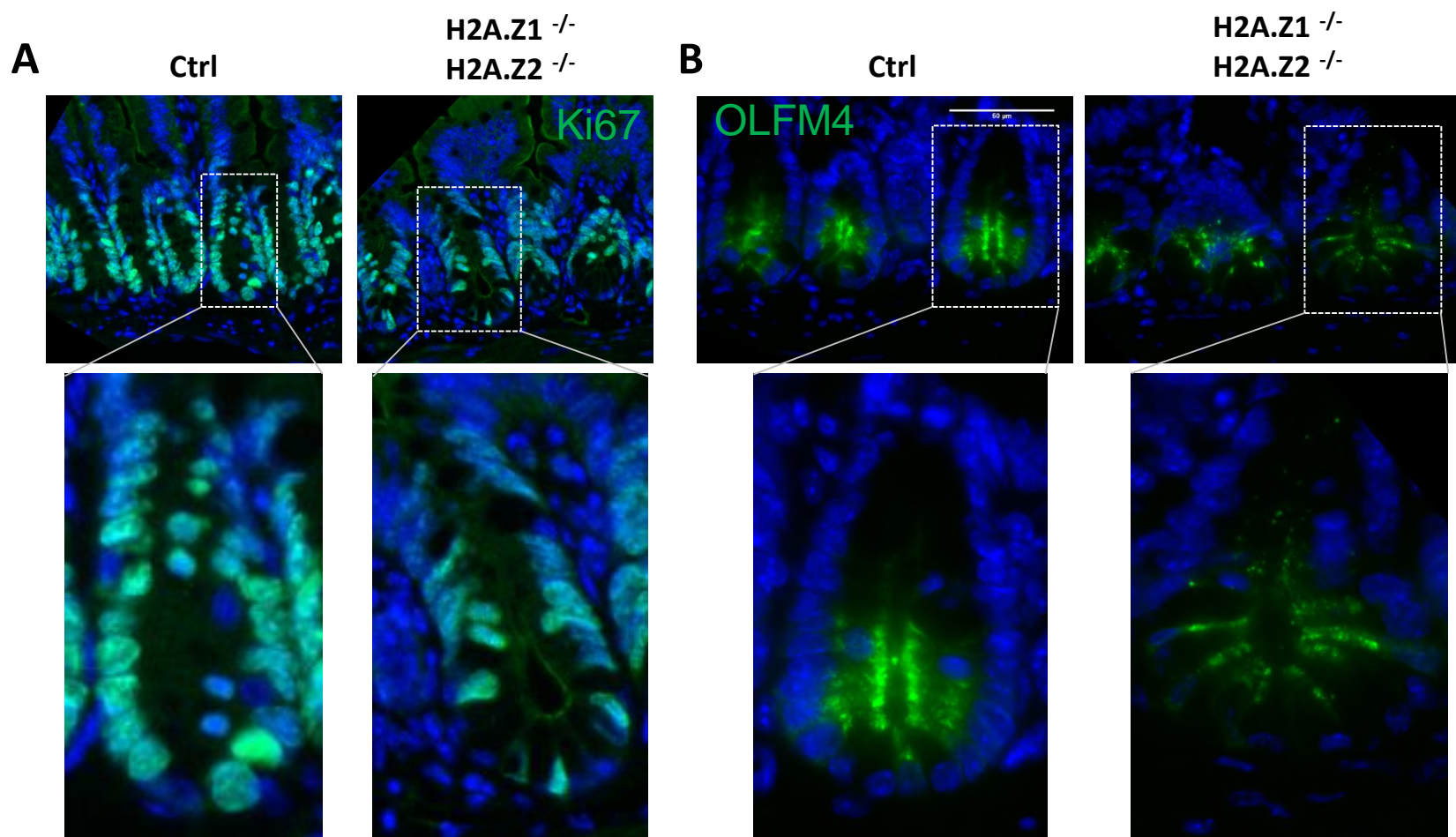


Figure 2

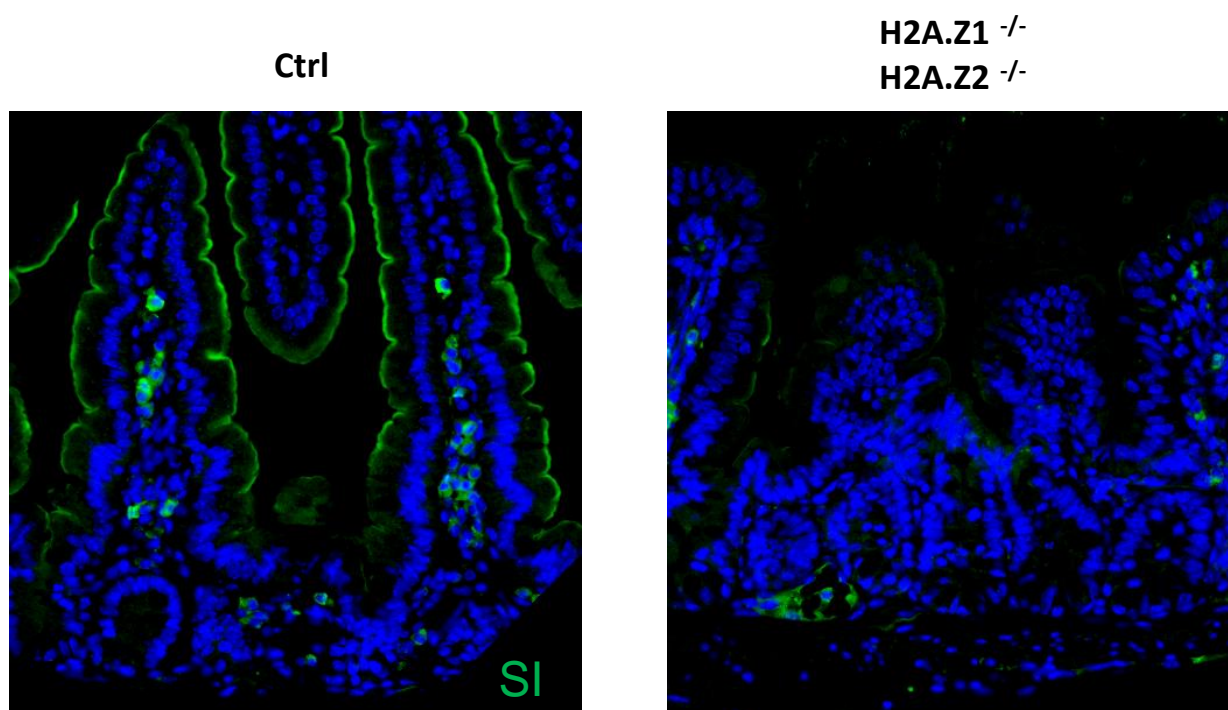


E

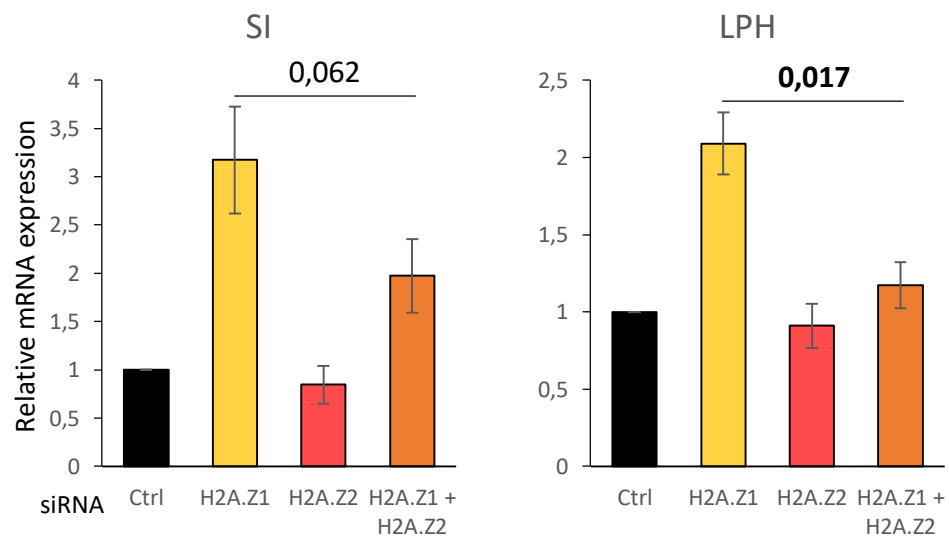
Stemness experiments in organoids

Figure 3

A



B



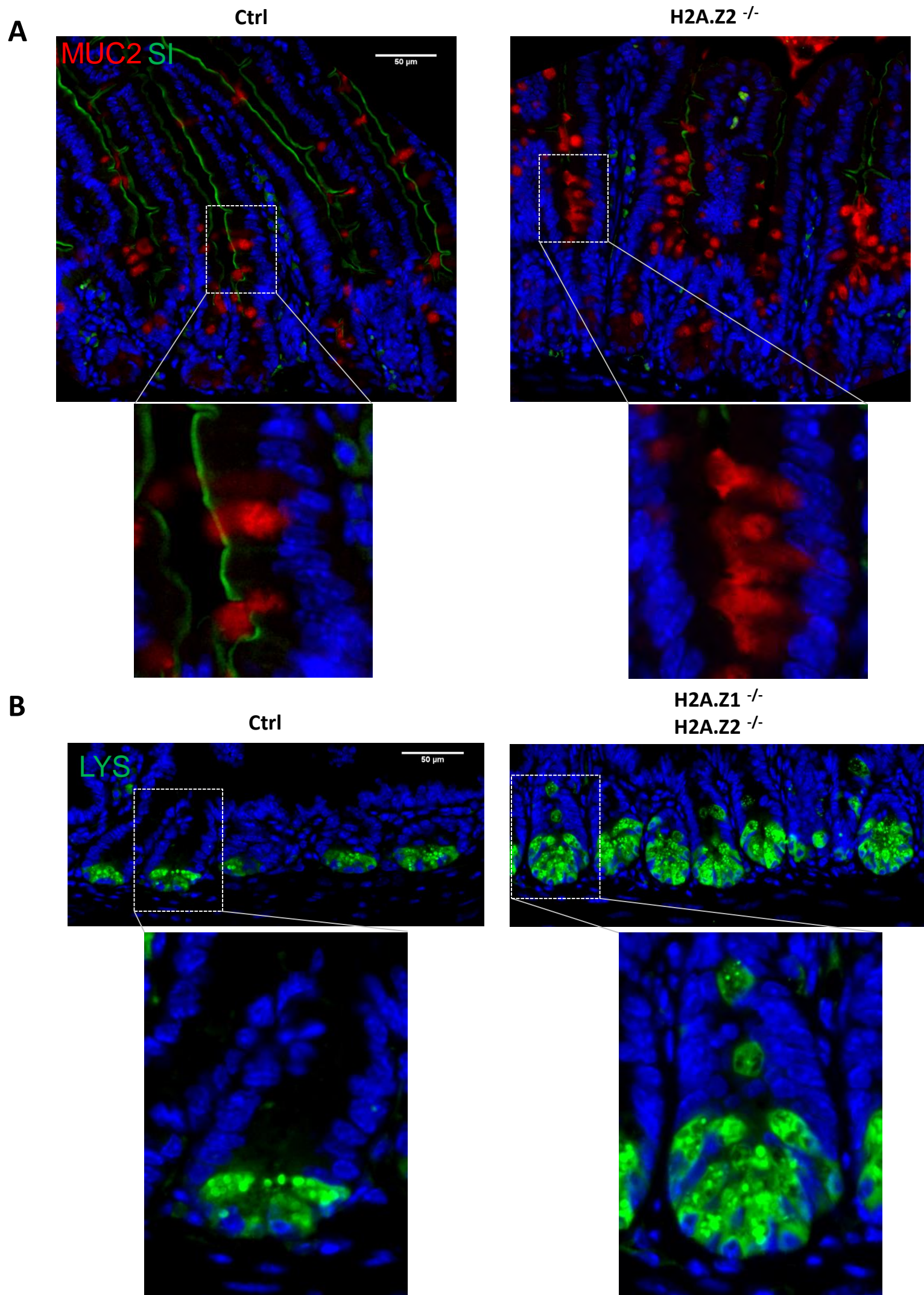


Figure 5

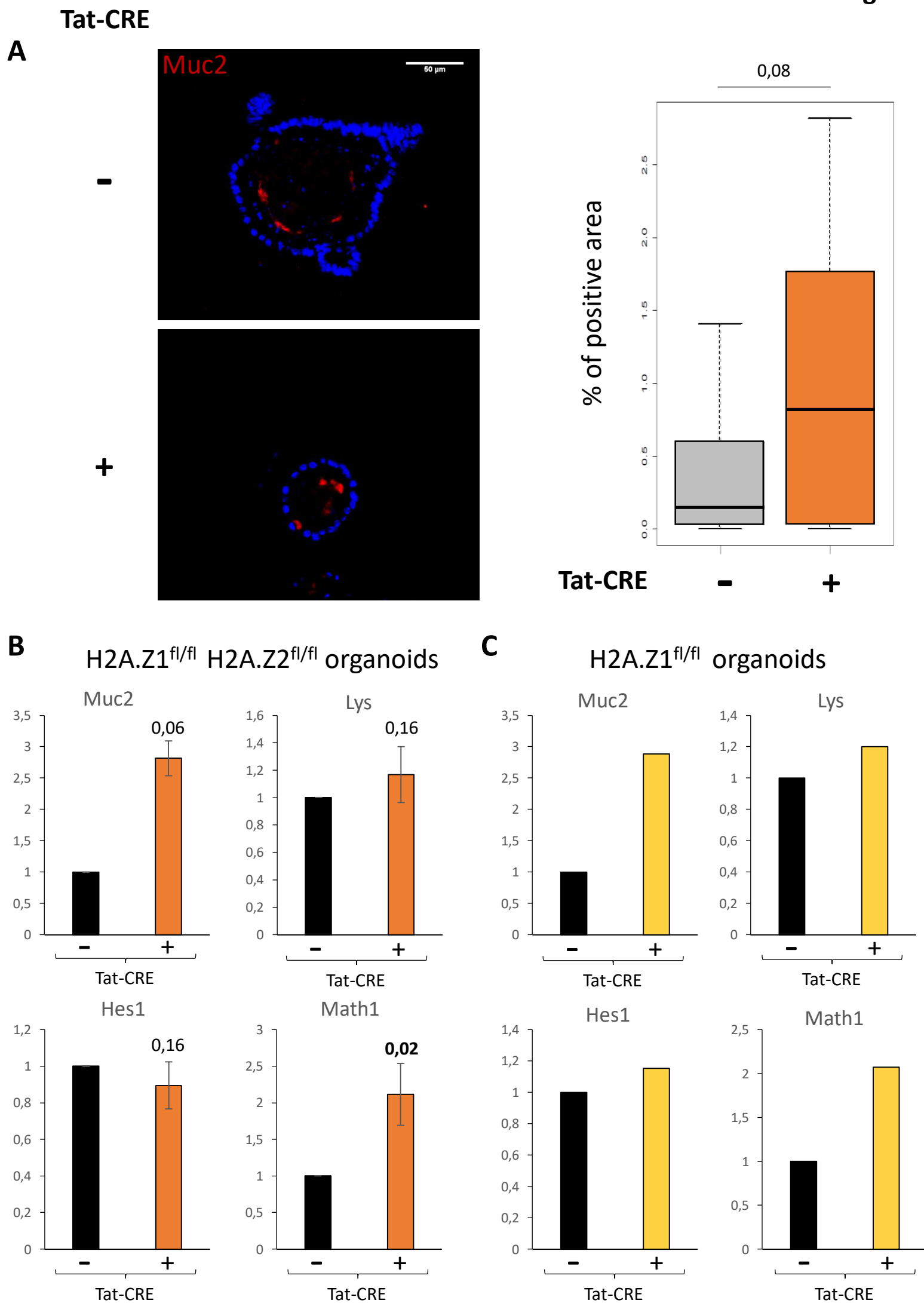


Figure 6

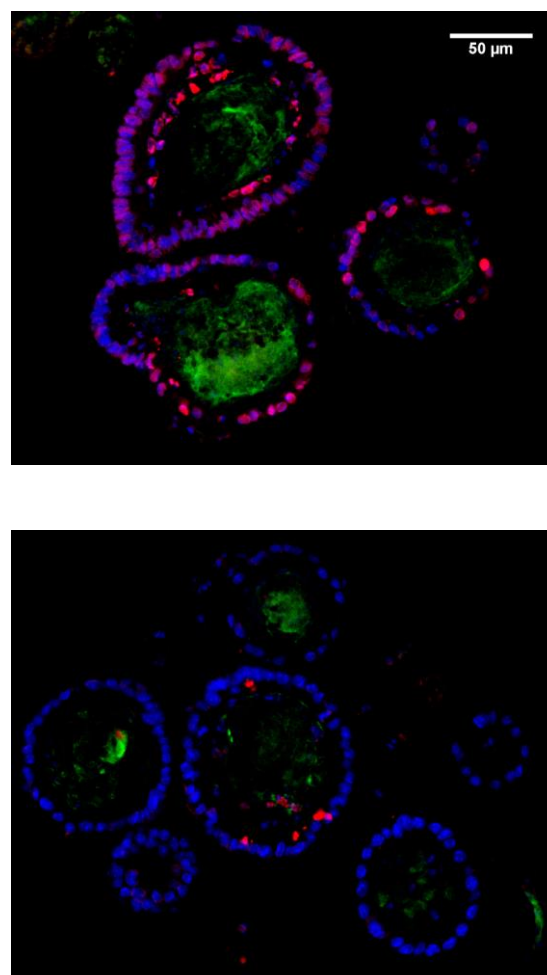
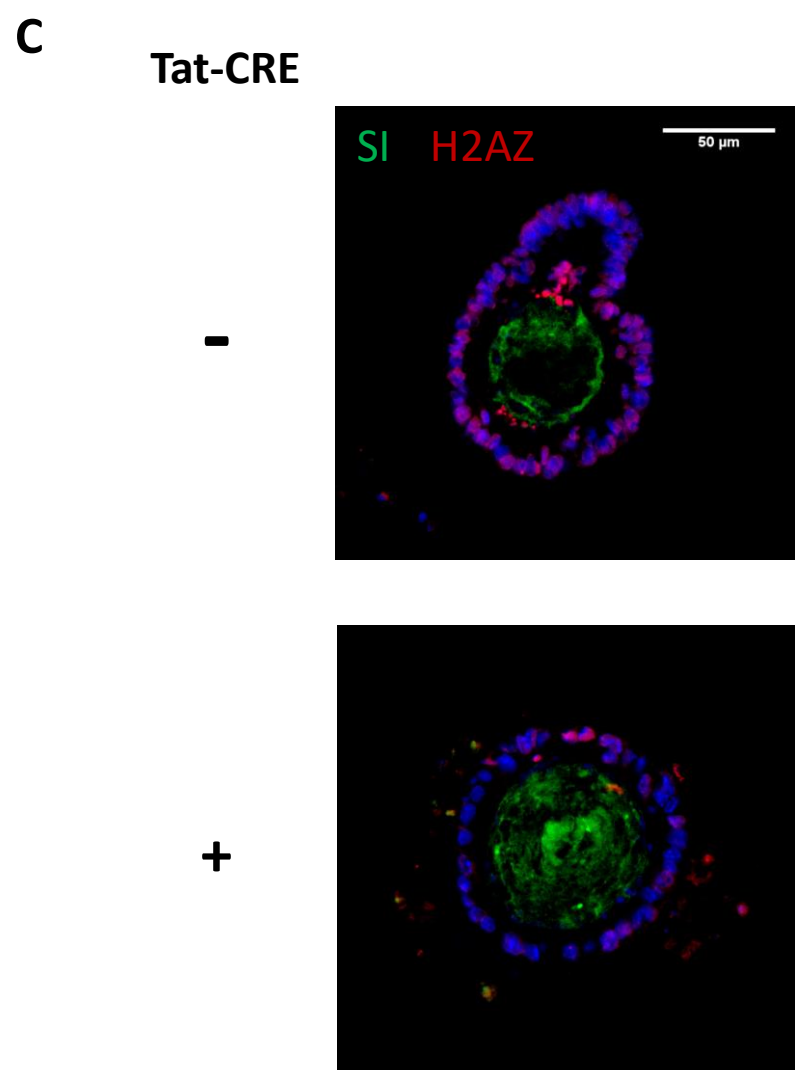
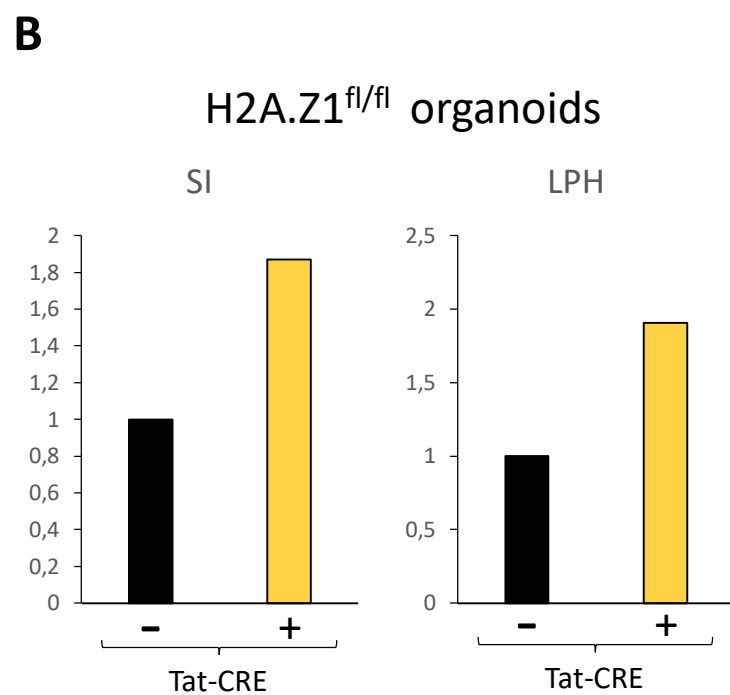
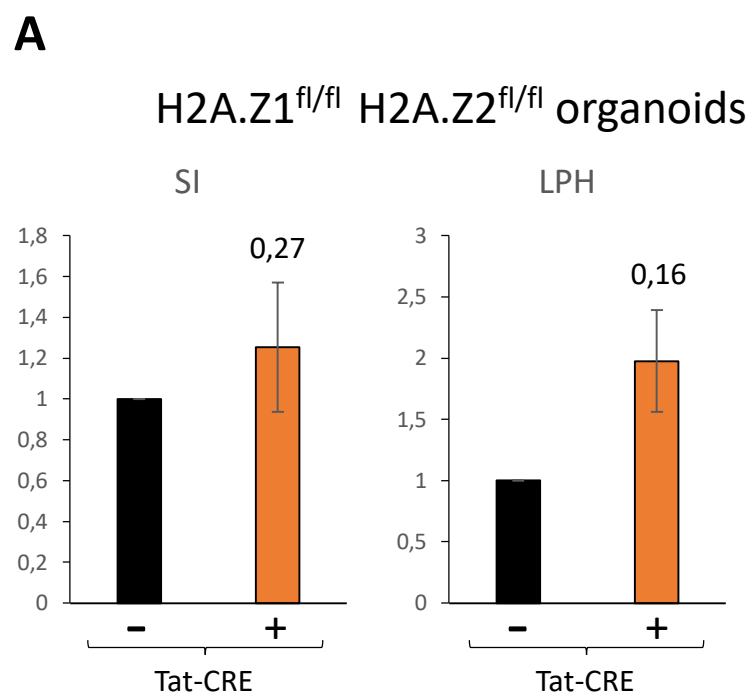
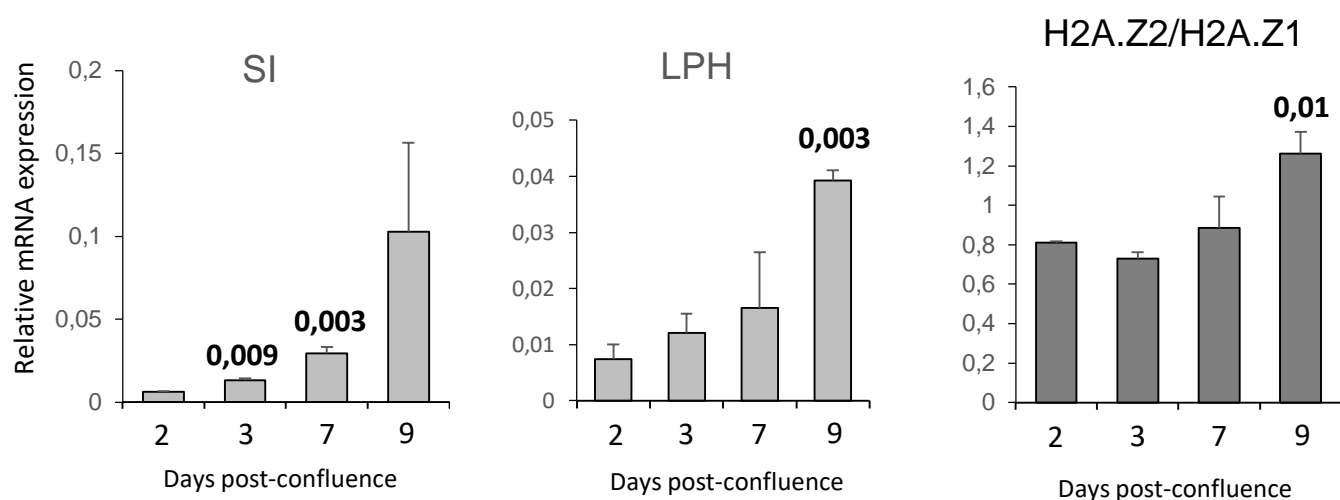
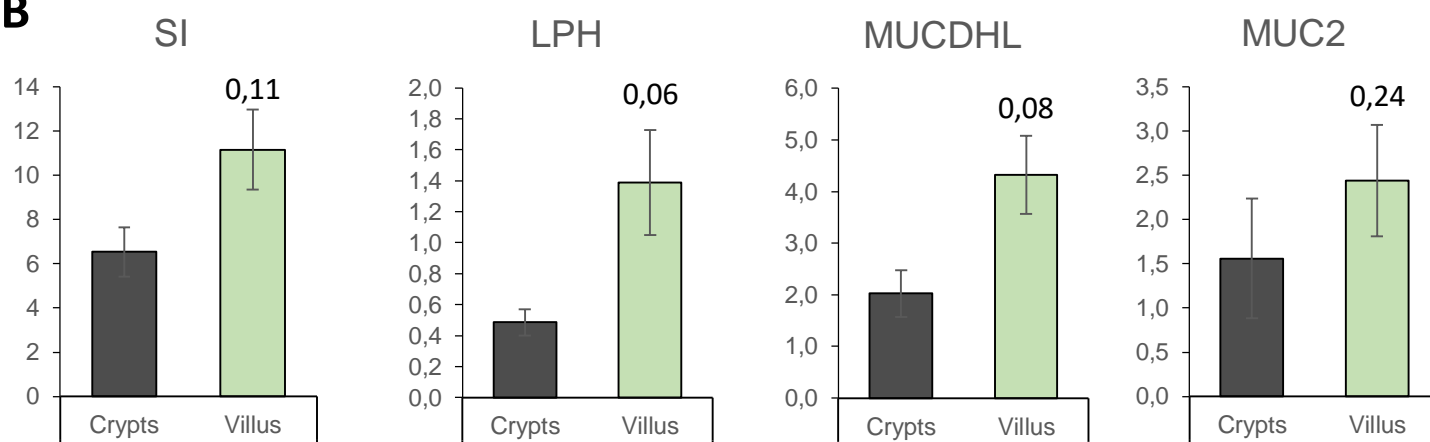


