

Cih.0.5 370  
Université de Sherbrooke

# Détermination des fonctions de HNF4 $\alpha$ dans les cellules épithéliales intestinales

par

Jean-François Delabre

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire  
Faculté de médecine et des sciences de la santé  
Université de Sherbrooke

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae doctor*  
(Ph.D) en Biologie cellulaire

2007

Évaluateurs de la thèse :

Dr Claude Asselin, département d'Anatomie et Biologie Cellulaire, Université de Sherbrooke

Dr Jacques Bérard, département d'Anatomie et Biologie Cellulaire, Université de Sherbrooke

Dre Claire Dubois, département de Pédiatrie, Université de Sherbrooke

Dre Nathalie Rivard, département d'Anatomie et Biologie Cellulaire, Université de Sherbrooke

Dr René Saint-Arnaud, département de Génétique, Université McGill

# Table des matières

<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>IX</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1. LE SYSTÈME INTESTINAL</b> .....	<b>1</b>
1.1. ANATOMIE ET FONCTIONS DU SYSTÈME INTESTINAL .....	1
1.2. STRUCTURE ET ULTRASTRUCTURE DE L'INTESTIN GRÊLE .....	3
1.3. RENOUELEMENT ET DIFFÉRENCIATION DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL .....	5
1.4. VOIES IMPLIQUÉES DANS LE DÉVELOPPEMENT OU LE MAINTIEN INTESTINAL .....	7
1.4.1. RÔLE DES PROTÉINES WNT DANS LE DÉVELOPPEMENT OU LE MAINTIEN INTESTINAL .....	7
1.4.2. RÔLE DES PROTÉINES CDX DANS LE DÉVELOPPEMENT OU LE MAINTIEN INTESTINAL .....	9
1.4.3. RÔLES DES PROTÉINES LKB1 ET AMPK .....	11
1.4.4. RÔLE DES PROTÉINES NOTCH DANS LE DÉVELOPPEMENT OU LE MAINTIEN INTESTINAL .....	13
1.4.5. VOIE IMPLIQUANT LES PROTÉINES SMAD ET BMP .....	15
<b>2. "HEPATOCYTE NUCLEAR FACTOR 4<math>\alpha</math>" (HNF4<math>\alpha</math>)</b> .....	<b>18</b>
2.1. GÉNÉRALITÉS .....	18
2.2. STRUCTURES DE HNF4 $\alpha$ .....	18
2.2.1. STRUCTURE DU GÈNE HNF4 $\alpha$ .....	18
2.2.2. STRUCTURE PROTÉIQUE DE HNF4 $\alpha$ .....	20
2.2.2.1. DOMAINE MODULATEUR (A/B) .....	20
2.2.2.2. DOMAINE DE LIAISON À L'ADN (C) .....	22

2.2.2.3.	DOMAINE CHARNIÈRE (D).....	23
2.2.2.4.	DOMAINE DE LIAISON DU LIGAND (E) .....	24
2.2.2.5.	DOMAINE C-TERMINAL (F) .....	24
2.3.	EXPRESSION ET LOCALISATION DE HNF4 $\alpha$ .....	25
2.4.	RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE HNF4 $\alpha$ .....	25
2.4.1.	INDUCTION DE L'EXPRESSION DU GÈNE HNF4 $\alpha$ PAR LES FACTEURS HNF .....	28
2.4.2.	AUTORÉGULATION PAR HNF4 $\alpha$ 1 .....	29
2.4.3.	INHIBITION DE L'EXPRESSION DE HNF4 $\alpha$ PAR LES RÉCEPTEURS RXR, GR ET COUP-TFII 29	
2.4.4.	RÉGULATION PAR