Figure 7

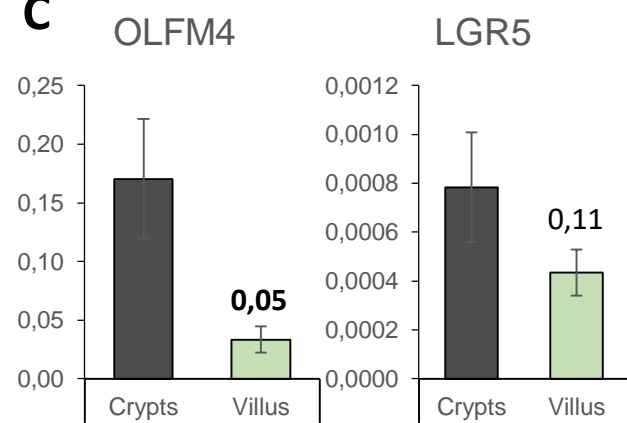
A



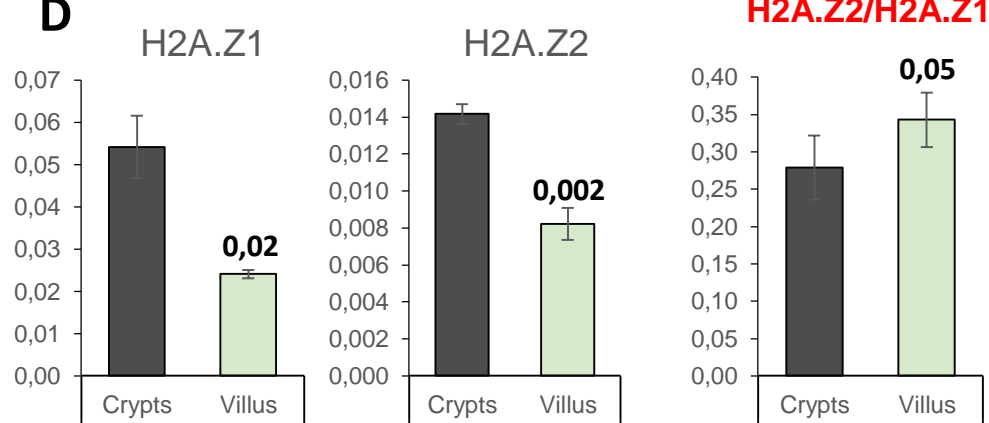
B



C

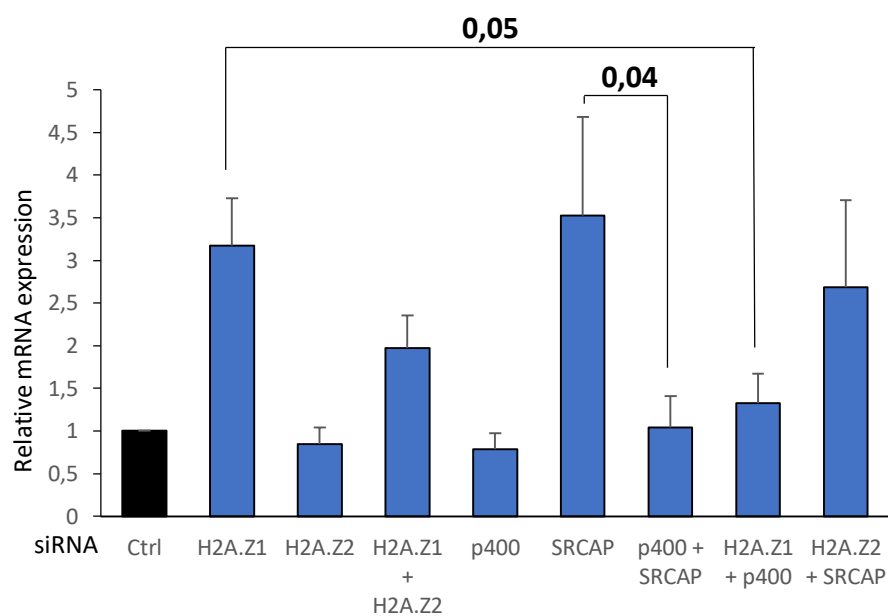
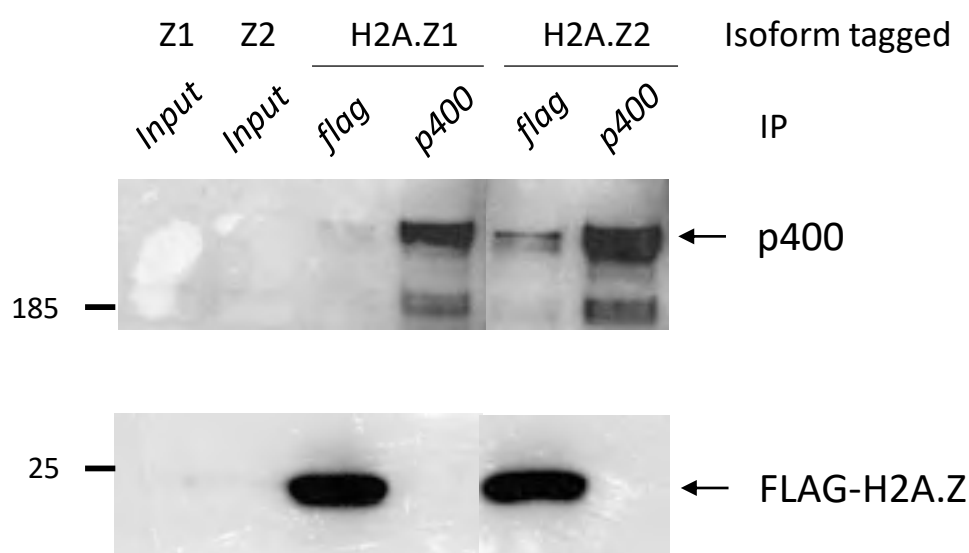


D



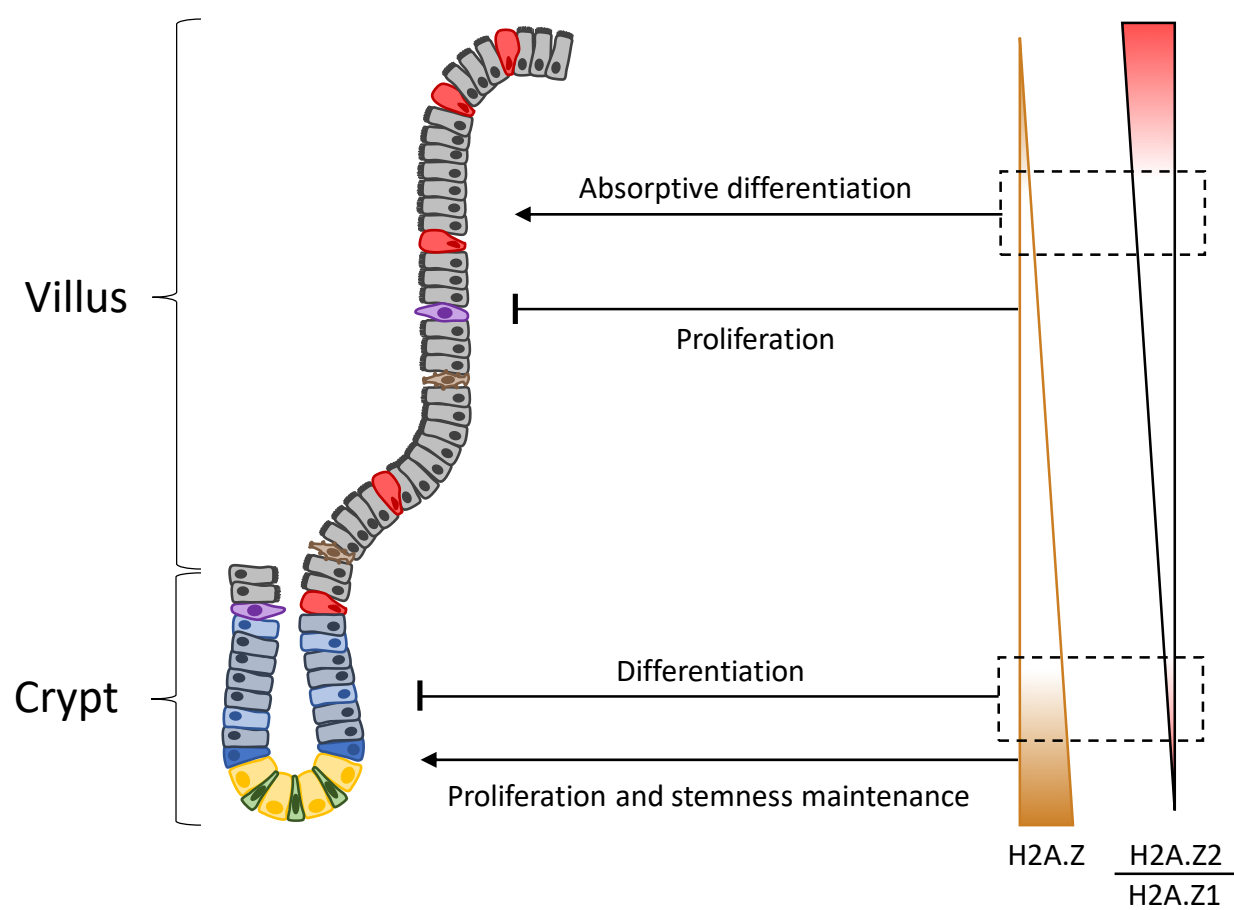
E

ChIP of H2A.Z1-flag or H2A.Z2-flag during kinetic of Caco-2/15 differentiation

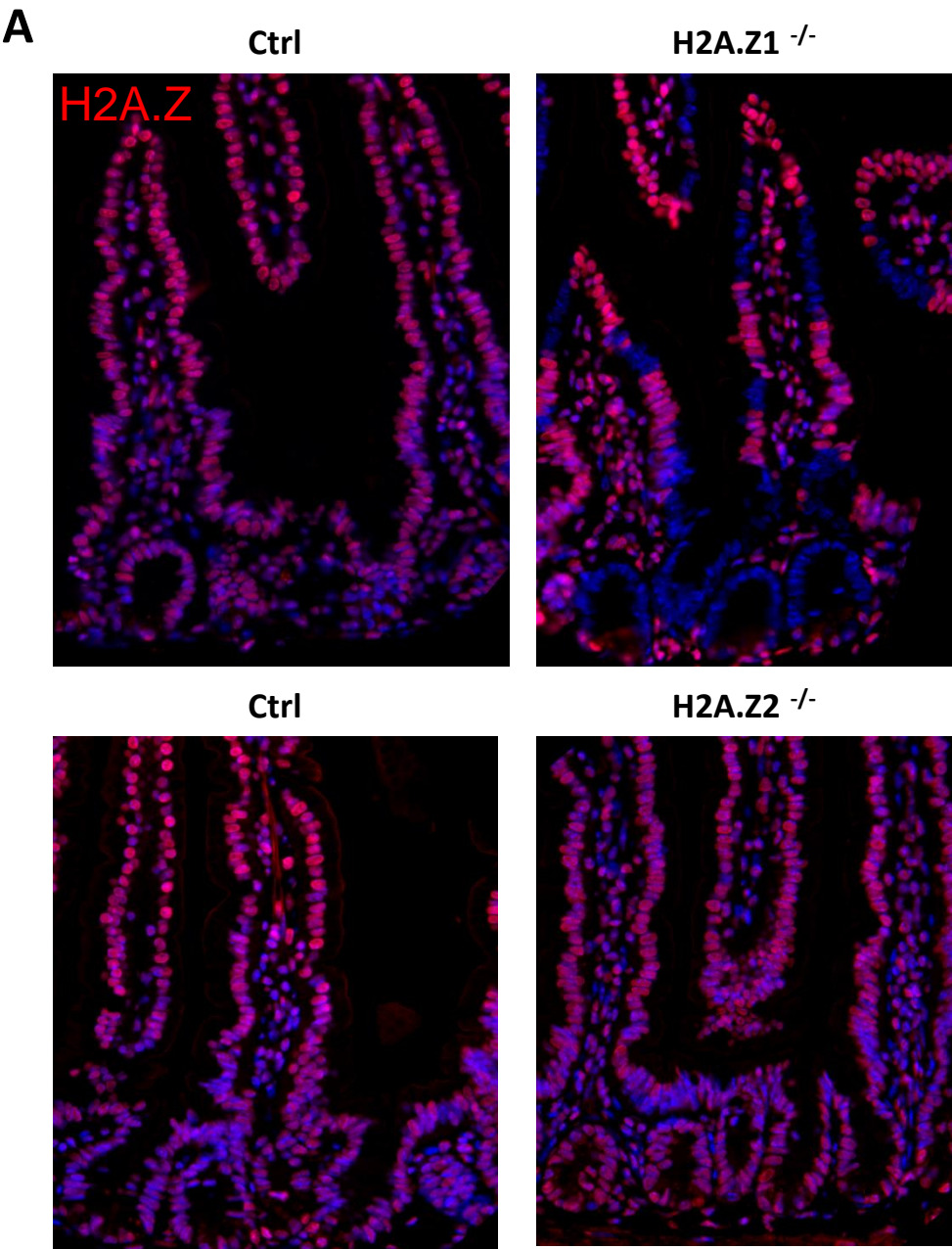
A**B****C**

ChIP of H2A.Z1-flag or H2A.Z2-flag in Caco-2/15 cells after depletion of SRCAP et p400 by siRNA

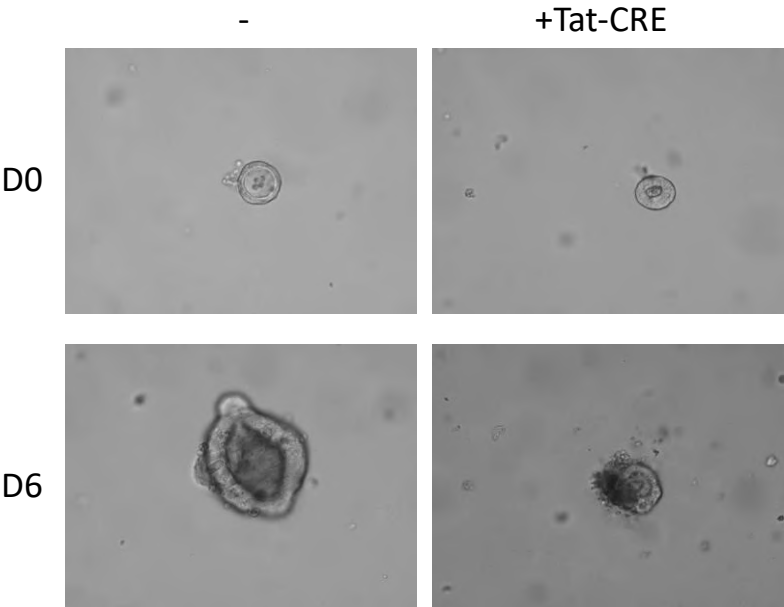
Figure 9



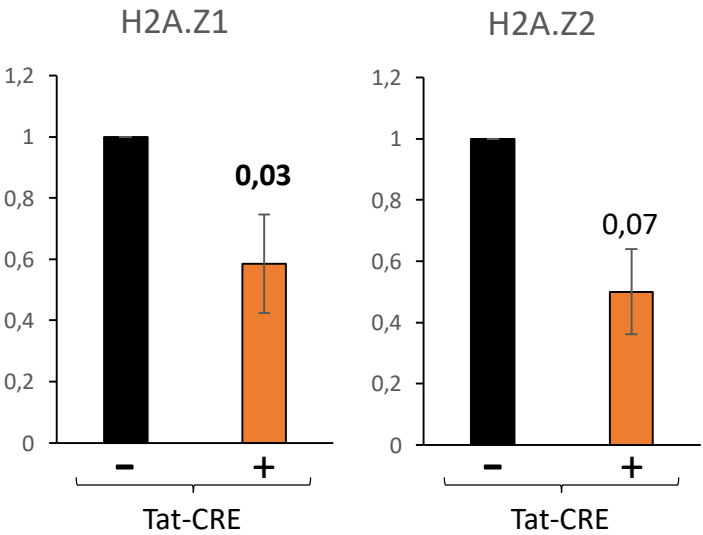
Supp Fig 1



B Growth of Z1&2^{fl/fl} organoids



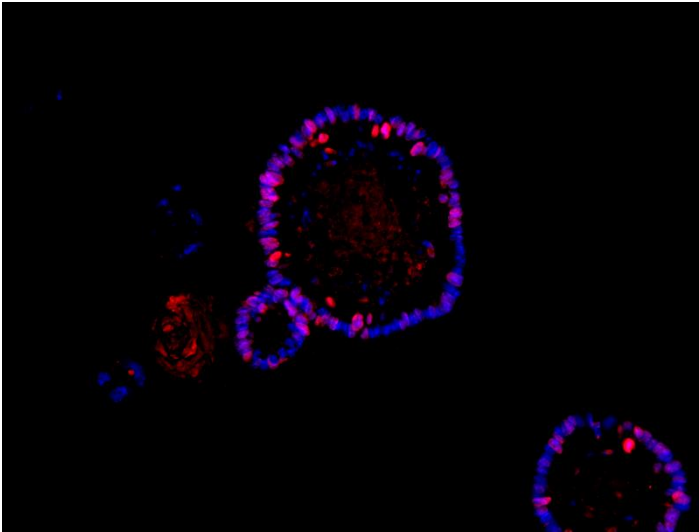
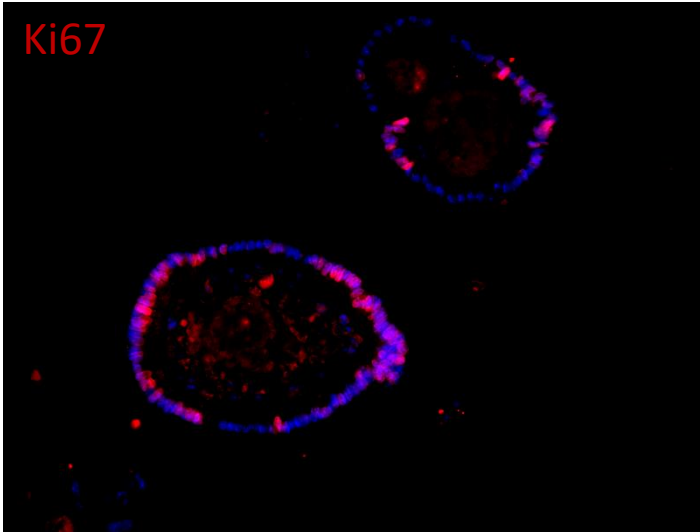
C



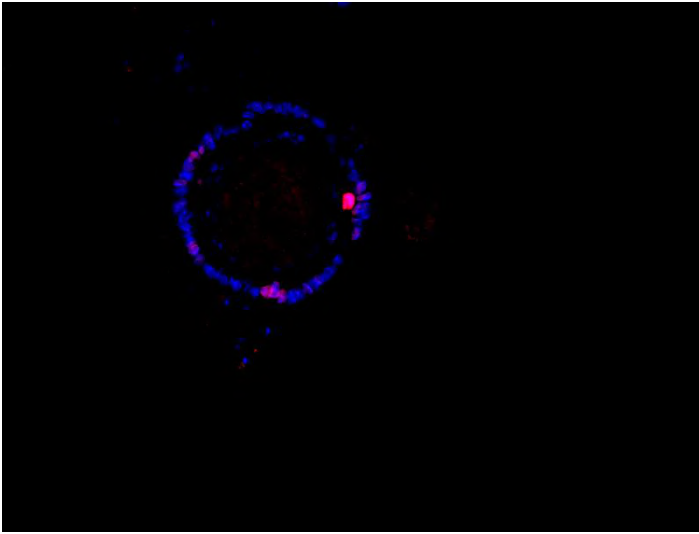
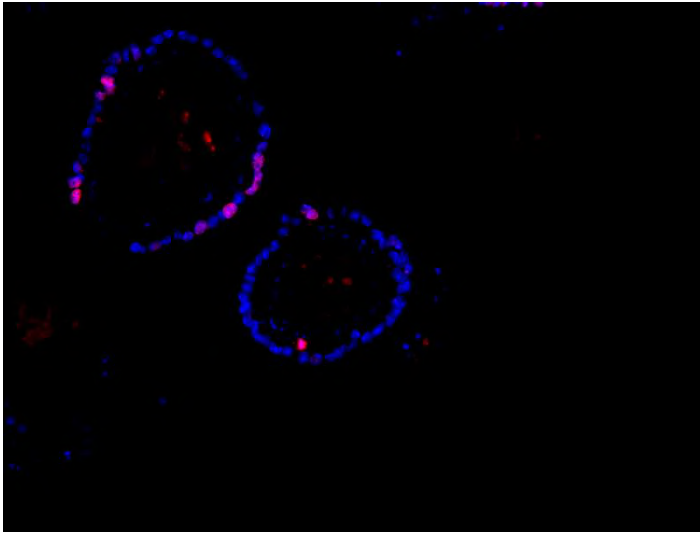
Supp Fig 2

Tat-CRE

-



+

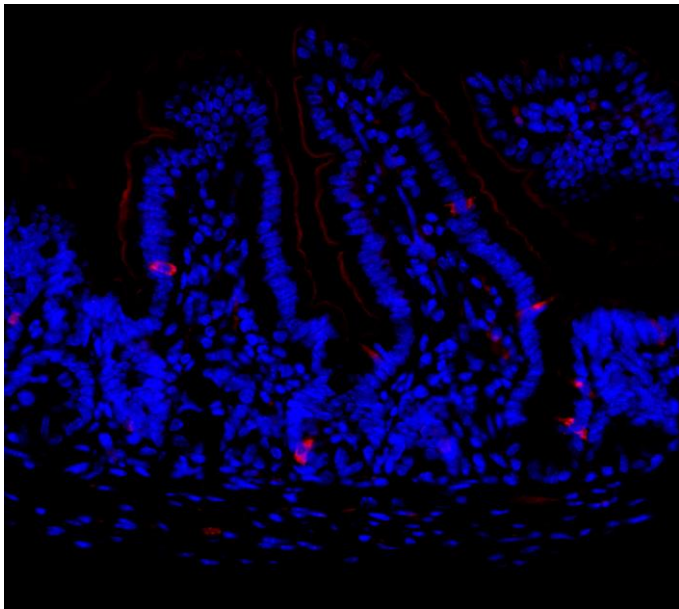
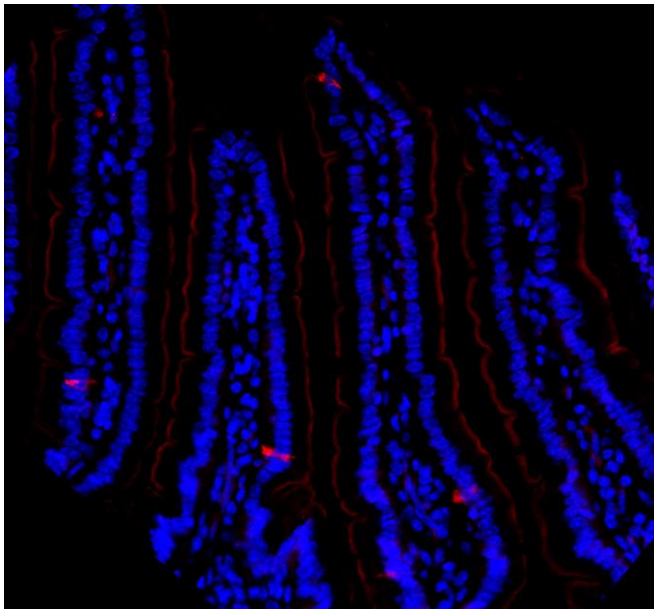
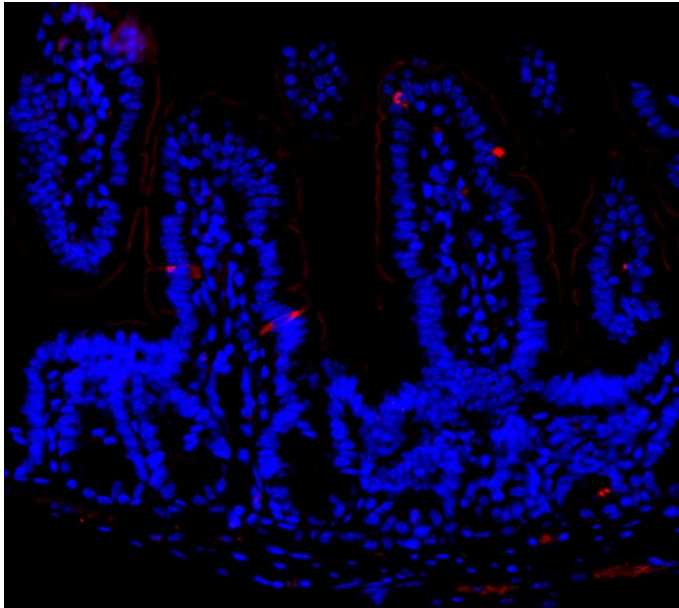
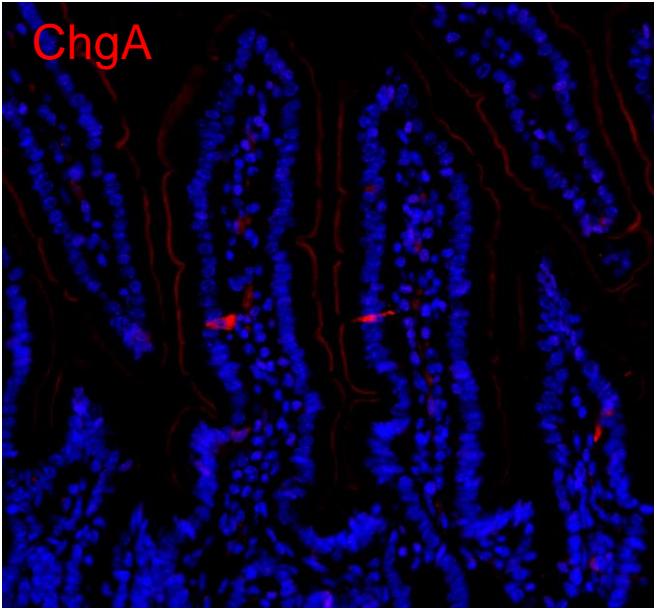


Supp Fig 3

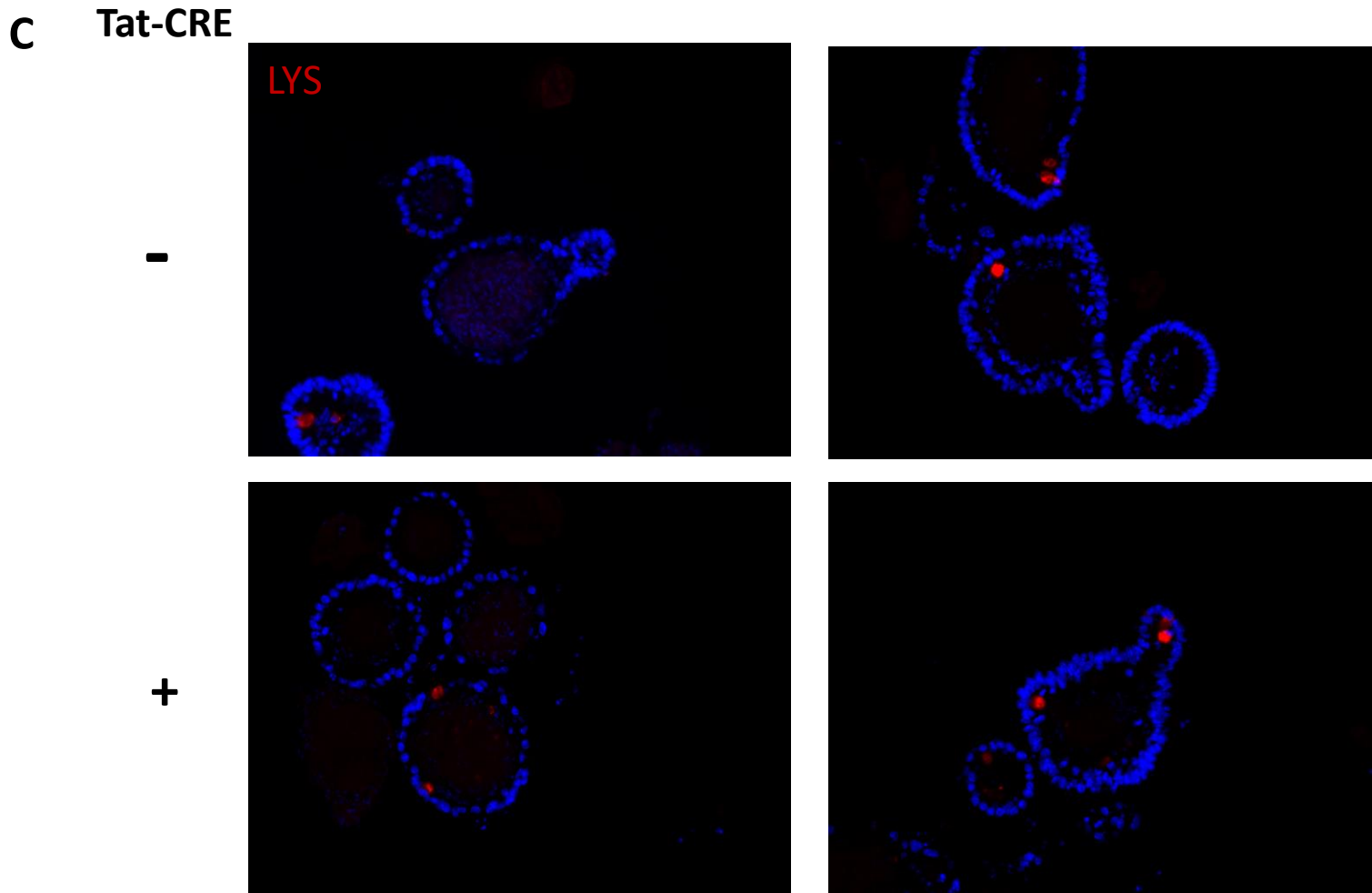
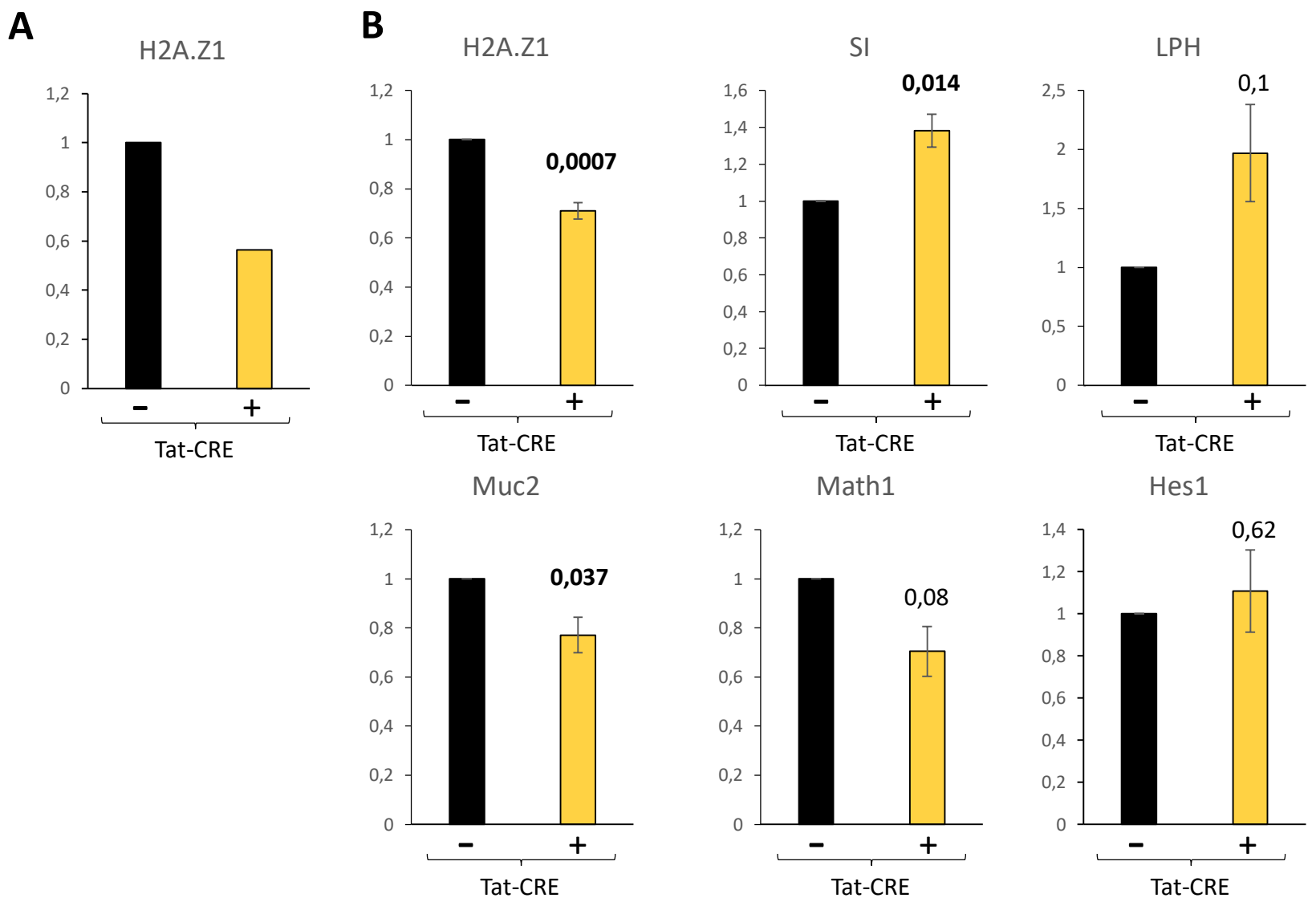
Ctrl

H2A.Z1 ^{-/-}
H2A.Z2 ^{-/-}

ChgA



Supp Fig 4



3) Conclusion

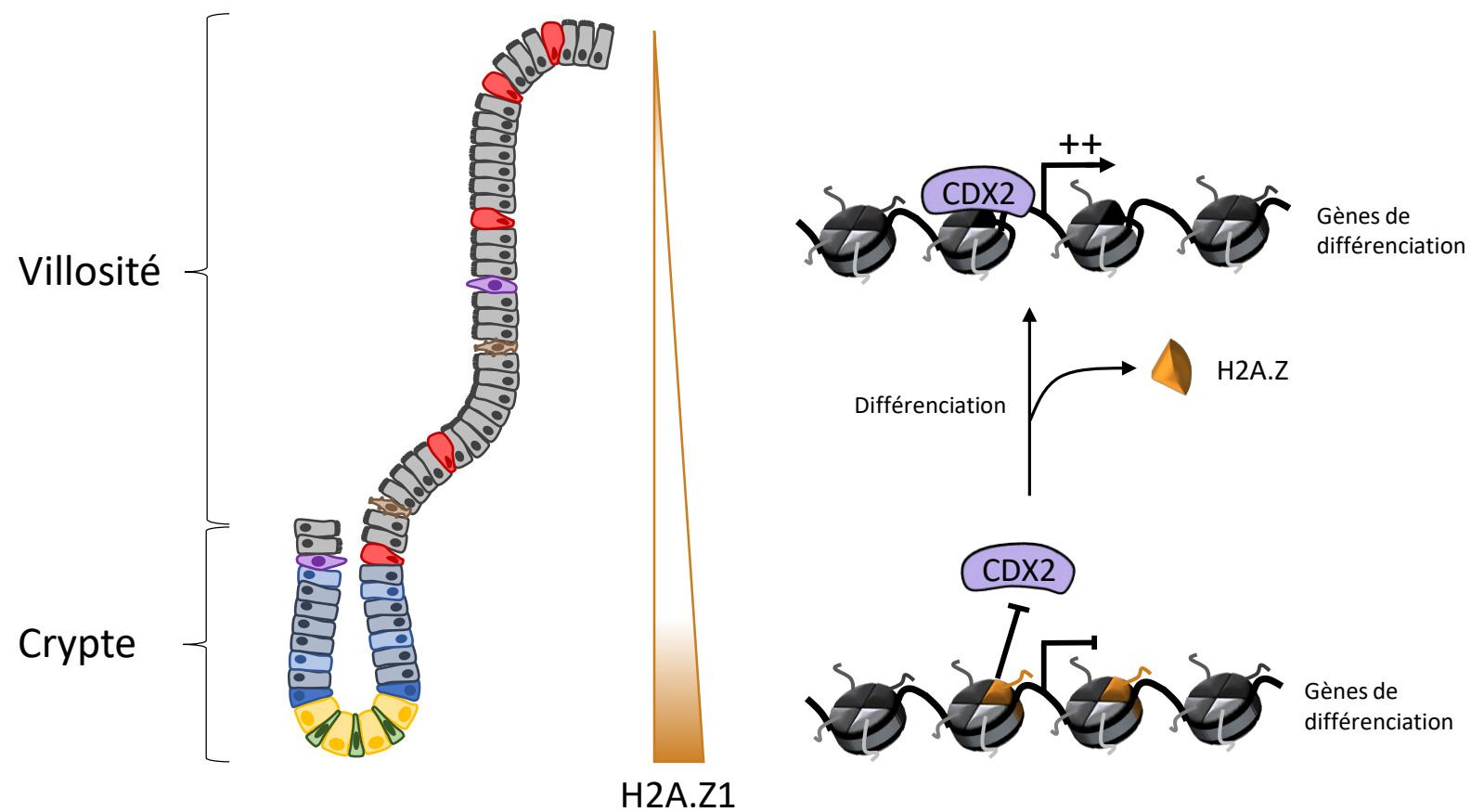
Nous avons montré que les isoformes de H2A.Z ont des rôles redondants dans le maintien du renouvellement du tissu. Ce rôle semble être dû à l'aspect indispensable de H2A.Z pour le maintien de la prolifération et des caractéristiques souches. Les isoformes de H2A.Z sont donc fondamentales à la robustesse du renouvellement de l'épithélium intestinal.

Nous avons également montré un rôle redondant dans l'inhibition de la différenciation des cellules du lignage sécrétoire. Ici, les 2 isoformes semblent inhiber cette différenciation en réprimant de manière dose-dépendante l'expression du facteur de transcription *Math1*. Là encore, les isoformes sont impliquées dans la robustesse du choix du lignage pour permettre de favoriser la différenciation en entérocytes plutôt qu'en cellules sécrétoires.

Cependant, nous avons également montré que H2A.Z1 et H2A.Z2 semblent avoir des rôles spécifiques et opposés sur l'expression de certains gènes de différenciation entérocytaire. Cet effet spécifique serait permis par une augmentation du ratio H2A.Z2/H2A.Z1 au cours de la différenciation, donnée qui reste à confirmer grâce à des expériences de ChIP au niveau des promoteurs des gènes de différenciation entérocytaire (dans les lignées Caco-2/15 avec l'une ou l'autre des isoformes taggées). Enfin, nous avons montré que cette dynamique spécifique des isoformes pourrait être expliquée par une incorporation préférentielle spécifique de H2A.Z1 par le complexe SRCAP et de H2A.Z2 par le complexe p400, au niveau de ces promoteurs. En effet, SRCAP phénocopie l'effet de H2A.Z1 alors que p400 phénocopie H2A.Z2, sur l'expression des marqueurs de différenciation entérocytaire dans les Caco-2/15. Là encore, ces résultats doivent être confirmés par des ChIP révélant l'incorporation des 2 isoformes taggées après déplétion de p400 ou SRCAP.

Pour conclure, nous avons montré que la dynamique des 2 isoformes du variant d'histone H2A.Z (diminution de H2A.Z total et augmentation du ratio H2A.Z2/H2A.Z1) est essentielle au maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal, en étant un facteur clé du maintien à l'état non différencié des cellules de la crypte, et en favorisant ensuite la différenciation entérocytaire dans les villosités. Pour la première fois, cette étude montre que les isoformes d'un même facteur chromatinien, agissant synergiquement ou de manière antagoniste, régulent les capacités d'auto-renouvellement d'un tissu, participent à l'établissement des lignages et sont donc un élément clé de l'homéostasie de l'organe.

DISCUSSION



H2A.Z1

Figure 45 : Modèle du contrôle de l'homéostasie de l'épithélium intestinal par H2A.Z1

H2A.Z1 est présent aux promoteurs de certains gènes de différenciation dans les cellules de la crypte ce qui inhibe la fixation du facteur de transcription CDX2 et donc l'expression de ces gènes. Au cours de la différenciation H2A.Z1 est enlevé de ces promoteurs, ce qui permet la fixation de CDX2 et l'expression des gènes.

I- La dynamique du variant d'histone H2A.Z1 contrôle l'identité des cellules intestinales

Le contrôle de l'identité cellulaire, notamment via la régulation du programme transcriptionnel, est indispensable au maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal. Kazakevych et ses collaborateurs ont démontré que la quantité globale du variant d'histone H2A.Z diminue au cours de la différenciation de l'épithélium intestinal. Cette diminution survient notamment au niveau des promoteurs de gènes dont l'expression augmente durant la différenciation en entérocytes des cellules souches intestinales (Kazakevych et al., 2017). L'hypothèse que cette dynamique de H2A.Z au sein de l'épithélium intestinal ait un rôle fonctionnel a alors été émise. Nous avons montré que l'isoforme 1 de ce variant (H2A.Z1) et sa dynamique au sein de l'épithélium sont essentielles au contrôle de l'identité des différents types cellulaires. En effet, nous avons tout d'abord démontré que H2A.Z1 est important pour le maintien de la prolifération des cellules intestinales *in cellulo* et *in vivo*. Ce variant est également impliqué dans la répression des gènes marqueurs de la différenciation entérocytaire (comme *Si* et *Lph*) ainsi que des cellules à mucus (comme *Muc2* et *Muc4*) *in cellulo* et *in vivo*.

a) H2A.Z1 contrôle la dynamique du facteur de transcription CDX2

Nous avons également montré que cette régulation se fait de manière épistatique avec le facteur de transcription spécifique de l'intestin : CDX2. En effet, H2A.Z1 inhibe le recrutement de CDX2 aux promoteurs de ses gènes cibles dans le but d'inhiber leur expression. Tous ces résultats montrent que la présence de H2A.Z1 permet le maintien de l'identité des cellules prolifératives de la crypte, puis sa diminution permet l'expression des gènes de différenciation grâce à CDX2 (Rispal et al., 2019) (Figure 45). Cette isoforme du variant H2A.Z est donc impliquée de manière importante dans l'homéostasie épithéliale intestinale.

Ainsi, nous avons montré pour la première fois qu'une marque chromatinienne, le variant d'histone H2A.Z1, contrôle la dynamique du facteur de transcription CDX2 (Rispal et al., 2019). En effet, le grand changement de patron de liaison de CDX2 entre les ISC et les cellules différenciées ne peut pas être expliqué seulement par le changement de son expression ou par son interaction avec d'autres facteurs de transcription (Verzi et al., 2010a, 2013). De plus, *Cdx2* est exprimé de manière équivalente entre les cellules progénitrices (qui n'expriment pas

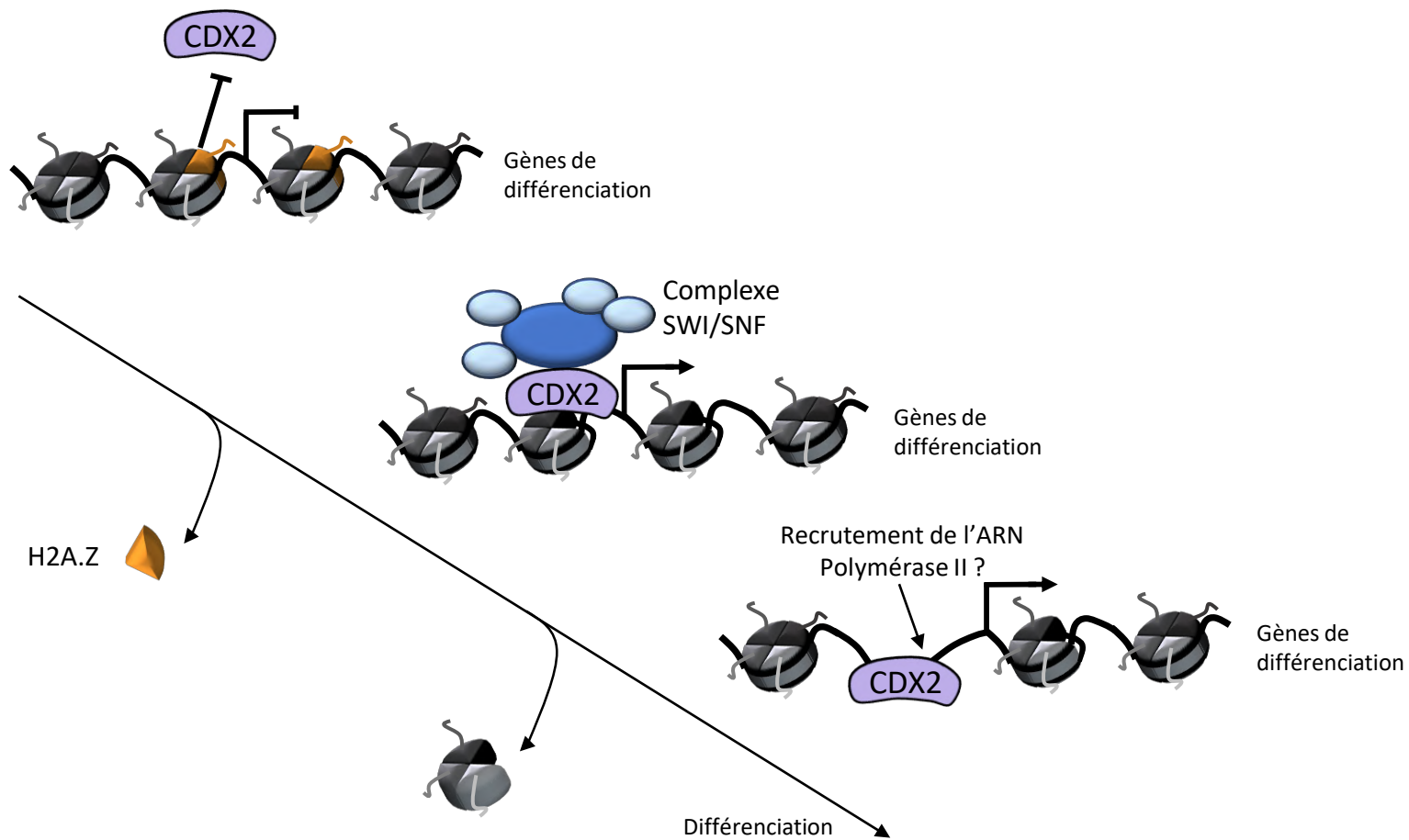


Figure 46 : Hypothèse de la séquence d'ouverture de la chromatine

Au cours de la différenciation, la diminution de H2A.Z aux promoteurs des gènes de différenciation pourrait permettre le recrutement du complexe SWI/SNF via la fixation de CDX2. Ce recrutement entrainerait alors l'éviction du nucléosome, ce qui favoriserait le recrutement de l'ARN polymérase II et l'expression des gènes.

la *Si*) et les entérocytes différenciés (qui expriment la *Si*) (Benoit et al., 2012). H2A.Z1 est donc essentiel au maintien de l'identité des cellules de la crypte grâce à l'inhibition, dans ces cellules, de la fixation de CDX2 et donc de l'expression des gènes de différenciation. Cette inhibition est perdue notamment dans les cellules progénitrices des souris KO pour *H2afz* (H2A.Z1) qui expriment de manière anormale la *Si* (Rispalet et al., 2019).

Au niveau du mécanisme chromatinien, l'éviction de H2A.Z1 et la fixation de CDX2 permettent l'ouverture locale de la chromatine au niveau des promoteurs des gènes de différenciation (diminution de l'enrichissement en histone H3) (Rispalet et al., 2019). Ceci suggère que CDX2, après sa liaison, recrute des facteurs qui vont permettre l'ouverture de la chromatine, ce qui est cohérent avec la diminution de l'accessibilité observée dans les souris KO pour *Cdx2* (Verzi et al., 2010a). De plus, il a été montré que CDX2 est capable de recruter le complexe de remodelage SWI/SNF au niveau de certaines de ses cibles pour ouvrir localement la chromatine (Nguyen et al., 2017) (Figure 46). Pour confirmer ces résultats à grande échelle, les analyses de l'expression par RNA-seq, de la fixation de CDX2 par ChIP-seq et de l'accessibilité par ATAC-seq après le KO de *H2afz* dans l'épithélium intestinal semblent essentielles à la meilleure compréhension de ces mécanismes. Ces analyses pourraient, de plus, permettre l'étude du lien entre H2A.Z1 et CDX2 au niveau des enhancers des gènes de différenciation, puisque ces 2 acteurs sont connus pour agir également sur la transcription depuis ces régions régulatrices (Giaino et al., 2018; Verzi et al., 2010a).

b) H2A.Z1 et paysage chromatinien dans le contrôle de l'homéostasie

Durant la différenciation des cellules ES, la dynamique chromatinienne au niveau des promoteurs des gènes bivalents permet l'expression rapide des gènes inhibés auparavant (Bernstein et al., 2006). Cependant, une telle régulation reste encore à prouver au sein de l'épithélium intestinal. Le variant d'histone H2A.Z (détecté avec un anticorps reconnaissant les 2 isoformes) est présent au niveau des promoteurs des gènes « signatures » des entérocytes en association, en grande partie, avec les marques activatrices H3K4me3 et/ou H3K27ac dans les ISC (Kazakevych et al., 2017). Le rôle et la dynamique de ces 3 marques chromatinienes laissent présager un rôle de bivalence de ces dernières, de la même façon que pour les gènes développementaux (Bernstein et al., 2006). En effet, la présence d'une marque inhibitrice (H2A.Z1), en plus des marques activatrices (H3K4me3 et H3K27ac), permettrait de réprimer l'expression des gènes de différenciation dans les ISC. Le retrait de

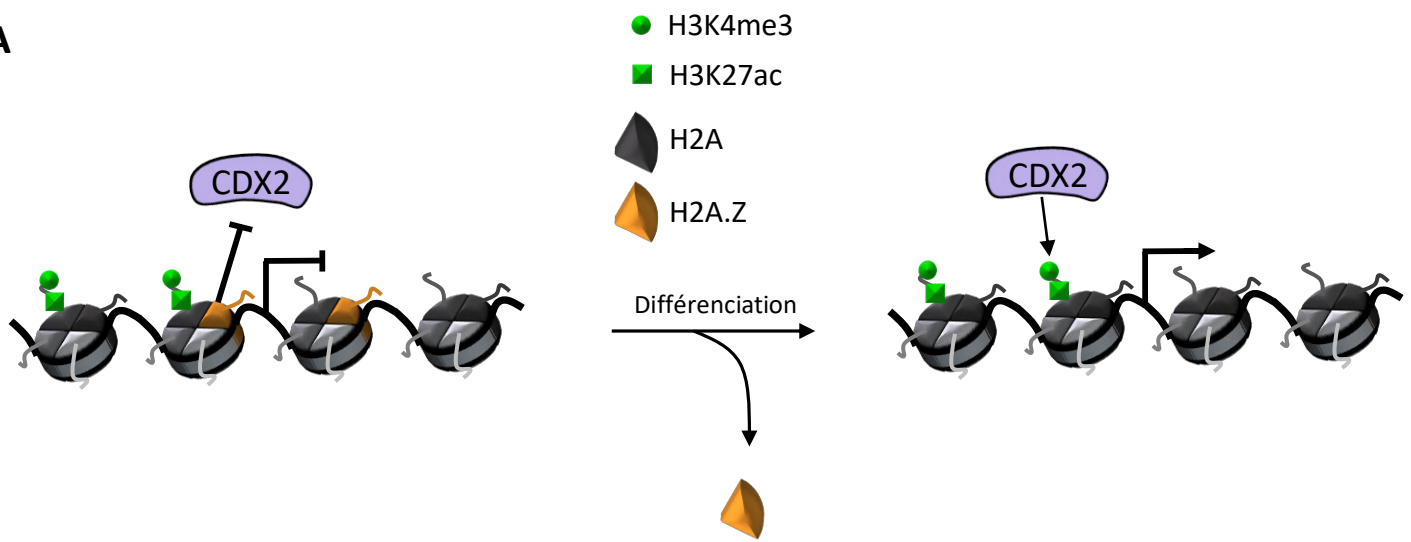
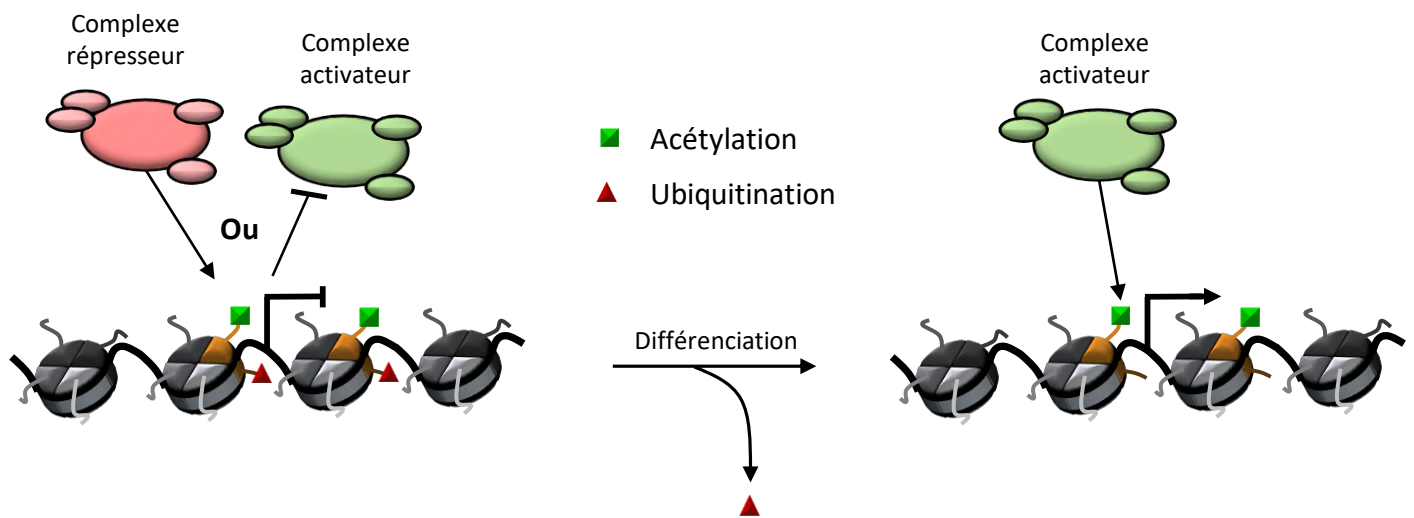
A**B**

Figure 47 : Hypothèse de la bivalence des promoteurs des gènes de différenciation

A : La présence de la marque répressive (H2A.Z1) en plus des 2 activatrices (H3K4me3 et H3K27ac) inhiberait l'expression des gènes de différenciation. La perte de H2A.Z1 au cours de la différenciation permettrait la rapide expression de ces gènes grâce aux recrutements de CDX2 par les marques activatrices. **B** : L'ubiquitination de H2A.Z1 pourrait permettre le recrutement de complexe répresseur de la transcription dans les cellules non différenciées. Au cours de la différenciation, la perte de cette ubiquitination permettrait à l'acétylation de H2A.Z de recruter des complexes activateurs de la transcription.

H2A.Z1 au cours de la différenciation permettrait une rapide expression de ces gènes grâce à la présence des 2 marques activatrices (Figure 47A). Pour valider cette hypothèse, l'analyse du rôle des 2 marques activatrices sur l'expression des cibles de H2A.Z1 et la dynamique de CDX2 semble importante. Pour cela, le ciblage (KO) des enzymes qui déposent ces marques, en addition du KO de *H2afz*, pourrait confirmer ce rôle en induisant une réversion du phénotype (i.e. perte du recrutement de CDX2 et de l'augmentation de l'expression des gènes de différenciation).

Un rôle bivalent pourrait être aussi joué par H2A.Z1 lui-même, qui pourrait être modifié post-traductionnellement afin d'induire des effets différents sur la transcription, comme cela a été démontré dans les cellules ES (Surface et al., 2016). En effet, l'acétylation de H2A.Z est fortement corrélée à l'activation de la transcription (Dalvai et al., 2013; Valdés-Mora et al., 2012), alors que son ubiquitination est plutôt associée à la répression de la transcription (Draker et al., 2011). H2A.Z1 pourrait donc porter les 2 marques activatrices et inhibitrices au niveau des promoteurs des gènes de différenciation dans les ISC. Ce double marquage, et notamment l'ubiquitination, pourrait permettre de recruter des cofacteurs répresseur de la transcription qu'ils soient directement chromatinien (comme PRC2 et H3K27me3, Surface et al., 2016) ou non. Au cours de la différenciation, l'ubiquitination serait alors retirée et H2A.Z1 acétylé pourrait permettre le recrutement de coactivateurs transcriptionnels (comme Brd2 (Draker et al., 2012; Surface et al., 2016). Ce recrutement permettrait l'ouverture locale de la chromatine et donc la fixation de facteurs de transcription spécifiques (comme CDX2) et l'expression des gènes (Figure 47B). La présence de H2A.Z1 acétylé pourrait également déstabiliser le nucléosome (comme déjà démontré *in vitro*, Ishibashi et al., 2009), ce qui conduirait directement à l'éviction des nucléosomes contenant H2A.Z (en accord avec l'éviction d'H3 observée *in cellulo*) et permettrait ainsi l'ouverture locale de la chromatine et la fixation des facteurs de transcription spécifiques. Enfin, d'autres modifications post-traductionnelles de H2A.Z méconnues (méthylation... Sevilla and Binda, 2014) pourraient aussi être impliquées dans cette régulation. Pour étudier ces hypothèses, l'analyse de la dynamique des modifications post-traductionnelles de H2A.Z1 au cours de la différenciation semble fondamentale. Pour cela, des ChIP-seq de ces modifications dans des cellules différenciées ou non peuvent être réalisées dans différents modèles : soit *in vivo* avec une dissociation et séparation des cellules de la crypte et de la villosité, soit *in cellulo* avec des modèles de cellules prolifératives ou différenciées (HIEC, Caco-2/15, ...).

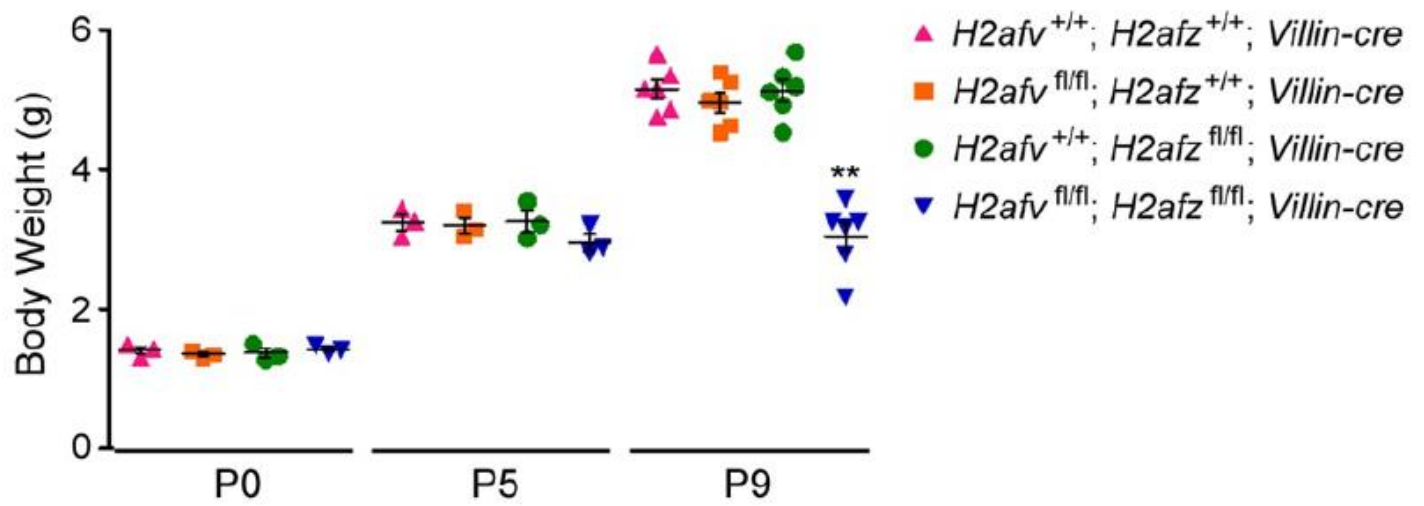


Figure 48 : La perte des 2 isoformes de H2A.Z entraine une perte du poids des souris

Poids des souris sauvages (rose), KO pour H2afv (orange), H2afz (vert) ou les 2 (bleu) le jour de la naissance (P0), ainsi que 5 (P5) et 9 jours (P9) après la naissance. D'après Zhao et al., 2019.

Enfin, il a été montré que le complexe répresseur PRC2 est impliqué *in cellulo* dans l'inhibition de l'expression des marqueurs de différenciation entérocytaire (*SI, LPH...*) (Benoit et al., 2012; Koppens et al., 2016). Cependant d'autres études n'ont pas observé cet effet répresseur *in vivo* (Chiacchiera et al., 2016; Koppens et al., 2016). En plus des causes possibles évoquées en introduction, cette différence pourrait être également expliquée par une compensation *in vivo* de H2A.Z1. En effet, *in vivo* l'épithélium intestinal, lors de la perte de PRC2, met peut-être en place un mécanisme de sauvetage qui aboutit à la surexpression de *H2afz* pour quand même inhiber l'expression des gènes de différenciation et ainsi maintenir le plus possible l'équilibre homéostatique. Dans la même idée, les gènes codant pour les sous-unités du complexe PRC2 pourraient aussi être surexprimés dans l'épithélium des souris KO pour *H2afz* pour limiter les effets de cette perte. Pour confirmer ces hypothèses, nous pourrions analyser l'expression et la dynamique de H2A.Z1 au sein de l'épithélium intestinal des souris KO pour PRC2 (mais aussi l'inverse) ou bien analyser la différenciation entérocytaire dans les souris KO pour les gènes codant pour H2A.Z1 et PRC2. Si cela se confirme, H2A.Z1 et PRC2 pourraient être impliqués dans la robustesse de l'inhibition de la différenciation entérocytaire pour permettre le maintien de l'identité des cellules prolifératives de la crypte, ce qui est essentiel au renouvellement de l'épithélium et donc à la vie de l'organisme.

II- Rôles redondants ou spécifiques des 2 isoformes de H2A.Z

1) Rôles redondants

a) Les isoformes de H2A.Z assurent la robustesse du renouvellement de l'épithélium intestinal

Il existe 2 isoformes du variant d'histone H2A.Z qui sont codées par 2 gènes différents (Eirín-López et al., 2009). Nous avons montré que ces 2 isoformes semblent avoir un rôle essentiel et redondant dans le renouvellement de l'épithélium, car seul le double KO (*H2afz* et *H2afv*) affecte drastiquement la taille des villosités *in vivo* (Rispalet et al., en préparation). Cette perte du renouvellement des cellules épithéliales semble être à l'origine de la perte de poids des souris double KO décrite dans l'étude de Zhao et ses collaborateurs (Zhao et al., 2019) (Figure 48). Zhao et ses collaborateurs ont montré que ce phénotype semblait être dû à la perte des capacités souches des ISC. En effet, les auteurs ont montré l'impossibilité de former des organoïdes à partir de cryptes issues des souris doubles KO (Zhao et al., 2019). Ce résultat est cohérent avec la diminution du marquage OLFM4 que nous observons dans les souris double

KO, ainsi qu'avec la diminution de l'expression des marqueurs des ISC (*Lgr5* et *Olfm4*) dans les organoïdes après l'induction du double KO (Rispal et al., en préparation). Cette perte du renouvellement peut aussi être due à un défaut de prolifération des cellules de la crypte comme nous avons pu l'observer *in vivo* et dans les organoïdes double KO (Rispal et al., en préparation).

b) Lien étroit entre H2A.Z et MATH1 dans le contrôle de l'identité des cellules progénitrices

Les 2 isoformes semblent également avoir un rôle redondant dans l'inhibition de la différenciation du lignage sécrétoire, comme en témoigne la plus forte augmentation du nombre de cellules à mucus et de cellules de Paneth dans le double KO que dans le KO de *H2afz* seul. Cette inhibition par les 2 isoformes de H2A.Z semble être médiée par la répression de l'expression du facteur de transcription essentiel à la différenciation du lignage sécrétoire : MATH1 (Rispal et al., en préparation). Si cette hypothèse se vérifie, la déplétion de *Math1* dans les organoïdes double KO (*H2afz* et *H2afv*) devrait inhiber l'augmentation de l'expression des marqueurs du lignage sécrétoire observée dans ce double KO.

Là encore, la dynamique chromatinienne pourrait être impliquée dans la robustesse du choix du lignage de différenciation. En effet, le complexe répresseur PRC2 et la marque qu'il dépose H3K27me3 sont également impliqués dans l'inhibition de la différenciation du lignage sécrétoire en inhibant, notamment, l'expression des facteurs de transcription *Math1* et *Gfi1* (Chiacchiera et al., 2016; Koppens et al., 2016). Ces résultats suggèrent que PRC2/H3K27me3 et H2A.Z sont impliqués dans la robustesse à la fois du maintien de l'identité des progéniteurs mais également du destin absorbant de ces progéniteurs, ce déséquilibre étant essentiel à la physiologie digestive de l'épithélium intestinal. Ces résultats suggèrent également une nouvelle fois le possible lien entre PRC2/H3K27me3 et H2A.Z comme déjà montré dans les cellules ES (Ku et al., 2012; Surface et al., 2016) et suggéré dans l'inhibition du lignage entérocytaire. Si ce lien se vérifie, il renforcerait l'hypothèse de l'ubiquitination de H2A.Z dans les cellules non différenciées, comme déjà montré dans les cellules ES où l'ubiquitination de H2A.Z permet le recrutement de PRC2 pour inhiber les gènes de différenciation (Surface et al., 2016). Là aussi, l'analyse de la dynamique de PRC2/H3K27me3 dans l'épithélium intestinal des souris KO pour *H2afz* et *H2afv*, et notamment au niveau des régions régulatrices de *Math1* et

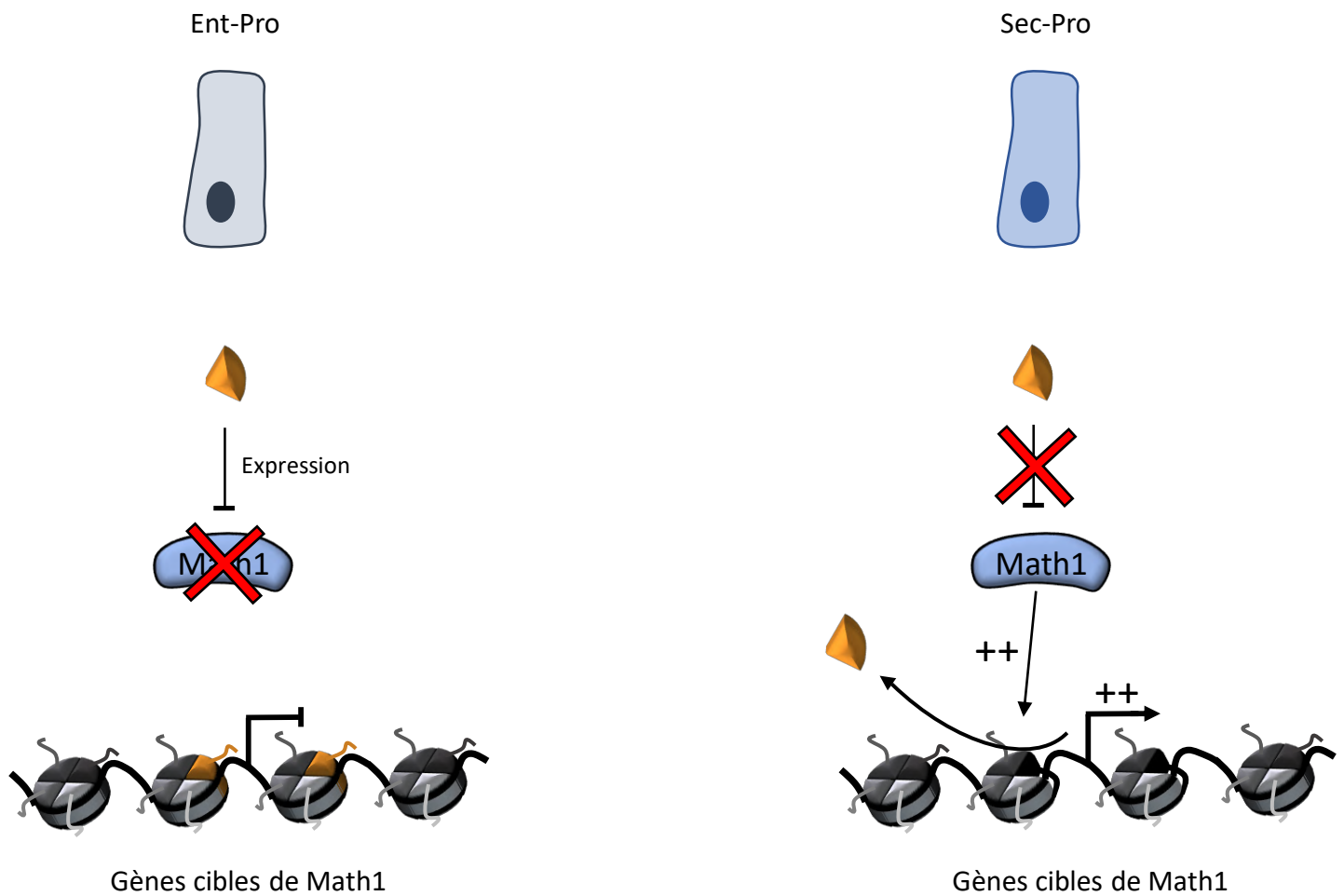


Figure 49 : Hypothèse du rôle de H2A.Z dans le choix et l'engagement dans un lignage

Dans les progéniteurs entérocytaires (Ent-pro), H2A.Z, en plus de son rôle sur l'inhibition de l'expression de *Math1*, pourrait être présent aux promoteurs des gènes cibles de MATH1, donc des gènes du lignage sécrétoire, pour les inhiber. Dans les progéniteurs sécrétoires (Sec-pro), pour permettre l'expression de ces gènes, H2A.Z ne devrait plus inhiber l'expression de *Math1*. De plus MATH1 devrait favoriser l'éviction de H2A.Z au niveau de ses cibles.

Gfi1, semble primordiale pour la meilleure compréhension du rôle de la dynamique chromatinienne dans ces processus.

Les travaux du laboratoire de Ramesh Shivdasani ont montré une grande similarité d'accessibilité de la chromatine entre les progéniteurs sécrétoires (sec-pro) et les progéniteurs absorbants (ent-pro) (Kim et al., 2014). Cependant, il y a tout de même des régions avec une accessibilité de la chromatine différente entre ces 2 types cellulaires, qui ont pour particularités d'être négatives pour les 2 marques H3K4me2 et H3K27ac et d'être plus accessibles dans les sec-pro (Jadhav et al., 2017) (Figure 30B). MATH1, qui est suffisant pour induire une identité de sec-pro car il est suffisant pour induire la conversion des ent-pro en sec-pro (Kim et al., 2014), semble donc être impliqué, directement ou indirectement, dans ce changement chromatinien. La dynamique de H2A.Z, en plus de son rôle direct sur l'expression de *Math1*, pourrait également avoir un rôle dans ce changement (Figure 49). Il serait donc intéressant d'analyser la dynamique de H2A.Z au niveau de ces régions différentiellement accessibles durant la conversion des ent-pro en sec-pro. L'implication de H2A.Z dans ce processus suggèrerait une boucle de régulation entre H2A.Z et MATH1 (i.e. H2A.Z contrôle la transcription de *Math1* qui contrôlerait ensuite la dynamique de H2A.Z), ce qui renforcerait le lien étroit entre les facteurs de transcription et les marques chromatinienne dans la régulation de l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

Les auteurs ont également montré que les ent-pro possèdent une accessibilité à la chromatine très similaire à celle des ISC, alors que les sec-pro possèdent des régions plus accessibles que les ISC (i.e. ces régions différentes sont les mêmes qu'avec les ent-pro) (Jadhav et al., 2017). Ces régions différentiellement accessibles dans les sec-pro nécessitent une modification lors de la dédifférenciation de ces cellules en ISC qui est observée suite à la perte des cellules *Lgr5*⁺ (Jadhav et al., 2017). La dynamique de H2A.Z pourrait, là aussi, être impliquée dans ce phénomène essentiel pour le maintien à long terme de l'intégrité du tissu, en amont ou en aval de MATH1. Enfin, il a également été montré le rôle indispensable de PRC2/H3K27me3 dans le processus de dédifférenciation (Chiacchiera et al., 2016) et un rôle de H2A.Z dans ce phénomène renforcerait encore le lien entre ces 2 acteurs chromatinien dans la physiologie intestinale.

L'inhibition de la voie Notch, via le KO de *Rbpj*, entraîne la forte augmentation du nombre de cellules à mucus, de Paneth et entéroendocrines au niveau du duodénum. Cependant, le nombre de cellules entéroendocrines augmente peu dans l'iléon de ces souris (Kim and

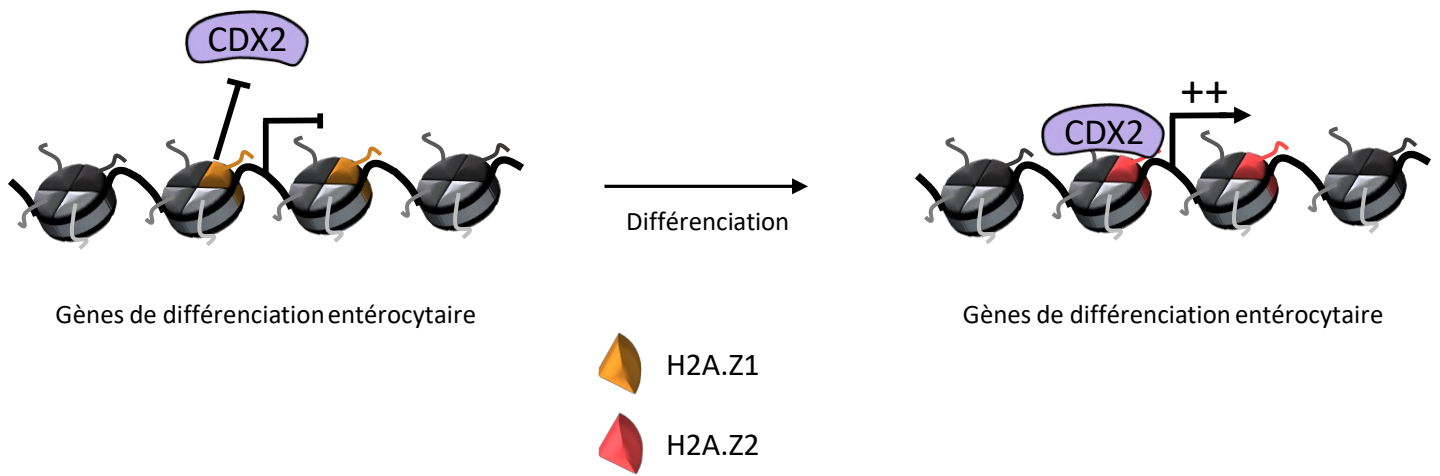


Figure 50 : Modèle du rôle spécifique des isoformes de H2A.Z dans le contrôle de l'expression des gènes de différenciation entérocytaire

Dans les cellules non différenciées H2A.Z1 est présent aux promoteurs des gènes de différenciation entérocytaire pour inhiber la fixation de CDX2 et donc l'expression de ces gènes. Durant la différenciation, H2A.Z2 pourrait remplacer H2A.Z1 et favoriserait la fixation de CDX2 et l'expression de ces gènes.

Shivdasani, 2011). Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette différence puisse être expliquée par la différence de proportion de chaque type cellulaire entre les parties proximales et distales de l'intestin. La faible différence du nombre de cellules entéroendocrines que nous observons dans le jéjunum des souris KO pour *H2afz* et *H2afv*, malgré la forte augmentation des cellules à mucus et de Paneth, pourrait donc être expliquée par ce phénomène (Rispal et al., en préparation). Une autre explication possible est que H2A.Z ait un rôle sur la dynamique des facteurs de transcription spécifiques de chaque type cellulaire, en aval de MATH1. Pour répondre à cette question l'analyse de l'expression et de la dynamique des facteurs de transcription NEUROG3, GFI1, SPDEF, SOX9 ou encore POU2F3 dans l'épithélium des souris KO pour *H2afz* et *H2afv* semble nécessaire.

2) Rôles spécifiques

Malgré des effets similaires sur le renouvellement de l'épithélium et l'inhibition de la différenciation du lignage sécrétoire, les 2 isoformes de H2A.Z semblent avoir des effets spécifiques sur la différenciation entérocytaire terminale. En effet, la déplétion de H2A.Z1 *in cellulo* et *in vivo* entraîne l'augmentation de l'expression des marqueurs de différenciation entérocytaire (comme *SI* ou *LPH*), alors que la déplétion de H2A.Z2 en addition de celle de H2A.Z1 entraîne la réversion, au moins en partie, de ce phénotype ((Rispal et al., 2019), Rispal et al., en préparation). Ces résultats suggèrent des rôles opposés de H2A.Z1 et H2A.Z2 sur l'expression des gènes de différenciation entérocytaire, même si l'analyse détaillée de l'effet du KO de H2A.Z2 sur l'expression de ces gènes reste à compléter. Si ce résultat se confirme, l'analyse de la liaison de CDX2 après la déplétion de H2A.Z2 semble essentielle pour savoir si l'effet différentiel se fait via un recrutement différentiel de CDX2 (Figure 50).

a) Rôle spécifique dû aux modifications post-traductionnelles ?

L'analyse des différences fonctionnelles entre les 2 isoformes de H2A.Z fait, en ce moment, l'objet d'intenses investigations. Malgré la faible différence de séquence protéique entre les 2 isoformes, il a été montré que chacune d'entre elles pouvait avoir un rôle spécifique (Dunn et al., 2017; Greenberg et al., 2019; Vardabasso et al., 2015). Tout d'abord, la substitution de la T14 de H2A.Z1 remplacée par A14 chez H2A.Z2 pourrait engendrer des changements dans les modifications post-traductionnelles du variant d'histone puisque le résidu est non phosphorylable sur H2A.Z2, et situé aux alentours d'une zone contenant les lysines acétylables

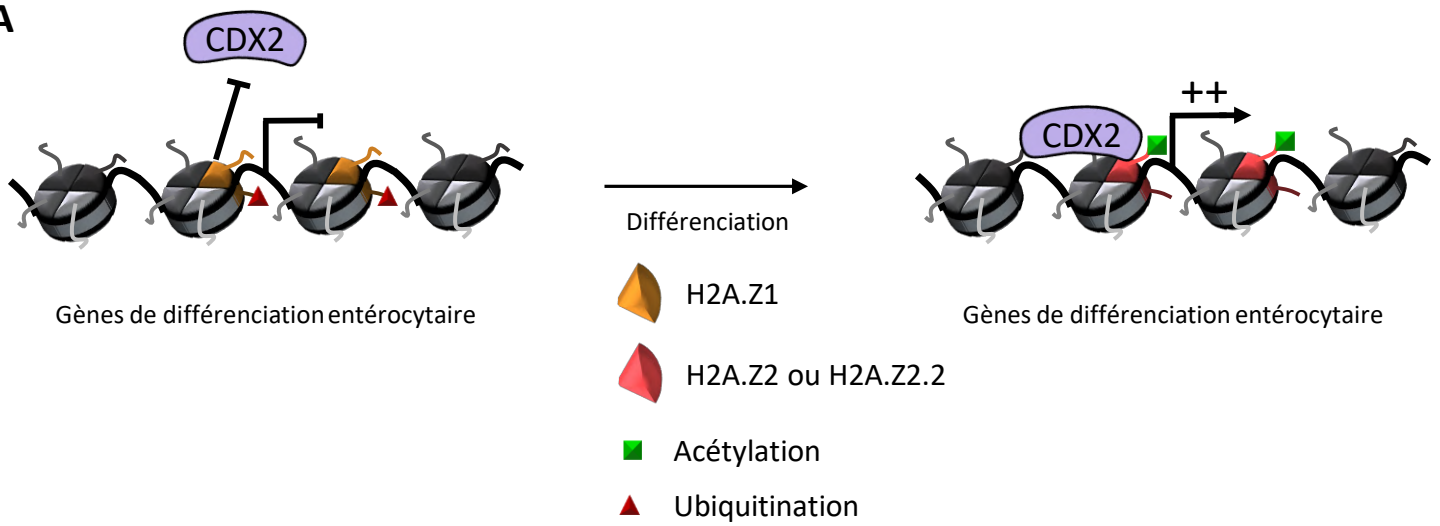
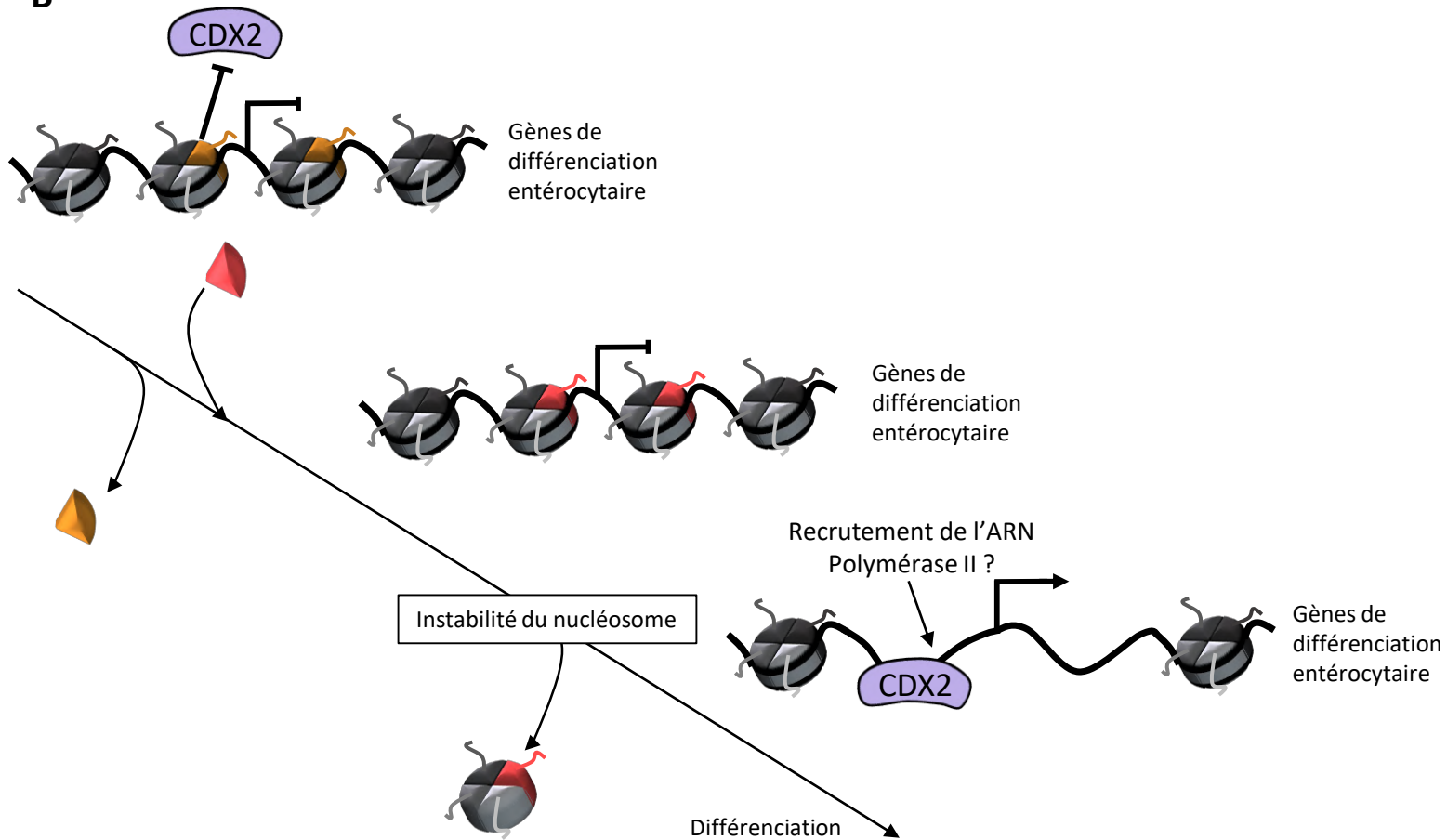
A**B**

Figure 51 : Hypothèse du mécanisme du rôle spécifique des isoformes de H2A.Z dans le contrôle de l'expression des gènes de différenciation entérocytaire

A : Dans les cellules non différenciées, H2A.Z1 pourrait être préférentiellement ubiquitiné ce qui inhiberait l'expression des gènes de différenciation entérocytaire via la répression de la fixation de CDX2. Au cours de la différenciation, H2A.Z2 ou H2A.Z2.2 acétylés pourraient remplacer H2A.Z1 et favoriserait le recrutement de CDX2 et donc l'expression des gènes. **B** : Une deuxième hypothèse pourrait être que le remplacement de H2A.Z1 par H2A.Z2 ou H2A.Z2.2 entraînerait l'instabilité du nucléosome, qui serait alors plus facilement enlevé de la chromatine. Cette ouverture locale de la chromatine permettrait alors le recrutement de CDX2 et l'expression des gènes.

(K4, K7, K11, K13, K15) (Eirín-López et al., 2009). Cette différence pourrait donc affecter le niveau d'acétylation de l'isoforme, ce qui pourrait expliquer des rôles divergents sur l'expression des marqueurs de différenciation entérocytaire. La substitution V127A pourrait également avoir un rôle similaire en influant sur l'ubiquitination des résidus des lysines proches. Etant donné le rôle prépondérant de ces 2 modifications sur l'effet de H2A.Z sur la transcription, l'analyse de l'acétylation et de l'ubiquitination spécifiques de H2A.Z1 ou de H2A.Z2 semble primordiale pour la compréhension des rôles spécifiques des 2 isoformes de H2A.Z dans le contrôle de la différenciation entérocytaire (Figure 51A).

b) Rôle spécifique dû à la dynamique du nucléosome ?

La substitution T38S en modifiant structuralement la boucle L1 (Horikoshi et al., 2013), qui est importante pour l'interaction des histones au sein du nucléosome, ainsi que la substitution V127A dans une zone essentielle pour le maintien de H2A.Z dans la chromatine (Wratting et al., 2012), pourraient entraîner une stabilité du nucléosome différente selon l'isoforme. Cette stabilité du nucléosome pourrait être diminuée par l'incorporation de H2A.Z2 ce qui expliquerait les rôles différents des deux isoformes (Figure 51B). Enfin, les techniques utilisées pour dépléter (siARN, KO) ou pour quantifier (amorces RT-qPCR ou anticorps) ne permettent pas de différencier les 2 variants d'épissage de H2A.Z2 (H2A.Z2 et H2A.Z2.2). Il serait donc intéressant d'analyser spécifiquement le rôle de H2A.Z2.2, qui de par sa séquence tronquée en C-ter, déstabilise fortement le nucléosome dans lequel il est incorporé (Bönisch et al., 2012). On peut donc émettre l'hypothèse qu'une incorporation spécifique de H2A.Z2.2 aux promoteurs des gènes de différenciation entérocytaire pourrait favoriser leur expression (Figure 51B).

c) Rôle spécifique dû à l'interactome ?

Notre équipe a analysé les interactomes spécifiques de H2A.Z1 et H2A.Z2 dans le modèle cellulaire K-562. Malgré la forte similarité d'interactome entre les 2 isoformes, certaines protéines interagissent spécifiquement avec H2A.Z1 ou H2A.Z2 (communication personnelle). Il serait donc très intéressant d'analyser les interactomes de H2A.Z1 et H2A.Z2 dans le modèle de différenciation entérocytaire Caco-2/15. L'interaction avec des facteurs ou cofacteurs de transcription, ou avec des modificateurs de la chromatine, différents entre les 2 isoformes, pourrait expliquer également la différence d'effet sur la transcription des gènes de

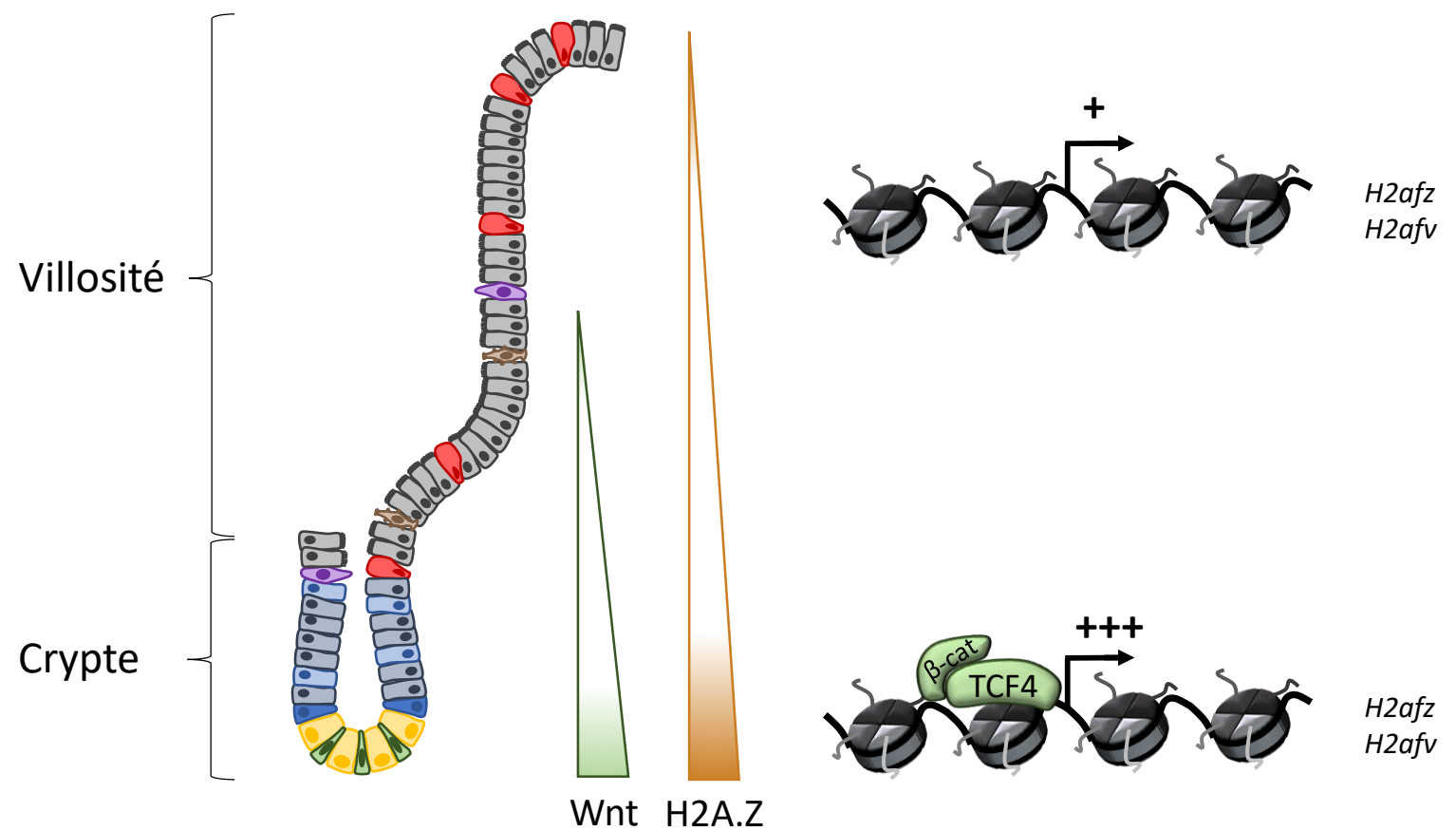


Figure 52 : Modèle de la régulation de la dynamique de H2A.Z par la voie Wnt

Dans les cryptes, la forte activation de la voie Wnt favorise l'expression des gènes codant pour les isoformes de H2A.Z grâce à l'action directe du facteur de transcription TCF4 en association avec la β -CATENINE. Lors de la migration des cellules vers le haut des villosités, la diminution de l'activité de Wnt entraîne la diminution de l'expression des gènes codant pour les isoformes de H2A.Z.

différenciation entérocytaire. Enfin, Dunn et ses collaborateurs ont montré que H2A.Z1 et H2A.Z2 interagissent avec une forme potentiellement différente de H2B dans les neurones (Dunn et al., 2017). Là aussi, cette interaction de H2A.Z2 avec une forme spécifique de H2B (modification post-traductionnelle spécifique) pourrait avoir un effet spécifique sur la stabilité du nucléosome et donc, comme énoncé plus haut, expliquer les rôles différents des 2 isoformes.

III- Régulation de la dynamique de H2A.Z et de ses isoformes au sein de l'épithélium intestinal

1) Dynamique de H2A.Z total

Compte tenu des rôles essentiels de H2A.Z et de ses isoformes dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal, l'étude de leur dynamique et de leur régulation semble indispensable à la meilleure compréhension du rôle de la chromatine dans ce processus. Kazakevych et ses collaborateurs ont montré que la quantité globale de H2A.Z diminue au cours de la différenciation des ISC en entérocytes et, plus précisément, au niveau des promoteurs d'un grand nombre de gènes de différenciation (Kazakevych et al., 2017). Cette dynamique est compatible avec le rôle de H2A.Z dans le maintien de l'identité non différenciée des cellules intestinales.

a) Rôle des voies de signalisation

Nous avons montré que la voie de signalisation Wnt, qui a un patron d'activation très similaire au patron d'expression des gènes codant pour les 2 isoformes de H2A.Z et qui est aussi essentielle au maintien de l'identité non différenciée, régule, au moins en partie, la dynamique de H2A.Z dans les cellules épithéliales intestinales (Rispal et al., 2019). Pour cela, la voie Wnt favorise directement l'expression des gènes codant pour H2A.Z1 (Rispal et al., 2019) et H2A.Z2 (données non publiées) via l'action du facteur de transcription de la voie TCF4 (TCF7L2) en association avec la β -CATENINE (Figure 52). Ces résultats mettent en lumière un lien indirect entre l'activité de la voie Wnt et la dynamique du facteur de transcription CDX2 dans le contrôle de l'équilibre entre prolifération et différenciation, ce qui renforce le lien direct déjà démontré (Blache et al., 2004). Ceci laisse également présager d'un lien entre la voie Wnt et le facteur de transcription dépendant de la voie Notch : MATH1. La dynamique du variant

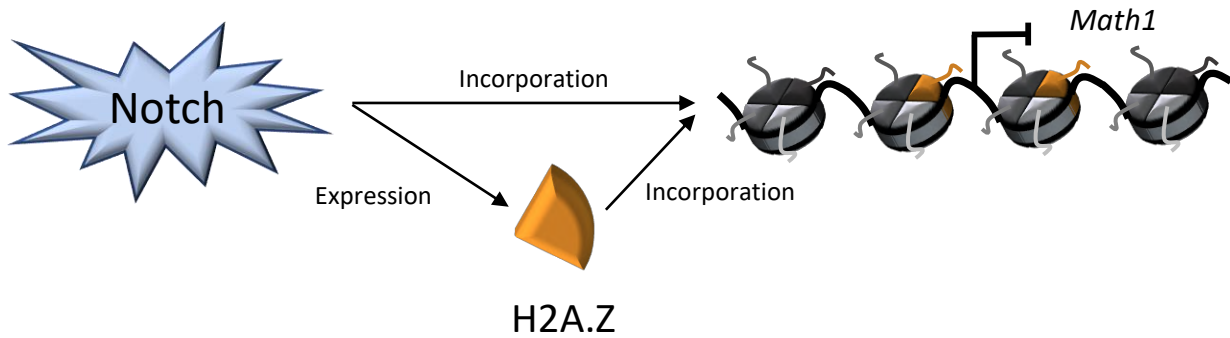


Figure 53 : Hypothèse de la régulation de la dynamique de H2A.Z par la voie Notch

La voie Notch pourrait réguler la dynamique de H2A.Z de 2 manières, soit en favorisant son incorporation au promoteur de *Math1*, soit en favorisant son expression et donc son incorporation, dans le but d'inhiber l'expression de *Math1*.

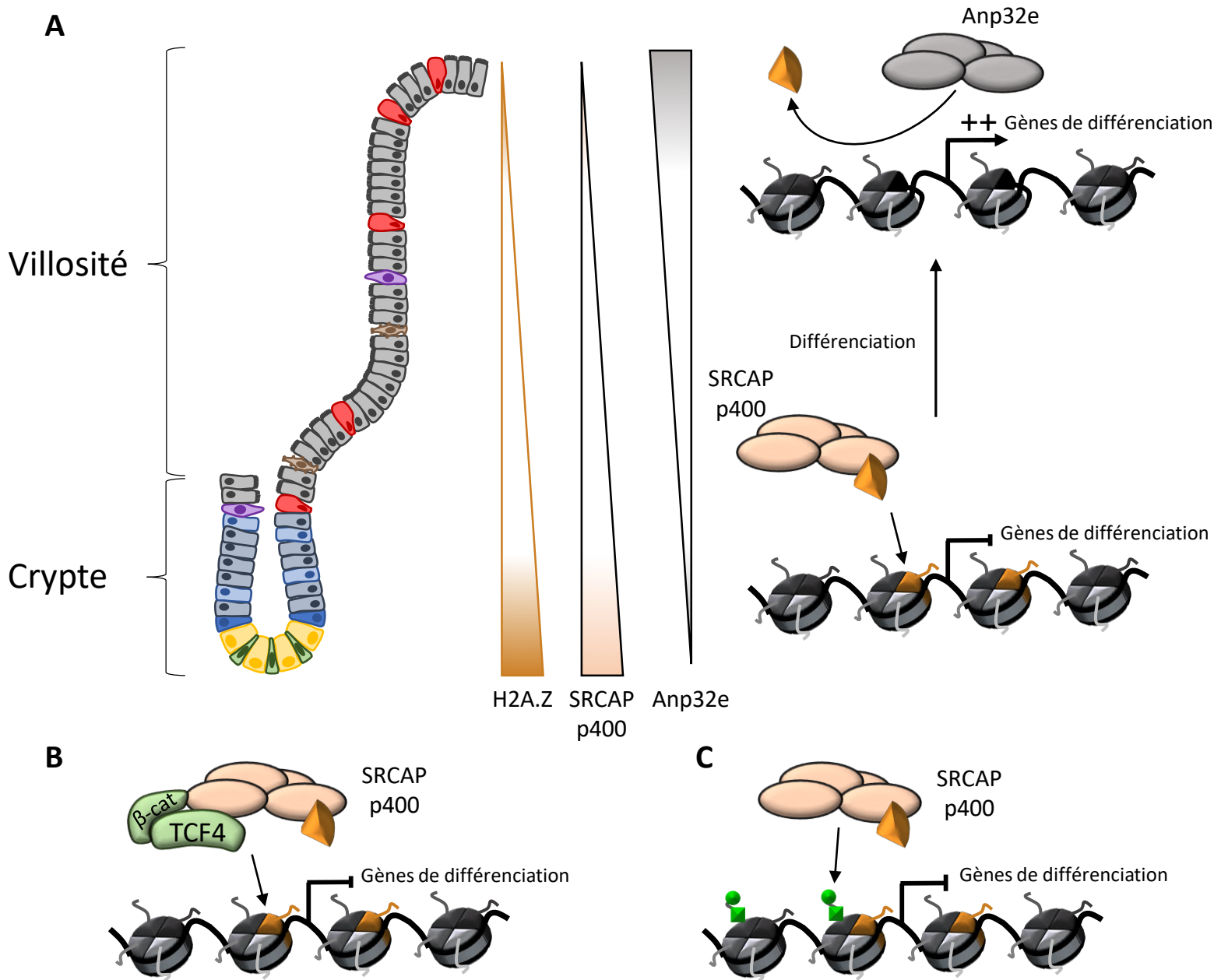


Figure 54 : Hypothèse de la régulation de la dynamique de H2A.Z par ses incorporeurs

A : La dynamique de diminution de la présence de H2A.Z au cours de la différenciation pourrait être due à la diminution de son incorporation par SRCAP ou p400 ou à l'augmentation de son éviction par Anp32e. Le ciblage de l'incorporation de H2A.Z par SRCAP ou p400 au niveau des promoteurs des gènes de différenciation dans les cellules de la crypte pourrait être dû au recrutement par un facteur de transcription (**B**, comme TCF4) ou par la chromatine pré-existante (**C**, comme H3K4me3 ou H3K27ac).

d'histone H2A.Z pourrait donc être essentielle pour faire le lien entre l'activation des voies de signalisation par des signaux extérieurs et la transcription au sein des cellules, via les facteurs de transcription. Cette dynamique serait donc importante pour le contrôle de l'identité des cellules selon leur position dans l'axe crypte-villosité, ce qui pourrait être une caractéristique commune des modifications chromatinienne au sein de l'épithélium intestinal. L'analyse de la dynamique, ainsi que sa régulation, d'autres marques chromatinienne dans l'épithélium intestinal semble donc très intéressante.

La dynamique de H2A.Z pourrait également être régulée par d'autres voies de signalisation. Par exemple, la voie Notch pourrait contrôler l'expression globale de H2A.Z (*H2afz* et *H2afv*) dans le but de réprimer l'expression de *Math1*. La voie Notch pourrait également contrôler plus finement la dynamique de H2A.Z en favorisant son incorporation au niveau des régions régulatrices de l'expression de *Math1* (Figure 53). Pour étudier cette hypothèse, l'expression et la dynamique de H2A.Z après inhibition de la voie Notch pourraient être analysées.

b) Rôle des complexes responsables de son incorporation et/ou éviction

La dynamique de H2A.Z, en plus du contrôle de son expression, peut être aussi régulée par le contrôle de son incorporation et de son éviction au sein de la chromatine, ces processus étant eux-mêmes possiblement régulés par les voies de signalisation. Par exemple, l'incorporation par les complexes p400 ou SRCAP pourrait diminuer au cours de la différenciation et/ou l'éviction par ANP32e pourrait augmenter (Figure 54A). Il serait donc intéressant d'analyser la dynamique globale de ces complexes au niveau des promoteurs des gènes de différenciation pour mieux comprendre la régulation de la dynamique de H2A.Z.

Cette incorporation spécifique dans les ISC pourrait être ciblée par des facteurs de transcription impliqués dans le maintien du statut non différencié des cellules de la crypte. Les facteurs de transcription possiblement impliqués pourraient être retrouvés dans l'analyse de l'interactome de H2A.Z. L'analyse de facteurs de transcription candidats pourrait également être faite. Par exemple, il a été montré que le facteur de transcription TCF4 est capable de se fixer sur des régions régulatrices de la transcription identiques à celles liées par CDX2 (Verzi et al., 2010b). TCF4 pourrait donc permettre l'incorporation de H2A.Z au niveau des promoteurs des gènes de différenciation pour inhiber la fixation de CDX2 dans les ISC, en recrutant un des complexes d'incorporation, ce qui démontrerait un nouveau lien entre la voie Wnt et la dynamique de H2A.Z (Figure 54B).

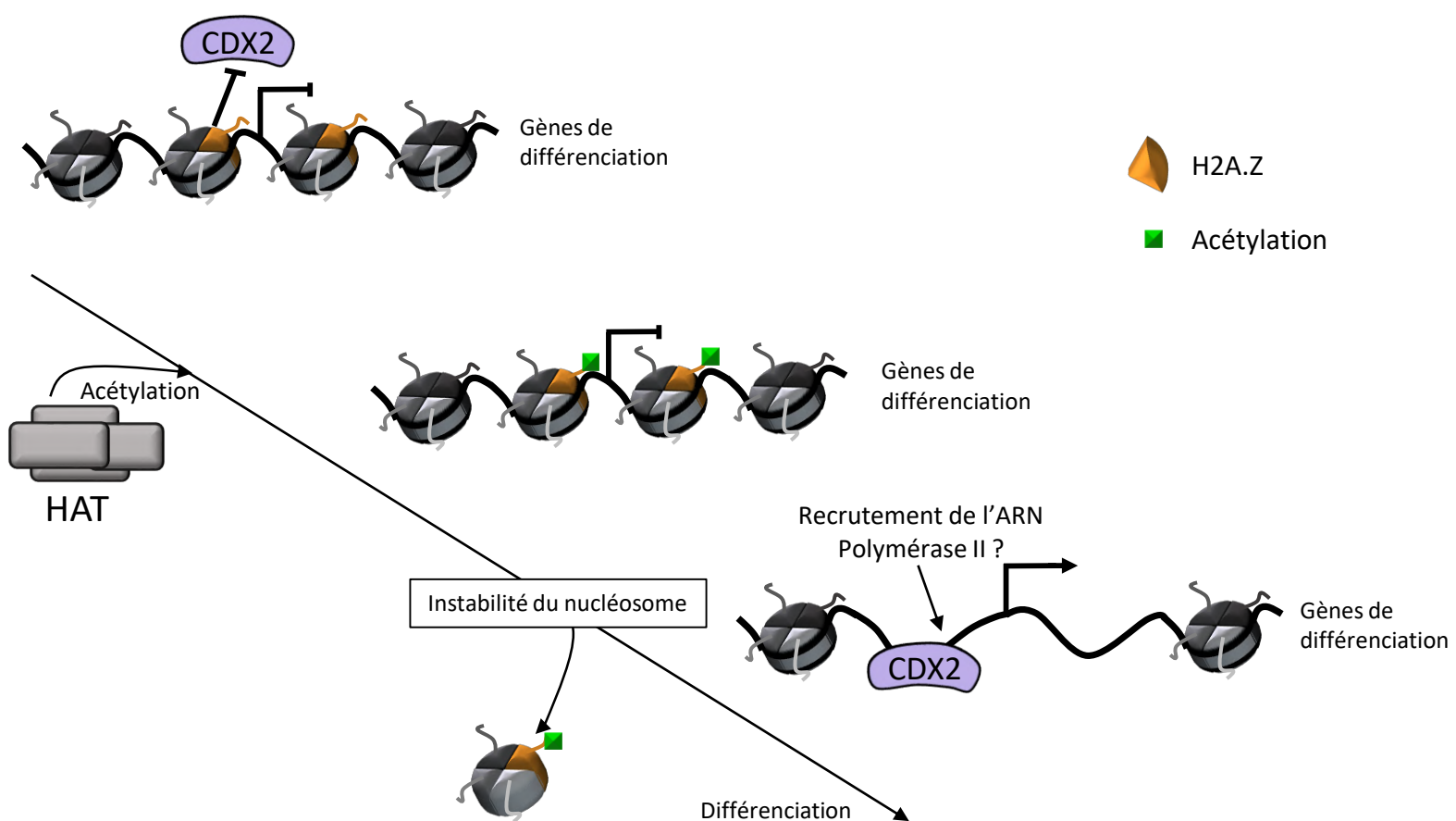


Figure 55 : Hypothèse du rôle des modifications post-traductionnelles dans la dynamique de H2A.Z

Au cours de la différenciation, H2A.Z pourrait être acétylé au niveau des promoteurs des gènes de différenciation pour favoriser l'instabilité du nucléosome. Ce nucléosome serait donc plus facilement enlevé de la chromatine, ce qui permettrait l'expression de ces gènes.

Cette incorporation pourrait être aussi due à la chromatine préexistante. Par exemple, les marques H3K27ac et H3K4me3 pourraient permettre l'incorporation de H2A.Z (Figure 54C), puisque, comme déjà démontré, l'acétylation de la chromatine est capable de recruter les complexes p400 et SRCAP pour incorporer H2A.Z (Altaf et al., 2010; Hsu et al., 2018; Klein et al., 2018). Ce scénario est possible seulement si un autre mécanisme entraîne l'éviction active de H2A.Z (via ANP32e) au cours de la différenciation, puisque ces 2 marques chromatiniennes restent à la chromatine au cours de la différenciation, alors que H2A.Z est enlevé (Kazakevych et al., 2017). Il est donc nécessaire d'analyser plus finement la dynamique de H3K27ac, H3K4me3 et H2A.Z au cours de la spécification des ISC pour savoir laquelle est déposée en premier au niveau des promoteurs des gènes de différenciation, et donc savoir laquelle pourrait faciliter l'enrichissement des autres. Il serait également intéressant d'analyser la dynamique des complexes p400 et SRCAP après déplétion de H3K27ac et H3K4me3 via la perte de fonction des enzymes qui les déposent.

c) Rôle des modifications post-traductionnelles

Enfin, les modifications post-traductionnelles de H2A.Z pourraient être un autre moyen de contrôler la dynamique de ce variant d'histone. En effet, un changement de modifications post-traductionnelles de H2A.Z au cours de la différenciation pourrait entraîner son éviction ou également engendrer la déstabilisation du nucléosome entier et donc, par conséquence, l'éviction de H2A.Z (Figure 55). Là encore, il serait intéressant d'analyser la dynamique des modifications post-traductionnelles de H2A.Z au cours de la différenciation ainsi que le rôle des enzymes qui déposent ces marques.

2) Dynamique spécifique de H2A.Z1 et H2A.Z2

Le manque d'anticorps capable de distinguer les 2 isoformes de H2A.Z complique énormément l'analyse de la dynamique spécifique à chacune d'elles. Nous avons montré, au niveau de l'ARN, que même si l'expression des gènes codant pour les 2 isoformes diminue, le ratio d'expression *H2afv/H2afz* (H2A.Z2/H2A.Z1) augmente au cours de la différenciation *in vivo*, dans l'épithélium des villosités vs celui des cryptes, et *in cellulo*, dans une cinétique de différenciation des Caco-2/15 (Rispal et al., en préparation). Cette augmentation du ratio, si elle se confirme au niveau protéique, serait cohérente avec un rôle activateur de H2A.Z2 et répresseur de H2A.Z1 sur l'expression de certains gènes de différenciation entérocytaire

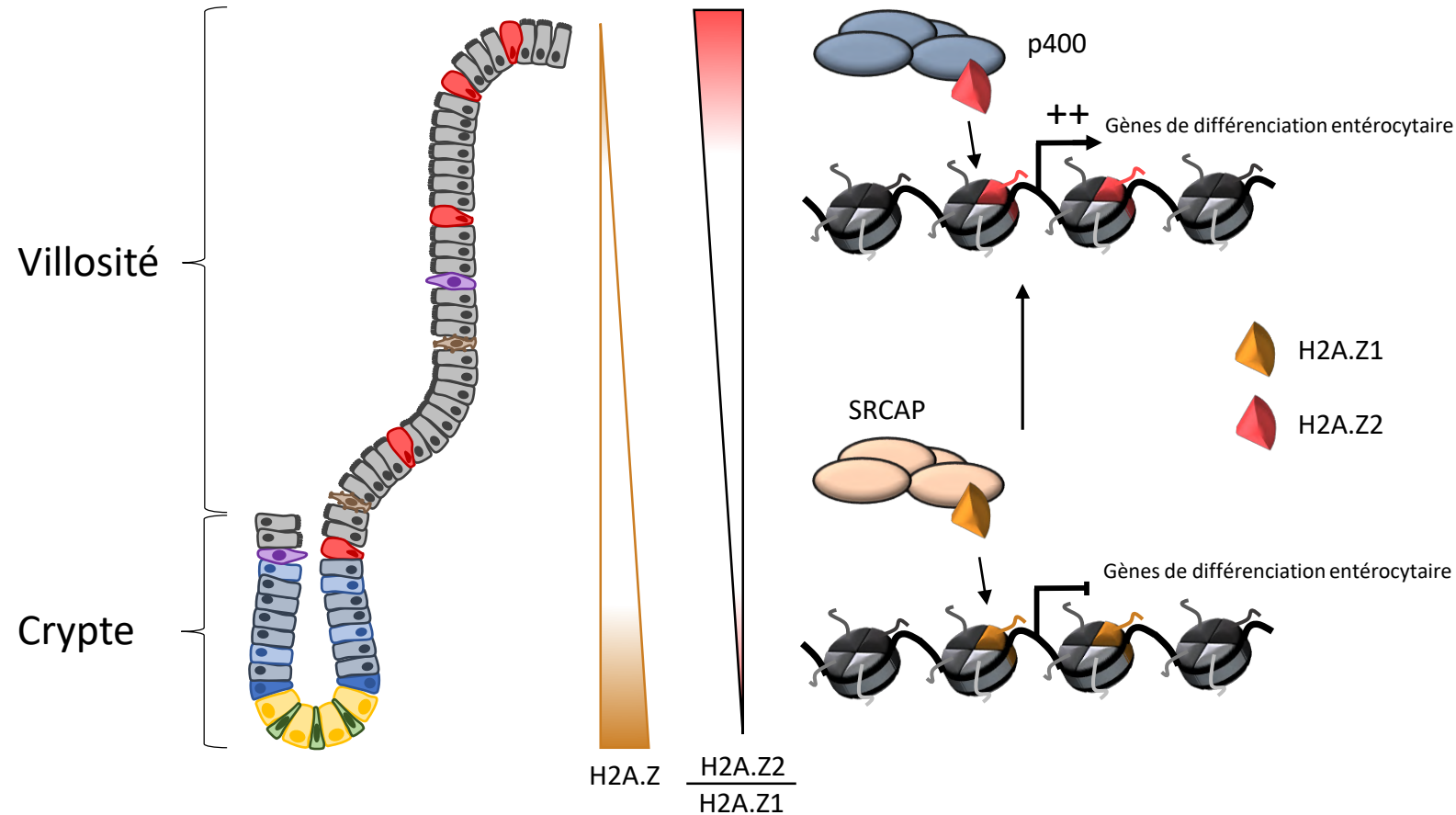


Figure 56 : Hypothèse de la régulation de la dynamique des isoformes de H2A.Z

Dans cette hypothèse, le complexe SRCAP incorporerait H2A.Z1 aux promoteurs des gènes de différenciation entérocytaire dans la crypte pour inhiber leur expression. Puis au cours de la différenciation, l'augmentation du ratio H2A.Z2/H2A.Z1 ou l'incorporation spécifique de H2A.Z2 par le complexe p400 entrainerait l'incorporation spécifique de H2A.Z2 aux niveaux de ces promoteurs pour permettre l'expression de ces gènes.

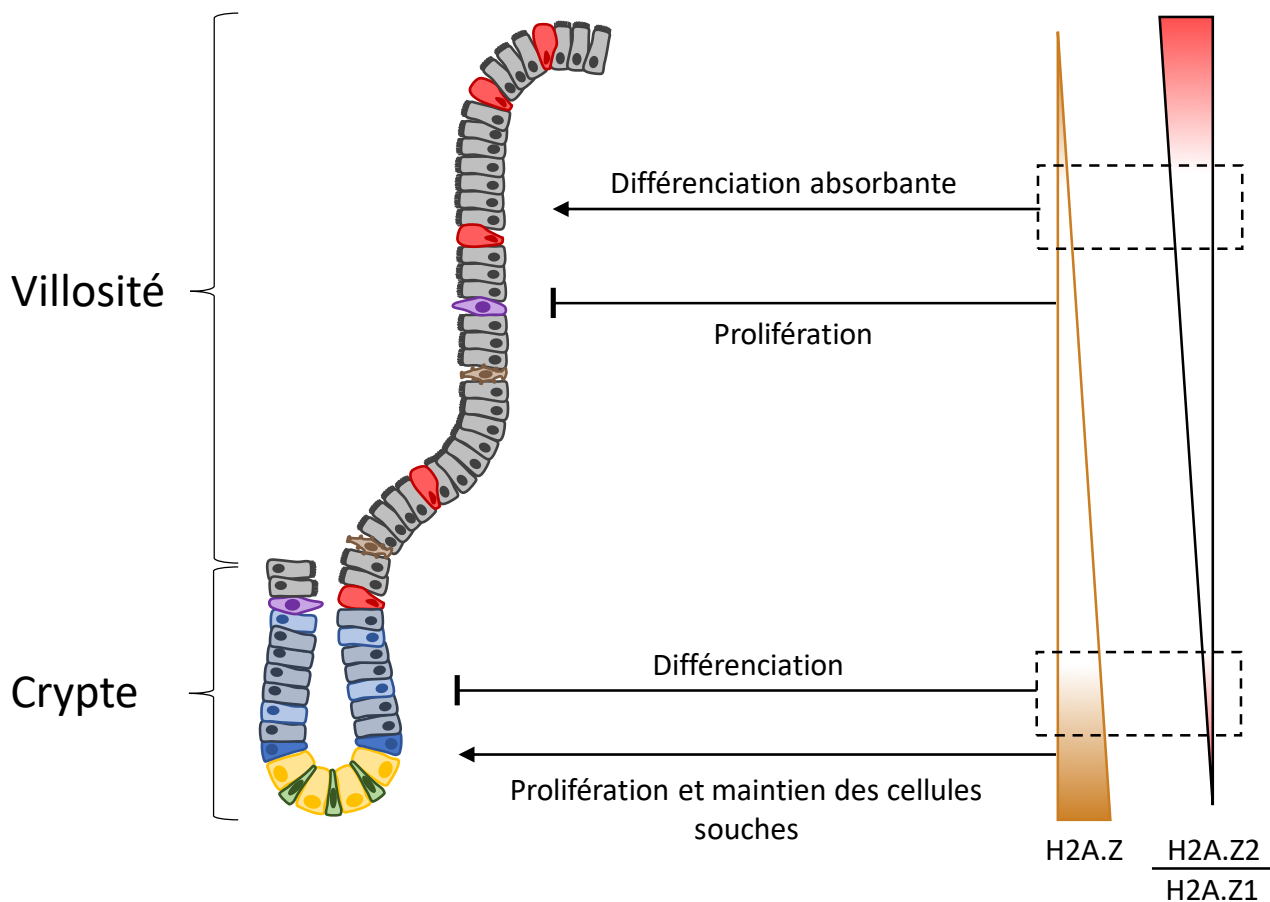


Figure 57 : Modèle du rôle de la dynamique des isoformes de H2A.Z dans le contrôle de l'homéostasie de l'épithélium intestinal

Dans la crypte, la forte quantité totale du variant d'histone H2A.Z permet le maintien de l'identité non différenciée des cellules en promouvant la prolifération et en inhibant la différenciation. Durant la migration des cellules dans la villosité, la diminution de H2A.Z couplée à l'augmentation du ratio H2A.Z2/H2A.Z1 permet la différenciation notamment en cellules du lignage absorbant.

(Figure 56). Pour confirmer cette hypothèse, nous réaliserons l'analyse de la dynamique globale (à l'échelle du génome) et spécifique (au niveau des régions régulatrices des gènes de différenciation entérocytaire) de H2A.Z1 et H2A.Z2, au cours de la différenciation de cellules Caco-2/15 étiquetées pour l'une ou l'autre des isoformes (que nous venons d'obtenir au laboratoire).

Cette dynamique différente selon l'isoforme, si elle se confirme, pourrait être expliquée par une incorporation différente par des acteurs différents. En effet, les déplétions de SRCAP et de p400 dans les cellules Caco-2/15 phénocopient, respectivement, les déplétions de H2A.Z1 et H2A.Z2 sur l'expression des marqueurs de différenciation entérocytaire. De plus, nous avons également montré que p400 semble interagir plus fortement avec H2A.Z2 qu'avec H2A.Z1 (Rispalet et al., en préparation). Donc nous pouvons émettre l'hypothèse que SRCAP incorpore H2A.Z1 pour inhiber la différenciation entérocytaire alors que p400 incorpore H2A.Z2 pour la favoriser (Figure 56). Il apparaît donc essentiel d'analyser, dans les cellules Caco-2/15 étiquetées pour chaque isoforme, l'incorporation au niveau des régions régulatrices des gènes de différenciation, de H2A.Z1 et de H2A.Z2 après déplétion de SRCAP ou p400. Cette hypothèse nécessite également une dynamique de SRCAP et/ou p400 ou de leurs partenaires au sein des complexes multiprotéiques auxquels ils appartiennent, qui serait différente au cours de la différenciation et qu'il serait aussi intéressant d'analyser.

Pour conclure, le variant d'histone H2A.Z et ses isoformes contrôlent, via leur dynamique, l'homéostasie de l'épithélium intestinal. Pour cela, la diminution globale de H2A.Z permet la différenciation alors que la modification du ratio H2A.Z2/H2A.Z1 semble favoriser la différenciation du lignage entérocytaire. Cette dynamique particulière permet donc le maintien de 2 aspects fondamentaux de l'homéostasie de l'épithélium intestinal : l'équilibre entre prolifération et différenciation et le déséquilibre de la différenciation en faveur du lignage entérocytaire (Figure 57).

IV- H2A.Z contrôle l'identité intestinale au cours du développement ?

Nous avons montré que le variant d'histone H2A.Z contrôle la dynamique de CDX2 au cours de la différenciation des ISC ; or la dynamique de ce facteur de transcription est également essentielle au développement intestinal. CDX2 est notamment primordial pour l'acquisition de l'identité postérieure au cours du développement du tube digestif primitif (Gao et al., 2009). Ce rôle est permis, au moins en partie, par le gradient d'expression de Cdx2, qui est

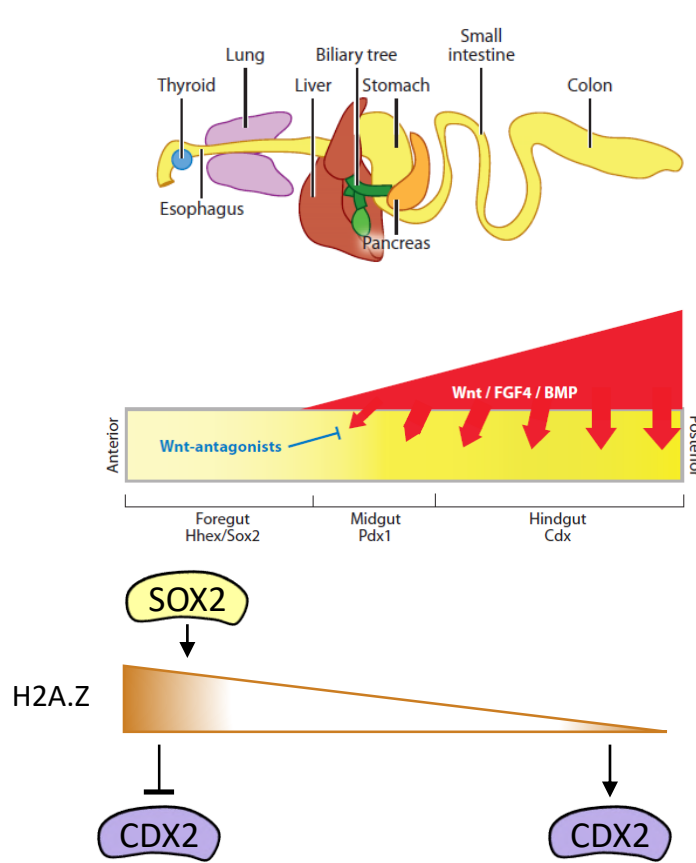


Figure 58 : Hypothèse du rôle de H2A.Z dans le contrôle du développement du tube digestif primitif

La dynamique de H2A.Z pourrait réguler la régionalisation antéro-postérieure du tube digestif primitif. Pour cela, la présence de H2A.Z dans la partie antérieure pourrait inhiber l'action de CDX2, et la diminution de H2A.Z le long du tube permettrait l'action de CDX2 et donc l'acquisition de l'identité postérieure. Enfin, cette dynamique de H2A.Z pourrait être contrôlée par le facteur de transcription SOX2.

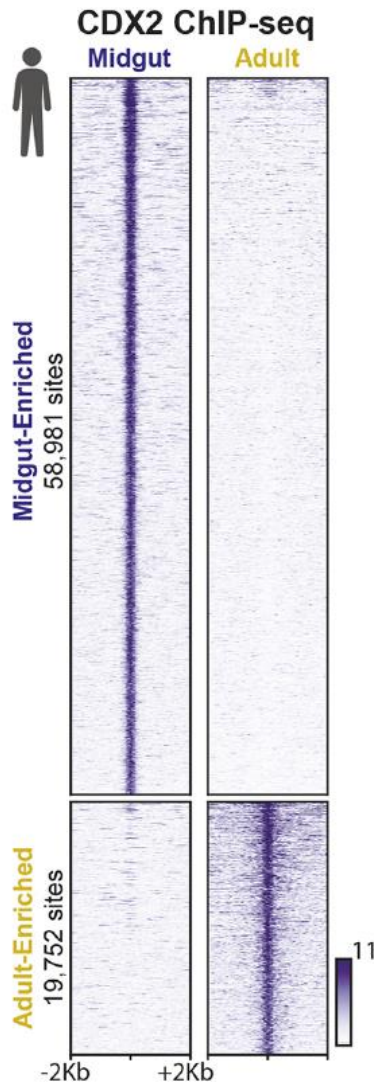


Figure 59 : Dynamique de CDX2 au cours du développement de l'épithélium intestinal

Signaux de ChIP-seq de CDX2 dans des cellules de l'intestin primitif humain (Midgut) obtenues in vitro à partir de cellules ES, et dans des cellules de l'épithélium duodénal adulte humain collectées sur des patients lors d'une opération de Whipple. A noter la grande différence de patron de liaison de CDX2 entre l'épithélium intestinal embryonnaire et adulte. D'après Kumar et al., 2019.

plus exprimé dans la partie postérieure du tube digestif (Beck et al., 1995; Gao et al., 2009). Cependant, l'expression, même plus faible, de *Cdx2* dans la partie antérieure du tube laisse entrevoir la possibilité qu'un autre mécanisme l'empêche de jouer le même rôle dans cette partie. L'inhibition de l'action de CDX2 est essentielle puisque la surexpression ectopique de *Cdx2* dans les cellules antérieures (estomac) induit un phénotype postérieur (de type intestinal) (Mutoh et al., 2002, 2005). On peut donc faire l'hypothèse que H2A.Z pourrait jouer un rôle via l'inhibition de la fixation de CDX2 à ses cibles dans la partie antérieure du tube digestif primitif, de la même manière qu'au cours de la différenciation des ISC (Figure 58).

De plus, la surexpression du facteur de transcription *Sox2* dans la totalité du tube digestif primitif à E8.5, entraîne l'antériorisation de la partie postérieure du tube digestif. Lorsque ces souris sont adultes, les auteurs ont observé une diminution de l'expression des marqueurs des cellules épithéliales intestinales (*Muc2*, *Lct...*), qui sont également des cibles connues de CDX2. Les auteurs ont également montré que pour cela, SOX2 ne régule pas directement l'expression de *Cdx2* mais plutôt sa liaison aux promoteurs de ses cibles (Raghoebir et al., 2012). On peut également émettre l'hypothèse que SOX2 inhibe la fixation de CDX2 par l'intermédiaire de H2A.Z (Figure 58).

Enfin, Kumar et ses collaborateurs ont montré un grand changement de patron de liaison de CDX2 entre les cellules du tube digestif primitif et l'intestin adulte (Figure 59). Les auteurs ont également montré que ce changement est précédé temporellement par la modification de l'accessibilité de la chromatine (Kumar et al., 2019). On peut donc émettre l'hypothèse que, là aussi, H2A.Z pourrait être en partie responsable de la dynamique de CDX2, peut-être en coopérant avec d'autres marques chromatiniques. Pour étudier tout cela, il serait intéressant d'analyser finement la dynamique de H2A.Z (et ses isoformes) au cours du développement, ainsi que d'induire le KO de chacune des isoformes de H2A.Z à différents temps au cours du développement. L'étude de l'expression, de l'incorporation ou encore des modifications post-traductionnelles de H2A.Z dans les souris KO pour *Sox2* serait également très intéressante pour analyser en détail les mécanismes de régulation entre SOX2 et CDX2 dans la régionalisation et le choix de l'identité cellulaire le long du tube digestif.

V- H2A.Z et pathologies intestinales

1) H2A.Z et cancers

Le rôle anti-différenciation et pro-prolifération, notamment sur les cellules de cancer colorectal Caco-2/15, du variant d'histone H2A.Z laisse penser qu'il pourrait être impliqué dans la tumorigénèse intestinale. De plus, il a été montré dans plusieurs organes que H2A.Z et ses isoformes favorisent la croissance tumorale, et plus particulièrement la transition épithélio-mésenchymateuse et l'apparition de métastases dans le cancer du foie (Vardabasso et al., 2015; Yang et al., 2016). Notre équipe a également démontré le rôle pro-oncogénique de p400 dans la progression tumorale colorectale, via la régulation de l'expression des cibles de la voie Wnt (Chevallard-Briet et al., 2014). Le rôle de H2A.Z dans ces mécanismes reste tout de même à démontrer. Nous avons également montré que H2A.Z contrôle l'identité des cellules intestinales en inhibant l'action du facteur de transcription CDX2 (Rispalet et al., 2019). Or ce facteur de transcription est connu pour être un suppresseur de tumeur dans les cancers colorectaux (Bonhomme et al., 2003), ce qui renforce encore l'hypothèse d'un rôle oncogénique de H2A.Z dans les cancers gastro-intestinaux. Enfin, il a été montré que H2A.Z est surexprimé dans les cellules (LS174T, SW48, HCT116) issues de cancers colorectaux sporadiques (Dunican et al., 2002). Le variant d'histone H2A.Z est également fortement exprimé dans les tissus de patients atteints de cancers colorectaux (Human protein Atlas, référence supplémentaire C). Il semble donc très intéressant d'analyser l'effet du KO de H2A.Z sur la progression tumorale dans un modèle murin (*Apc^{min/+}* par exemple), ce qui permettrait de savoir si H2A.Z est également un effecteur de la voie Wnt dans la tumorigénèse.

Le rôle de H2A.Z dans la tumorigénèse peut également être dû à une mutation de sa séquence. Ainsi, il existe des mutations, chez certains patients atteints de cancers, qui affectent des résidus de H2A.Z modifiables post-traductionnellement ou des résidus qui ne sont présents que dans la séquence de l'une des isoformes (COSMIC, référence supplémentaire D). Etant donné les possibles effets différentiels de H2A.Z1 et H2A.Z2 sur l'action de CDX2 et la différenciation entérocytaire, mais aussi les possibles effets des modifications post-traductionnelles sur le rôle de H2A.Z dans l'homéostasie intestinale, ces mutations pourraient être impliquées dans la progression tumorale. Si cela est démontré, le ciblage pharmacologique des incorporeurs de ce variant pourraient être utilisé comme stratégie thérapeutique. H2A.Z pourrait ainsi être impliqué dans la dédifférenciation en cellules de type souche (CSC, Cancer Stem Cells) et son ciblage pourrait éviter la reprise de la croissance

tumorale due à la dédifférenciation au sein de la tumeur (de Sousa e Melo et al., 2017). L'analyse des rôles exacts de chaque incorporateur dans la dynamique de H2A.Z1 et de H2A.Z2 est donc essentielle à l'élaboration d'une stratégie thérapeutique efficace.

2) H2A.Z et maladies inflammatoires de l'intestin

Les maladies inflammatoires de l'intestin sont des pathologies où la forte inflammation de la muqueuse cause la destruction de la structure et de la fonction de l'organe. Il a été montré que la dysfonction de certaines cellules de l'épithélium intestinal joue un rôle prépondérant dans l'apparition de ces pathologies (revue Okamoto and Watanabe, 2016). La perte du rôle de barrière de l'épithélium intestinal, par exemple via la perte de fonctionnalité des jonctions serrées et adhérentes entre les cellules épithéliales, est associée à ces pathologies (Laukoetter et al., 2007). Les cellules à mucus jouent également un rôle puisque ces cellules sont perdues dans ce type de maladie et que le KO de *Muc2* chez la souris entraîne l'apparition de colites chroniques (Van der Sluis et al., 2006). Le facteur de transcription CDX2, de par son action sur l'identité des cellules épithéliales intestinales mais aussi de par sa régulation spécifique de certains gènes de susceptibilité aux maladies inflammatoires, est lui aussi impliqué dans la protection contre l'apparition de ces maladies. D'ailleurs, son expression est souvent diminuée dans ce type de pathologie (Coskun, 2014; Coskun et al., 2012). Tous ces résultats laissent penser que l'altération de l'expression ou de la dynamique de H2A.Z pourrait être un facteur prédisposant à l'apparition de maladies inflammatoires de l'intestin.

Les maladies inflammatoires de l'intestin engendrent souvent l'apparition d'ulcères et il est donc essentiel, pour l'intégrité de l'organe, que le tissu « cicatrise ». D'ailleurs, la stratégie thérapeutique qui consiste à favoriser cette « cicatrisation » permet une meilleure rémission des patients atteints par ce type de maladie. Il a été notamment montré que cette « cicatrisation » nécessite une phase de prolifération intense qui implique les voies de signalisation qui contrôlent la prolifération dans l'épithélium sain (Okamoto and Watanabe, 2016). On peut donc également émettre l'hypothèse que H2A.Z, via son rôle sur la prolifération, pourrait être important pour cette « cicatrisation ». L'analyse de l'expression et de la dynamique de H2A.Z dans des tissus issus de patients atteints de maladies inflammatoires, ainsi que l'étude du rôle de H2A.Z dans l'apparition de la maladie et la cicatrisation dans un organisme modèle, paraissent très intéressantes pour valider ou non cette hypothèse.

VI- H2A.Z dans la réponse à l'environnement extérieur

En plus des voies de signalisation, d'autres facteurs environnementaux sont susceptibles de réguler la fonction des cellules de l'épithélium intestinal, comme par exemple l'alimentation. En effet, il a été montré, par de nombreuses études, qu'un régime riche en sucrose entraîne l'augmentation de l'activité enzymatique de la sucrase, et que ceci est dû à une augmentation de la production de cette protéine (Cézard et al., 1983). Cette augmentation est retrouvée physiologiquement lors du sevrage chez les rongeurs, qui marque le passage de l'alimentation riche en lactose à une alimentation plus riche en sucrose (Alpers, 2003). Au contraire, le jeûne entraîne une diminution de cette activité, mais il a été montré qu'un jeûne prolongé permet la réexpression à un niveau élevé du gène sucrase-isomaltase. Cette augmentation est une réponse de l'organisme à la carence en apport nutritionnel, dû au jeûne, pour probablement favoriser la digestion du moindre apport de nutriment. Ceci est médié, au moins en partie, lors du jeûne par la production, et donc par son augmentation dans la circulation sanguine, de l'inhibiteur endogène des HDAC : le β HB (Wang et al., 2017). On peut donc imaginer que l'alimentation régule de façon générale la fonction des cellules de l'épithélium intestinal, et notamment l'expression des enzymes digestives, via des modifications de la chromatine. Il serait donc intéressant d'analyser la dynamique et le rôle de marques chromatinienne, comme H2A.Z, au sein de l'épithélium intestinal lors de jeûne ou de régimes riches en différents nutriments.

Le microbiote intestinal régule également l'identité cellulaire de l'épithélium intestinal. Une étude a montré que l'accessibilité de la chromatine est très similaire entre épithélia en contact ou non avec le microbiote commensal. Les auteurs ont donc conclu que la chromatine de l'épithélium intestinal est permissive à l'action du microbiote sur le transcriptome épithélial (Camp et al., 2014). Cependant, une étude très récente a montré que le microbiote régule l'expression de certains gènes impliqués dans l'absorption des nutriments de manière dépendante du rythme circadien, via le contrôle de la dynamique de l'acétylation des histones grâce aux HDAC (Kuang et al., 2019). Il semble donc intéressant d'analyser la dynamique d'autres marques chromatinienne connues pour leur rôle sur le contrôle de l'identité intestinale (comme H2A.Z) dans la réponse à la colonisation bactérienne. L'analyse de la dynamique de ces marques, en réponse à la colonisation par des bactéries pathogènes, pourrait notamment expliquer, au moins en partie, la réponse du tissu à l'infection.

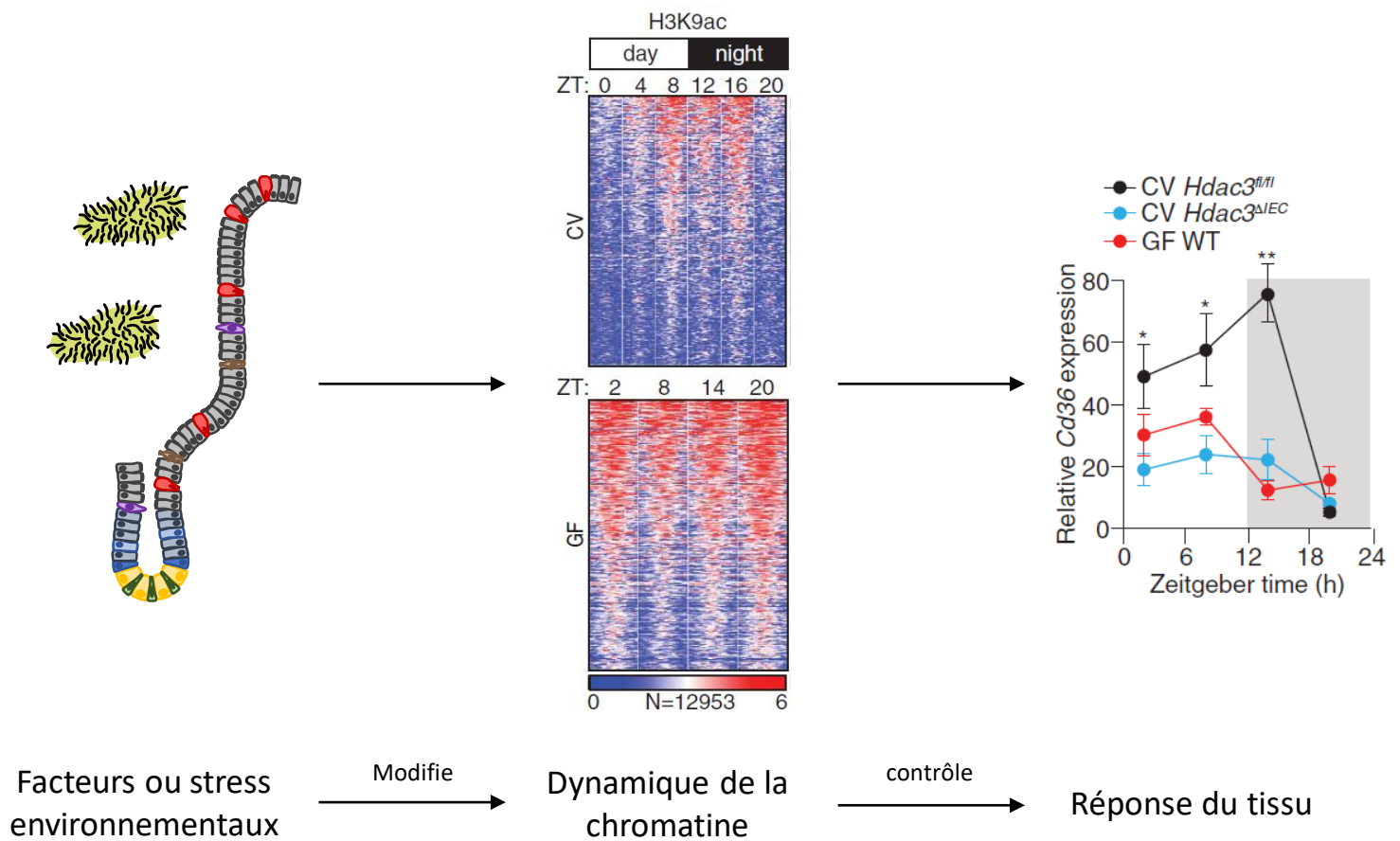


Figure 60 : Hypothèse du rôle de la chromatine dans la réponse à l'environnement

La dynamique chromatinienne pourrait être un effecteur essentiel et général de la réponse du tissu aux facteurs ou stress environnementaux. Comme par exemple ici la dynamique de l'acétylation des histones qui permet au microbiote intestinal de contrôler la physiologie des cellules de l'épithélium intestinal. D'après Kuang et al., 2019.

Enfin, au vu de l'impact de ces facteurs environnementaux (alimentation, microbiote) sur l'épithélium via la modification de la chromatine, mais aussi de l'impact de la chromatine sur la réponse de l'épithélium à différents stress (dédifférenciation après perte des ISC, cicatrisation après inflammation ?), on peut imaginer que la dynamique chromatinienne pourrait avoir un rôle général majeur dans la réponse adaptative de l'épithélium intestinal aux facteurs et aux stress environnementaux, en plus de son rôle dans l'homéostasie normale (Figure 60).

ANNEXE

Méthodes supplémentaires

Mise en culture des organoïdes et expérimentation :

Après dissection des souris, des pièces de 2 mm d'intestin sont incubées dans 5mM d'EDTA/PBS pour dissocier les cryptes des villosités. Les cryptes sont ensuite mises en culture dans un dôme de matrice Matrigel (Corning, 50% Matrigel + 50% milieu). Les dômes sont ensuite recouverts de milieu Intesticult (Stemcell Technologies) qui contient tous les facteurs indispensables à la croissance des organoïdes. Le milieu est changé 2 fois par semaine, et les organoïdes sont passés toutes les semaines.

Les organoïdes sont traités ou non à la Tat-CRE 3 jours après le passage pour induire la recombinaison. Six jours après ce traitement les organoïdes sont récupérés pour les analyser par RT-qPCR ou IF.

Immunoprécipitation :

Les cellules Caco-2/15, possédant les isoformes taggées de H2A.Z, sont lysées (tampon Triton 1% ; SDS 2%). Ces extraits sont « pré-clearés » pour enlever les protéines se liant aux billes A/G de manière non spécifique, puis les échantillons sont incubés avec les anticorps anti-Flag (M2, Sigma Aldrich, F1804) et anti-p400 (Abcam, ab5201-100) pendant 4 heures à 4°C. Ensuite, ces extraits sont incubés avec les billes A/G pour récupérer l'immunoprécipitation des anticorps avec les protéines. Ces billes sont alors lavées plusieurs fois avant d'être utilisées en Western-Blot.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam, M., Robert, F., Laroche, M., and Gaudreau, L. (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6270–6279.
- Alpers, D.H. (2003). CARBOHYDRATES | Digestion, Absorption, and Metabolism. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, B. Caballero, ed. (Oxford: Academic Press), pp. 881–887.
- Altaf, M., Auger, A., Monnet-Saksouk, J., Brodeur, J., Piquet, S., Cramet, M., Bouchard, N., Lacoste, N., Utley, R.T., Gaudreau, L., et al. (2010). NuA4-dependent acetylation of nucleosomal histones H4 and H2A directly stimulates incorporation of H2A.Z by the SWR1 complex. *J. Biol. Chem.* 285, 15966–15977.
- Aoki, R., Shoshkes-Carmel, M., Gao, N., Shin, S., May, C.L., Golson, M.L., Zahm, A.M., Ray, M., Wiser, C.L., Wright, C.V.E., et al. (2016). Foxl1-expressing mesenchymal cells constitute the intestinal stem cell niche. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2, 175–188.
- Aronson, B.E., Rabello Aronson, S., Berkhout, R.P., Chavoushi, S.F., He, A., Pu, W.T., Verzi, M.P., and Krasinski, S.D. (2014). GATA4 represses an ileal program of gene expression in the proximal small intestine by inhibiting the acetylation of histone H3, lysine 27. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 1273–1282.
- Auclair, B.A., Benoit, Y.D., Rivard, N., Mishina, Y., and Perreault, N. (2007). Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage. *Gastroenterology* 133, 887–896.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003–1007.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823–837.
- Bastide, P., Darido, C., Pannequin, J., Kist, R., Robine, S., Marty-Double, C., Bibeau, F., Scherer, G., Joubert, D., Hollande, F., et al. (2007). Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* 178, 635–648.
- Beaulieu, J.F. (1999). Integrins and human intestinal cell functions. *Front. Biosci.* 4, D310–321.
- Beck, F., Erler, T., Russell, A., and James, R. (1995). Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev. Dyn.* 204, 219–227.
- Benoit, Y.D., Paré, F., Francoeur, C., Jean, D., Tremblay, E., Boudreau, F., Escaffit, F., and Beaulieu, J.-F. (2010). Cooperation between HNF-1 α , Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G504–517.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Benoit, Y.D., Lepage, M.B., Khalfaoui, T., Tremblay, E., Basora, N., Carrier, J.C., Gudas, L.J., and Beaulieu, J.-F. (2012). Polycomb repressive complex 2 impedes intestinal cell terminal differentiation. *J. Cell. Sci.* **125**, 3454–3463.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315–326.
- Bjerknes, M., and Cheng, H. (1999). Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* **116**, 7–14.
- Blache, P., van de Wetering, M., Duluc, I., Domon, C., Berta, P., Freund, J.-N., Clevers, H., and Jay, P. (2004). SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J. Cell Biol.* **166**, 37–47.
- Bonhomme, C., Duluc, I., Martin, E., Chawengsaksophak, K., Chenard, M.-P., Kedinger, M., Beck, F., Freund, J.-N., and Domon-Dell, C. (2003). The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* **52**, 1465–1471.
- Bönisch, C., Schneider, K., Pünzeler, S., Wiedemann, S.M., Bielmeier, C., Bocola, M., Eberl, H.C., Kuegel, W., Neumann, J., Kremmer, E., et al. (2012). H2A.Z.2.2 is an alternatively spliced histone H2A.Z variant that causes severe nucleosome destabilization. *Nucleic Acids Res.* **40**, 5951–5964.
- Boudreau, F., Rings, E.H.H.M., van Wering, H.M., Kim, R.K., Swain, G.P., Krasinski, S.D., Moffett, J., Grand, R.J., Suh, E.R., and Traber, P.G. (2002). Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *J. Biol. Chem.* **277**, 31909–31917.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* **122**, 947–956.
- Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., et al. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **441**, 349–353.
- Buczacki, S.J.A., Zecchini, H.I., Nicholson, A.M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R., and Winton, D.J. (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature* **495**, 65–69.
- Camp, J.G., Frank, C.L., Lickwar, C.R., Guturu, H., Rube, T., Wenger, A.M., Chen, J., Bejerano, G., Crawford, G.E., and Rawls, J.F. (2014). Microbiota modulate transcription in the intestinal epithelium without remodeling the accessible chromatin landscape. *Genome Res.* **24**, 1504–1516.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cézard, J.P., Broyart, J.P., Cuisinier-Gleizes, P., and Mathieu, H. (1983). Sucrase-isomaltase regulation by dietary sucrose in the rat. *Gastroenterology* 84, 18–25.
- Chen, K.-Y., Srinivasan, T., Tung, K.-L., Belmonte, J.M., Wang, L., Murthy, P.K.L., Choi, J., Rakhilin, N., King, S., Varanko, A.K., et al. (2017). A Notch positive feedback in the intestinal stem cell niche is essential for stem cell self-renewal. *Mol. Syst. Biol.* 13, 927.
- Chen, L., Toke, N.H., Luo, S., Vasoya, R.P., Fullem, R.L., Parthasarathy, A., Perekatt, A.O., and Verzi, M.P. (2019). A reinforcing HNF4-SMAD4 feed-forward module stabilizes enterocyte identity. *Nat. Genet.* 51, 777–785.
- Cheng, H., and Leblond, C.P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am. J. Anat.* 141, 537–561.
- Chevillard-Briet, M., Quaranta, M., Grézy, A., Mattera, L., Courilleau, C., Philippe, M., Mercier, P., Corpet, D., Lough, J., Ueda, T., et al. (2014). Interplay between chromatin-modifying enzymes controls colon cancer progression through Wnt signaling. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2120–2131.
- Chiacchiera, F., Rossi, A., Jammula, S., Zanotti, M., and Pasini, D. (2016). PRC2 preserves intestinal progenitors and restricts secretory lineage commitment. *EMBO J.* 35, 2301–2314.
- Chin, A.M., Hill, D.R., Aurora, M., and Spence, J.R. (2017). Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 66, 81–93.
- Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. *Annual Review of Biochemistry* 78, 273–304.
- Corujo, D., and Buschbeck, M. (2018). Post-Translational Modifications of H2A Histone Variants and Their Role in Cancer. *Cancers (Basel)* 10.
- Coskun, M. (2014). The role of CDX2 in inflammatory bowel disease. *Dan Med J* 61, B4820.
- Coskun, M., Olsen, A.K., Holm, T.L., Kvist, P.H., Nielsen, O.H., Riis, L.B., Olsen, J., and Troelsen, J.T. (2012). TNF- α -induced down-regulation of CDX2 suppresses MEP1A expression in colitis. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 843–851.
- Creyghton, M.P., Markoulaki, S., Levine, S.S., Hanna, J., Lodato, M.A., Sha, K., Young, R.A., Jaenisch, R., and Boyer, L.A. (2008). H2AZ is enriched at polycomb complex target genes in ES cells and is necessary for lineage commitment. *Cell* 135, 649–661.
- van Daal, A., and Elgin, S.C. (1992). A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell* 3, 593–602.
- Dalvai, M., Fleury, L., Bellucci, L., Kocanova, S., and Bystricky, K. (2013). TIP48/Reptin and H2A.Z requirement for initiating chromatin remodeling in estrogen-activated transcription. *PLoS Genet.* 9, e1003387.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Draker, R., Sarcinella, E., and Cheung, P. (2011). USP10 deubiquitylates the histone variant H2A.Z and both are required for androgen receptor-mediated gene activation. *Nucleic Acids Res.* 39, 3529–3542.
- Draker, R., Ng, M.K., Sarcinella, E., Ignatchenko, V., Kislinger, T., and Cheung, P. (2012). A combination of H2A.Z and H4 acetylation recruits Brd2 to chromatin during transcriptional activation. *PLoS Genet.* 8, e1003047.
- Dryhurst, D., Ishibashi, T., Rose, K.L., Eirín-López, J.M., McDonald, D., Silva-Moreno, B., Veldhoen, N., Helbing, C.C., Hendzel, M.J., Shabanowitz, J., et al. (2009). Characterization of the histone H2A.Z-1 and H2A.Z-2 isoforms in vertebrates. *BMC Biol.* 7, 86.
- Duncan, D.S., McWilliam, P., Tighe, O., Parle-McDermott, A., and Croke, D.T. (2002). Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization. *Oncogene* 21, 3253–3257.
- Dunn, C.J., Sarkar, P., Bailey, E.R., Farris, S., Zhao, M., Ward, J.M., Dudek, S.M., and Saha, R.N. (2017). Histone Hypervariants H2A.Z.1 and H2A.Z.2 Play Independent and Context-Specific Roles in Neuronal Activity-Induced Transcription of Arc/Arg3.1 and Other Immediate Early Genes. *ENeuro* 4.
- Durand, A., Donahue, B., Peignon, G., Letourneur, F., Cagnard, N., Slomianny, C., Perret, C., Shroyer, N.F., and Romagnolo, B. (2012). Functional intestinal stem cells after Paneth cell ablation induced by the loss of transcription factor Math1 (Atoh1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 8965–8970.
- Eirín-López, J.M., González-Romero, R., Dryhurst, D., Ishibashi, T., and Ausió, J. (2009). The evolutionary differentiation of two histone H2A.Z variants in chordates (H2A.Z-1 and H2A.Z-2) is mediated by a stepwise mutation process that affects three amino acid residues. *BMC Evol. Biol.* 9, 31.
- van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., et al. (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435, 959–963.
- van Es, J.H., Haeghebarth, A., Kujala, P., Itzkovitz, S., Koo, B.-K., Boj, S.F., Korving, J., van den Born, M., van Oudenaarden, A., Robine, S., et al. (2012a). A critical role for the Wnt effector Tcf4 in adult intestinal homeostatic self-renewal. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1918–1927.
- van Es, J.H., Sato, T., van de Wetering, M., Lyubimova, A., Yee Nee, A.N., Gregorieff, A., Sasaki, N., Zeinstra, L., van den Born, M., Korving, J., et al. (2012b). Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat. Cell Biol.* 14, 1099–1104.
- Escaffit, F., Boudreau, F., and Beaulieu, J.-F. (2005). Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J. Cell. Physiol.* 203, 15–26.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Escaffit, F., Paré, F., Gauthier, R., Rivard, N., Boudreau, F., and Beaulieu, J.-F. (2006). Cdx2 modulates proliferation in normal human intestinal epithelial crypt cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 66–72.
- Faast, R., Thonglairoam, V., Schulz, T.C., Beall, J., Wells, J.R., Taylor, H., Matthaei, K., Rathjen, P.D., Tremethick, D.J., and Lyons, I. (2001). Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr. Biol.* **11**, 1183–1187.
- Fazio, T.G., Huff, J.T., and Panning, B. (2008). An RNAi screen of chromatin proteins identifies Tip60-p400 as a regulator of embryonic stem cell identity. *Cell* **134**, 162–174.
- Fodde, R., Edelmann, W., Yang, K., van Leeuwen, C., Carlson, C., Renault, B., Breukel, C., Alt, E., Lipkin, M., and Khan, P.M. (1994). A targeted chain-termination mutation in the mouse Apc gene results in multiple intestinal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 8969–8973.
- Forbester, J.L., Lees, E.A., Goulding, D., Forrest, S., Yeung, A., Speak, A., Clare, S., Coomber, E.L., Mukhopadhyay, S., Kraiczy, J., et al. (2018). Interleukin-22 promotes phagolysosomal fusion to induce protection against *Salmonella enterica* Typhimurium in human epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, 10118–10123.
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* **435**, 964–968.
- Fyodorov, D.V., Zhou, B.-R., Skoultchi, A.I., and Bai, Y. (2018). Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 192–206.
- Gao, N., White, P., and Kaestner, K.H. (2009). Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev. Cell* **16**, 588–599.
- Gehart, H., and Clevers, H. (2019). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **16**, 19–34.
- Gerbe, F., van Es, J.H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N.F., Bourgaux, J.-F., Pignodel, C., et al. (2011). Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* **192**, 767–780.
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., et al. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* **529**, 226–230.
- Gévry, N., Chan, H.M., Laflamme, L., Livingston, D.M., and Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev.* **21**, 1869–1881.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Gévry, N., Hardy, S., Jacques, P.-E., Laflamme, L., Svtelis, A., Robert, F., and Gaudreau, L. (2009). Histone H2A.Z is essential for estrogen receptor signaling. *Genes Dev.* 23, 1522–1533.
- Gaiimo, B.D., Ferrante, F., Vallejo, D.M., Hein, K., Gutierrez-Perez, I., Nist, A., Stiewe, T., Mittler, G., Herold, S., Zimmermann, T., et al. (2018). Histone variant H2A.Z deposition and acetylation directs the canonical Notch signaling response. *Nucleic Acids Res.* 46, 8197–8215.
- Gaiimo, B.D., Ferrante, F., Herchenröther, A., Hake, S.B., and Borggreffe, T. (2019). The histone variant H2A.Z in gene regulation. *Epigenetics Chromatin* 12.
- Görisch, S.M., Wachsmuth, M., Tóth, K.F., Lichter, P., and Rippe, K. (2005). Histone acetylation increases chromatin accessibility. *J. Cell. Sci.* 118, 5825–5834.
- Greenberg, R.S., Long, H.K., Swigut, T., and Wysocka, J. (2019). Single Amino Acid Change Underlies Distinct Roles of H2A.Z Subtypes in Human Syndrome. *Cell* 178, 1421-1436.e24.
- Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destrée, O., Kielman, M., and Clevers, H. (2005). Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 129, 626–638.
- Gregorieff, A., Stange, D.E., Kujala, P., Begthel, H., van den Born, M., Korving, J., Peters, P.J., and Clevers, H. (2009). The ets-domain transcription factor Spdef promotes maturation of goblet and paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* 137, 1333-1345.e1-3.
- Guo, R.-J., Funakoshi, S., Lee, H.H., Kong, J., and Lynch, J.P. (2010). The intestine-specific transcription factor Cdx2 inhibits beta-catenin/TCF transcriptional activity by disrupting the beta-catenin-TCF protein complex. *Carcinogenesis* 31, 159–166.
- Haramis, A.-P.G., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G.J.A., and Clevers, H. (2004). De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 303, 1684–1686.
- Hardy, S., Jacques, P.-E., Gévry, N., Forest, A., Fortin, M.-E., Laflamme, L., Gaudreau, L., and Robert, F. (2009). The euchromatic and heterochromatic landscapes are shaped by antagonizing effects of transcription on H2A.Z deposition. *PLoS Genet.* 5, e1000687.
- He, X.C., Zhang, J., Tong, W.-G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D.H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L.M., et al. (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat. Genet.* 36, 1117–1121.
- Hill, D.R., Huang, S., Tsai, Y.-H., Spence, J.R., and Young, V.B. (2017). Real-time Measurement of Epithelial Barrier Permeability in Human Intestinal Organoids. *J Vis Exp*.
- Hiramatsu, Y., Fukuda, A., Ogawa, S., Goto, N., Ikuta, K., Tsuda, M., Matsumoto, Y., Kimura, Y., Yoshioka, T., Takada, Y., et al. (2019). Arid1a is essential for intestinal stem cells through Sox9 regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 1704–1713.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hirokawa, Y., Yip, K.H.Y., Tan, C.W., and Burgess, A.W. (2014). Colonic myofibroblast cell line stimulates colonoid formation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 306, G547–G556.
- Holloway, E.M., Capeling, M.M., and Spence, J.R. (2019). Biologically inspired approaches to enhance human organoid complexity. *Development* 146.
- Horikoshi, N., Sato, K., Shimada, K., Arimura, Y., Osakabe, A., Tachiwana, H., Hayashi-Takanaka, Y., Iwasaki, W., Kagawa, W., Harata, M., et al. (2013). Structural polymorphism in the L1 loop regions of human H2A.Z.1 and H2A.Z.2. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 69, 2431–2439.
- Horikoshi, N., Kujirai, T., Sato, K., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2019). Structure-based design of an H2A.Z.1 mutant stabilizing a nucleosome in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 515, 719–724.
- Hota, S.K., and Bruneau, B.G. (2016). ATP-dependent chromatin remodeling during mammalian development. *Development* 143, 2882–2897.
- Hsu, C.-C., Zhao, D., Shi, J., Peng, D., Guan, H., Li, Y., Huang, Y., Wen, H., Li, W., Li, H., et al. (2018). Gas41 links histone acetylation to H2A.Z deposition and maintenance of embryonic stem cell identity. *Cell Discov* 4, 28.
- Hu, G., Cui, K., Northrup, D., Liu, C., Wang, C., Tang, Q., Ge, K., Levens, D., Crane-Robinson, C., and Zhao, K. (2013). H2A.Z facilitates access of active and repressive complexes to chromatin in embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 12, 180–192.
- Ishibashi, T., Dryhurst, D., Rose, K.L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Ausió, J. (2009). Acetylation of vertebrate H2A.Z and its effect on the structure of the nucleosome. *Biochemistry* 48, 5007–5017.
- Jackson, J.D., and Gorovsky, M.A. (2000). Histone H2A.Z has a conserved function that is distinct from that of the major H2A sequence variants. *Nucleic Acids Res.* 28, 3811–3816.
- Jackson, J.D., Falciano, V.T., and Gorovsky, M.A. (1996). A likely histone H2A.F/Z variant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem. Sci.* 21, 466–467.
- Jadhav, U., Saxena, M., O'Neill, N.K., Saadatpour, A., Yuan, G.-C., Herbert, Z., Murata, K., and Shivdasani, R.A. (2017). Dynamic Reorganization of Chromatin Accessibility Signatures during Dedifferentiation of Secretory Precursors into Lgr5+ Intestinal Stem Cells. *Cell Stem Cell* 21, 65-77.e5.
- Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K., and Felsenfeld, G. (2009). H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark “nucleosome-free regions” of active promoters and other regulatory regions. *Nat. Genet.* 41, 941–945.
- Kaaij, L.T.J., van de Wetering, M., Fang, F., Decato, B., Molaro, A., van de Werken, H.J.G., van Es, J.H., Schuijers, J., de Wit, E., de Laat, W., et al. (2013). DNA methylation dynamics during

intestinal stem cell differentiation reveals enhancers driving gene expression in the villus. *Genome Biol.* **14**, R50.

Kazakevych, J., Sayols, S., Messner, B., Krienke, C., and Soshnikova, N. (2017). Dynamic changes in chromatin states during specification and differentiation of adult intestinal stem cells. *Nucleic Acids Res.* **45**, 5770–5784.

Kim, T.-H., and Shivdasani, R.A. (2011). Genetic evidence that intestinal Notch functions vary regionally and operate through a common mechanism of Math1 repression. *J. Biol. Chem.* **286**, 11427–11433.

Kim, T.-H., Escudero, S., and Shivdasani, R.A. (2012). Intact function of Lgr5 receptor-expressing intestinal stem cells in the absence of Paneth cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 3932–3937.

Kim, T.-H., Li, F., Ferreiro-Neira, I., Ho, L.-L., Luyten, A., Nalapareddy, K., Long, H., Verzi, M., and Shivdasani, R.A. (2014). Broadly permissive intestinal chromatin underlies lateral inhibition and cell plasticity. *Nature* **506**, 511–515.

Kirmizis, A., Santos-Rosa, H., Penkett, C.J., Singer, M.A., Vermeulen, M., Mann, M., Bähler, J., Green, R.D., and Kouzarides, T. (2007). Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature* **449**, 928–932.

Klein, B.J., Ahmad, S., Vann, K.R., Andrews, F.H., Mayo, Z.A., Bourriquen, G., Bridgers, J.B., Zhang, J., Strahl, B.D., Côté, J., et al. (2018). Yaf9 subunit of the NuA4 and SWR1 complexes targets histone H3K27ac through its YEATS domain. *Nucleic Acids Res.* **46**, 421–430.

Koppens, M.A.J., Bounova, G., Gargiulo, G., Tanger, E., Janssen, H., Cornelissen-Steijger, P., Blom, M., Song, J.-Y., Wessels, L.F.A., and van Lohuizen, M. (2016). Deletion of Polycomb Repressive Complex 2 From Mouse Intestine Causes Loss of Stem Cells. *Gastroenterology* **151**, 684–697.e12.

Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J., and Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.* **19**, 379–383.

Kosinski, C., Li, V.S.W., Chan, A.S.Y., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W.Y., Chan, T.L., Mifflin, R.C., Powell, D.W., Yuen, S.T., et al. (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 15418–15423.

Kraushaar, D.C., and Zhao, K. (2013). The epigenomics of embryonic stem cell differentiation. *Int. J. Biol. Sci.* **9**, 1134–1144.

Ku, M., Jaffe, J.D., Koche, R.P., Rheinbay, E., Endoh, M., Koseki, H., Carr, S.A., and Bernstein, B.E. (2012). H2A.Z landscapes and dual modifications in pluripotent and multipotent stem cells underlie complex genome regulatory functions. *Genome Biology* **13**, R85.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kuang, Z., Wang, Y., Li, Y., Ye, C., Ruhn, K.A., Behrendt, C.L., Olson, E.N., and Hooper, L.V. (2019). The intestinal microbiota programs diurnal rhythms in host metabolism through histone deacetylase 3. *Science* 365, 1428–1434.
- Kuhnert, F., Davis, C.R., Wang, H.-T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R., and Kuo, C.J. (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 266–271.
- Kumar, N., Tsai, Y.-H., Chen, L., Zhou, A., Banerjee, K.K., Saxena, M., Huang, S., Toke, N.H., Xing, J., Shivdasani, R.A., et al. (2019). The lineage-specific transcription factor CDX2 navigates dynamic chromatin to control distinct stages of intestine development. *Development* 146.
- Lacoste, N., and Côté, J. (2003). Le code épigénétique des histones. *ms* 19, 955–959.
- Latrick, C.M., Marek, M., Ouararhni, K., Papin, C., Stoll, I., Ignatyeva, M., Obri, A., Ennifar, E., Dimitrov, S., Romier, C., et al. (2016). Molecular basis and specificity of H2A.Z-H2B recognition and deposition by the histone chaperone YL1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 309–316.
- Laukoetter, M.G., Nava, P., Lee, W.Y., Severson, E.A., Capaldo, C.T., Babbitt, B.A., Williams, I.R., Koval, M., Peatman, E., Campbell, J.A., et al. (2007). JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J. Exp. Med.* 204, 3067–3076.
- Lee, J.-S., Smith, E., and Shilatifard, A. (2010). The Language of Histone Crosstalk. *Cell* 142, 682–685.
- Lepage, M., Seltana, A., Thibault, M.-P., Tremblay, É., and Beaulieu, J.-F. (2018). Knockdown of laminin $\alpha 5$ stimulates intestinal cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495, 1510–1515.
- Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007a). The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* 128, 707–719.
- Li, N., Yousefi, M., Nakauka-Ddamba, A., Jain, R., Tobias, J., Epstein, J.A., Jensen, S.T., and Lengner, C.J. (2014). Single-cell analysis of proxy reporter allele-marked epithelial cells establishes intestinal stem cell hierarchy. *Stem Cell Reports* 3, 876–891.
- Li, X., Madison, B.B., Zacharias, W., Kolterud, A., States, D., and Gumucio, D.L. (2007b). Deconvoluting the intestine: molecular evidence for a major role of the mesenchyme in the modulation of signaling cross talk. *Physiol. Genomics* 29, 290–301.
- Li, Z., Gadue, P., Chen, K., Jiao, Y., Tuteja, G., Schug, J., Li, W., and Kaestner, K.H. (2012). Foxa2 and H2A.Z mediate nucleosome depletion during embryonic stem cell differentiation. *Cell* 151, 1608–1616.
- Lo, W.-S., Trievel, R.C., Rojas, J.R., Duggan, L., Hsu, J.-Y., Allis, C.D., Marmorstein, R., and Berger, S.L. (2000). Phosphorylation of Serine 10 in Histone H3 Is Functionally Linked In Vitro and In Vivo to Gcn5-Mediated Acetylation at Lysine 14. *Molecular Cell* 5, 917–926.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- López-Díaz, L., Jain, R.N., Keeley, T.M., VanDussen, K.L., Brunkan, C.S., Gumucio, D.L., and Samuelson, L.C. (2007). Intestinal Neurogenin 3 directs differentiation of a bipotential secretory progenitor to endocrine cell rather than goblet cell fate. *Dev. Biol.* 309, 298–305.
- Lorch, Y., LaPointe, J.W., and Kornberg, R.D. (1987). Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* 49, 203–210.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.
- Luk, E., Vu, N.-D., Patteson, K., Mizuguchi, G., Wu, W.-H., Ranjan, A., Backus, J., Sen, S., Lewis, M., Bai, Y., et al. (2007). Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ. *Mol. Cell* 25, 357–368.
- Luk, E., Ranjan, A., Fitzgerald, P.C., Mizuguchi, G., Huang, Y., Wei, D., and Wu, C. (2010). Stepwise histone replacement by SWR1 requires dual activation with histone H2A.Z and canonical nucleosome. *Cell* 143, 725–736.
- Mitchelmore, C., Troelsen, J.T., Spodsberg, N., Sjöström, H., and Norén, O. (2000). Interaction between the homeodomain proteins Cdx2 and HNF1α mediates expression of the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Biochem. J.* 346 Pt 2, 529–535.
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.-H., Sen, S., and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303, 343–348.
- Montgomery, R.K., Carlone, D.L., Richmond, C.A., Farilla, L., Kranendonk, M.E.G., Henderson, D.E., Baffour-Awuah, N.Y., Ambruzs, D.M., Fogli, L.K., Algra, S., et al. (2011). Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 179–184.
- Muñoz, J., Stange, D.E., Schepers, A.G., van de Wetering, M., Koo, B.-K., Itzkovitz, S., Volckmann, R., Kung, K.S., Koster, J., Radulescu, S., et al. (2012). The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent “+4” cell markers. *EMBO J.* 31, 3079–3091.
- Mutoh, H., Hakamata, Y., Sato, K., Eda, A., Yanaka, I., Honda, S., Osawa, H., Kaneko, Y., and Sugano, K. (2002). Conversion of gastric mucosa to intestinal metaplasia in Cdx2-expressing transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 470–479.
- Mutoh, H., Satoh, K., Kita, H., Sakamoto, H., Hayakawa, H., Yamamoto, H., Isoda, N., Tamada, K., Ido, K., and Sugano, K. (2005). Cdx2 specifies the differentiation of morphological as well as functional absorptive enterocytes of the small intestine. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 867–871.
- Newman, J.C., and Verdin, E. (2014). Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 42–52.
- Nguyen, T.T., Savory, J.G.A., Brooke-Bisschop, T., Ringuette, R., Foley, T., Hess, B.L., Mulatz, K.J., Trinkle-Mulcahy, L., and Lohnes, D. (2017). Cdx2 Regulates Gene Expression through

Recruitment of Brg1-associated Switch-Sucrose Non-fermentable (SWI-SNF) Chromatin Remodeling Activity. *J. Biol. Chem.* 292, 3389–3399.

Noah, T.K., Donahue, B., and Shroyer, N.F. (2011). Intestinal development and differentiation. *Exp. Cell Res.* 317, 2702–2710.

Nozaki, K., Mochizuki, W., Matsumoto, Y., Matsumoto, T., Fukuda, M., Mizutani, T., Watanabe, M., and Nakamura, T. (2016). Co-culture with intestinal epithelial organoids allows efficient expansion and motility analysis of intraepithelial lymphocytes. *J. Gastroenterol.* 51, 206–213.

Obri, A., Ouarrhni, K., Papin, C., Diebold, M.-L., Padmanabhan, K., Marek, M., Stoll, I., Roy, L., Reilly, P.T., Mak, T.W., et al. (2014). ANP32E is a histone chaperone that removes H2A.Z from chromatin. *Nature* 505, 648–653.

Oittinen, M., Popp, A., Kurppa, K., Lindfors, K., Mäki, M., Kaikkonen, M.U., and Viiri, K. (2017). Polycomb Repressive Complex 2 Enacts Wnt Signaling in Intestinal Homeostasis and Contributes to the Instigation of Stemness in Diseases Entailing Epithelial Hyperplasia or Neoplasia. *Stem Cells* 35, 445–457.

Okamoto, R., and Watanabe, M. (2016). Role of epithelial cells in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 51, 11–21.

Papamichos-Chronakis, M., Watanabe, S., Rando, O.J., and Peterson, C.L. (2011). Global regulation of H2A.Z localization by the INO80 chromatin-remodeling enzyme is essential for genome integrity. *Cell* 144, 200–213.

Park, Y.-J., Dyer, P.N., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2004). A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome. *J. Biol. Chem.* 279, 24274–24282.

Potten, C.S., Hume, W.J., Reid, P., and Cairns, J. (1978). The segregation of DNA in epithelial stem cells. *Cell* 15, 899–906.

Potten, C.S., Gandara, R., Mahida, Y.R., Loeffler, M., and Wright, N.A. (2009). The stem cells of small intestinal crypts: where are they? *Cell Proliferation* 42, 731–750.

Powell, A.E., Wang, Y., Li, Y., Poulin, E.J., Means, A.L., Washington, M.K., Higginbotham, J.N., Juchheim, A., Prasad, N., Levy, S.E., et al. (2012). The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell* 149, 146–158.

Pradhan, S.K., Su, T., Yen, L., Jacquet, K., Huang, C., Côté, J., Kurdistani, S.K., and Carey, M.F. (2016). EP400 Deposits H3.3 into Promoters and Enhancers during Gene Activation. *Mol. Cell* 61, 27–38.

Qi, Z., Li, Y., Zhao, B., Xu, C., Liu, Y., Li, H., Zhang, B., Wang, X., Yang, X., Xie, W., et al. (2017). BMP restricts stemness of intestinal Lgr5+ stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nat Commun* 8, 13824.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Raghoebir, L., Bakker, E.R.M., Mills, J.C., Swagemakers, S., Kempen, M.B., Munck, A.B., Driegen, S., Meijer, D., Grosveld, F., Tibboel, D., et al. (2012). SOX2 redirects the developmental fate of the intestinal epithelium toward a premature gastric phenotype. *J Mol Cell Biol* 4, 377–385.
- Riccio, O., van Gijn, M.E., Bezdek, A.C., Pellegrinet, L., van Es, J.H., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L.J., Honjo, T., Clevers, H., and Radtke, F. (2008). Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO Rep.* 9, 377–383.
- Rispa, J., Baron, L., Beaulieu, J.-F., Chevillard-Briet, M., Trouche, D., and Escaffit, F. (2019). The H2A.Z histone variant integrates Wnt signaling in intestinal epithelial homeostasis. *Nat Commun* 10, 1827.
- Roostae, A., Guezguez, A., Beauséjour, M., Simoneau, A., Vachon, P.H., Levy, E., and Beaulieu, J.-F. (2015). Histone deacetylase inhibition impairs normal intestinal cell proliferation and promotes specific gene expression. *J. Cell. Biochem.* 116, 2695–2708.
- Rothenberg, M.E., Nusse, Y., Kalisky, T., Lee, J.J., Dalerba, P., Scheeren, F., Lobo, N., Kulkarni, S., Sim, S., Qian, D., et al. (2012). Identification of a cKit(+) colonic crypt base secretory cell that supports Lgr5(+) stem cells in mice. *Gastroenterology* 142, 1195-1205.e6.
- Ruhl, D.D., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Chrivia, J.C. (2006). Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry* 45, 5671–5677.
- San Roman, A.K., Jayewickreme, C.D., Murtaugh, L.C., and Shivdasani, R.A. (2014). Wnt secretion from epithelial cells and subepithelial myofibroblasts is not required in the mouse intestinal stem cell niche in vivo. *Stem Cell Reports* 2, 127–134.
- San Roman, A.K., Tovaglieri, A., Breault, D.T., and Shivdasani, R.A. (2015a). Distinct Processes and Transcriptional Targets Underlie CDX2 Requirements in Intestinal Stem Cells and Differentiated Villus Cells. *Stem Cell Reports* 5, 673–681.
- San Roman, A.K., Aronson, B.E., Krasinski, S.D., Shivdasani, R.A., and Verzi, M.P. (2015b). Transcription factors GATA4 and HNF4A control distinct aspects of intestinal homeostasis in conjunction with transcription factor CDX2. *J. Biol. Chem.* 290, 1850–1860.
- Sancho, R., Cremona, C.A., and Behrens, A. (2015). Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease. *EMBO Rep.* 16, 571–581.
- Sangiorgi, E., and Capecchi, M.R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat. Genet.* 40, 915–920.
- Sansom, O.J., Reed, K.R., Hayes, A.J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I.P., Batlle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I.S., et al. (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev.* 18, 1385–1390.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265.
- Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–418.
- Schneider, A., Chatterjee, S., Bousiges, O., Selvi, B.R., Swaminathan, A., Cassel, R., Blanc, F., Kundu, T.K., and Boutillier, A.-L. (2013). Acetyltransferases (HATs) as targets for neurological therapeutics. *Neurotherapeutics* 10, 568–588.
- Schwitalla, S., Fingerle, A.A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Göktuna, S.I., Ziegler, P.K., Canli, O., Heijmans, J., Huels, D.J., Moreaux, G., et al. (2013). Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* 152, 25–38.
- Sevilla, A., and Binda, O. (2014). Post-translational modifications of the histone variant H2AZ. *Stem Cell Res* 12, 289–295.
- Sheaffer, K.L., Kim, R., Aoki, R., Elliott, E.N., Schug, J., Burger, L., Schübeler, D., and Kaestner, K.H. (2014). DNA methylation is required for the control of stem cell differentiation in the small intestine. *Genes Dev.* 28, 652–664.
- Shroyer, N.F., Wallis, D., Venken, K.J.T., Bellen, H.J., and Zoghbi, H.Y. (2005). Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev* 19, 2412–2417.
- Shroyer, N.F., Helmrath, M.A., Wang, V.Y.-C., Antalffy, B., Henning, S.J., and Zoghbi, H.Y. (2007). Intestine-specific ablation of mouse atonal homolog 1 (Math1) reveals a role in cellular homeostasis. *Gastroenterology* 132, 2478–2488.
- Sjöblom, M. (2011). Duodenal epithelial sensing of luminal acid: role of carbonic anhydrases. *Acta Physiol (Oxf)* 201, 85–95.
- Slupianek, A., Yerrum, S., Safadi, F.F., and Monroy, M.A. (2010). The chromatin remodeling factor SRCAP modulates expression of prostate specific antigen and cellular proliferation in prostate cancer cells. *J. Cell. Physiol.* 224, 369–375.
- Snippert, H.J., and Clevers, H. (2011). Tracking adult stem cells. *EMBO Rep.* 12, 113–122.
- de Sousa e Melo, F., Kurtova, A.V., Harnoss, J.M., Kljavin, N., Hoeck, J.D., Hung, J., Anderson, J.E., Storm, E.E., Modrusan, Z., Koeppen, H., et al. (2017). A distinct role for Lgr5+ stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature* 543, 676–680.
- Stzepourginski, I., Nigro, G., Jacob, J.-M., Dulauroy, S., Sansonetti, P.J., Eberl, G., and Peduto, L. (2017). CD34+ mesenchymal cells are a major component of the intestinal stem cells niche at homeostasis and after injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E506–E513.
- Subramanian, V., Mazumder, A., Surface, L.E., Butty, V.L., Fields, P.A., Alwan, A., Torrey, L., Thai, K.K., Levine, S.S., Bathe, M., et al. (2013). H2A.Z acidic patch couples chromatin

dynamics to regulation of gene expression programs during ESC differentiation. *PLoS Genet.* 9, e1003725.

Subramanian, V., Fields, P.A., and Boyer, L.A. (2015). H2A.Z: a molecular rheostat for transcriptional control. *F1000Prime Rep* 7, 01.

Sumigray, K.D., Terwilliger, M., and Lechler, T. (2018). Morphogenesis and Compartmentalization of the Intestinal Crypt. *Developmental Cell* 45, 183-197.e5.

Surface, L.E., Fields, P.A., Subramanian, V., Behmer, R., Udeshi, N., Peach, S.E., Carr, S.A., Jaffe, J.D., and Boyer, L.A. (2016). H2A.Z.1 Monoubiquitylation Antagonizes BRD2 to Maintain Poised Chromatin in ESCs. *Cell Rep* 14, 1142–1155.

Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1121–1124.

Takada, Y., Fukuda, A., Chiba, T., and Seno, H. (2016). Brg1 plays an essential role in development and homeostasis of the duodenum through regulation of Notch signaling. *Development* 143, 3532–3539.

Takeda, N., Jain, R., LeBoeuf, M.R., Wang, Q., Lu, M.M., and Epstein, J.A. (2011). Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science* 334, 1420–1424.

Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., et al. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146, 1016–1028.

Tetteh, P.W., Basak, O., Farin, H.F., Wiebrands, K., Kretschmar, K., Begthel, H., van den Born, M., Korving, J., de Sauvage, F., van Es, J.H., et al. (2016). Replacement of Lost Lgr5-Positive Stem Cells through Plasticity of Their Enterocyte-Lineage Daughters. *Cell Stem Cell* 18, 203–213.

Tou, L., Liu, Q., and Shivdasani, R.A. (2004). Regulation of mammalian epithelial differentiation and intestine development by class I histone deacetylases. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3132–3139.

Ueo, T., Imayoshi, I., Kobayashi, T., Ohtsuka, T., Seno, H., Nakase, H., Chiba, T., and Kageyama, R. (2012). The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation. *Development* 139, 1071–1082.

Valdés-Mora, F., Song, J.Z., Statham, A.L., Strbenac, D., Robinson, M.D., Nair, S.S., Patterson, K.I., Tremethick, D.J., Stirzaker, C., and Clark, S.J. (2012). Acetylation of H2A.Z is a key epigenetic modification associated with gene deregulation and epigenetic remodeling in cancer. *Genome Res.* 22, 307–321.

Van der Sluis, M., De Koning, B.A.E., De Bruijn, A.C.J.M., Velcich, A., Meijerink, J.P.P., Van Goudoever, J.B., Büller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B., et al. (2006). Muc2-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* **131**, 117–129.

Vardabasso, C., Gaspar-Maia, A., Hasson, D., Pünzeler, S., Valle-Garcia, D., Straub, T., Keilhauer, E.C., Strub, T., Dong, J., Panda, T., et al. (2015). Histone Variant H2A.Z.2 Mediates Proliferation and Drug Sensitivity of Malignant Melanoma. *Mol. Cell* **59**, 75–88.

Verzi, M.P., Shin, H., He, H.H., Sulahian, R., Meyer, C.A., Montgomery, R.K., Fleet, J.C., Brown, M., Liu, X.S., and Shivdasani, R.A. (2010a). Differentiation-specific histone modifications reveal dynamic chromatin interactions and partners for the intestinal transcription factor CDX2. *Dev. Cell* **19**, 713–726.

Verzi, M.P., Hatzis, P., Sulahian, R., Philips, J., Schuijers, J., Shin, H., Freed, E., Lynch, J.P., Dang, D.T., Brown, M., et al. (2010b). TCF4 and CDX2, major transcription factors for intestinal function, converge on the same cis-regulatory regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 15157–15162.

Verzi, M.P., Shin, H., Ho, L.-L., Liu, X.S., and Shivdasani, R.A. (2011). Essential and redundant functions of caudal family proteins in activating adult intestinal genes. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2026–2039.

Verzi, M.P., Shin, H., San Roman, A.K., Liu, X.S., and Shivdasani, R.A. (2013). Intestinal master transcription factor CDX2 controls chromatin access for partner transcription factor binding. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 281–292.

Walton, K.D., Whidden, M., Kolterud, Å., Shoffner, S.K., Czerwinski, M.J., Kushwaha, J., Parmar, N., Chandrasekhar, D., Fredo, A.M., Schnell, S., et al. (2016). Villification in the mouse: Bmp signals control intestinal villus patterning. *Development* **143**, 427–436.

Wang, L., Du, Y., Ward, J.M., Shimbo, T., Lackford, B., Zheng, X., Miao, Y., Zhou, B., Han, L., Fargo, D.C., et al. (2014). INO80 facilitates pluripotency gene activation in embryonic stem cell self-renewal, reprogramming, and blastocyst development. *Cell Stem Cell* **14**, 575–591.

Wang, Q., Zhou, Y., Rychahou, P., Fan, T.W.-M., Lane, A.N., Weiss, H.L., and Evers, B.M. (2017). Ketogenesis contributes to intestinal cell differentiation. *Cell Death Differ.* **24**, 458–468.

Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D.E., Barski, A., Peng, W., and Zhao, K. (2009). Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* **138**, 1019–1031.

West, M.H., and Bonner, W.M. (1980). Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry* **19**, 3238–3245.

Wong, M.M., Cox, L.K., and Chrivia, J.C. (2007). The chromatin remodeling protein, SRCAP, is critical for deposition of the histone variant H2A.Z at promoters. *J. Biol. Chem.* **282**, 26132–26139.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wratting, D., Thistlethwaite, A., Harris, M., Zeef, L.A.H., and Millar, C.B. (2012). A conserved function for the H2A.Z C terminus. *J. Biol. Chem.* **287**, 19148–19157.
- Wu, X., and Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 517–534.
- Yamamoto, H., Bai, Y.Q., and Yuasa, Y. (2003). Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 813–818.
- Yan, K.S., Gevaert, O., Zheng, G.X.Y., Anchang, B., Probert, C.S., Larkin, K.A., Davies, P.S., Cheng, Z.-F., Kaddis, J.S., Han, A., et al. (2017). Intestinal Enteroendocrine Lineage Cells Possess Homeostatic and Injury-Inducible Stem Cell Activity. *Cell Stem Cell* **21**, 78-90.e6.
- Yang, H.D., Kim, P.-J., Eun, J.W., Shen, Q., Kim, H.S., Shin, W.C., Ahn, Y.M., Park, W.S., Lee, J.Y., and Nam, S.W. (2016). Oncogenic potential of histone-variant H2A.Z.1 and its regulatory role in cell cycle and epithelial-mesenchymal transition in liver cancer. *Oncotarget* **7**, 11412–11423.
- Yang, Q., Bermingham, N.A., Finegold, M.J., and Zoghbi, H.Y. (2001). Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* **294**, 2155–2158.
- Yui, S., Nakamura, T., Sato, T., Nemoto, Y., Mizutani, T., Zheng, X., Ichinose, S., Nagaishi, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., et al. (2012). Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5⁺ stem cell. *Nat. Med.* **18**, 618–623.
- Zanton, S.J., and Pugh, B.F. (2006). Full and partial genome-wide assembly and disassembly of the yeast transcription machinery in response to heat shock. *Genes Dev.* **20**, 2250–2265.
- Zhang, H., Roberts, D.N., and Cairns, B.R. (2005). Genome-Wide Dynamics of Htz1, a Histone H2A Variant that Poises Repressed/Basal Promoters for Activation through Histone Loss. *Cell* **123**, 219–231.
- Zhang, T., Cooper, S., and Brockdorff, N. (2015). The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO Rep.* **16**, 1467–1481.
- Zhao, B., Chen, Y., Jiang, N., Yang, L., Sun, S., Zhang, Y., Wen, Z., Ray, L., Liu, H., Hou, G., et al. (2019). Znhit1 controls intestinal stem cell maintenance by regulating H2A.Z incorporation. *Nat Commun* **10**, 1–12.
- Zimberlin, C.D., Lancini, C., Sno, R., Rosekrans, S.L., McLean, C.M., Vlaming, H., van den Brink, G.R., Bots, M., Medema, J.P., and Dannenberg, J.-H. (2015). HDAC1 and HDAC2 collectively regulate intestinal stem cell homeostasis. *FASEB J.* **29**, 2070–2080.
- Zorn, A.M., and Wells, J.M. (2009). Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 221–251.

Références supplémentaires :

- A** L'intestin grêle. <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/small-intestine/small-intestine-cancer/the-small-intestine/?region=qc>.
- B** Le système digestif | Nicolas BRULPORT. <https://le-ghost-de-nicolas.fr/le-systeme-digestif/>.
- C** Expression of H2AFZ in colorectal cancer - The Human Protein Atlas. https://www.proteinatlas.org/ENSG00000164032-H2AFZ/pathology/colorectal+cancer#imid_6040427.
- D** Cosmic. H2AFZ Gene - COSMIC. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=H2AFZ>.

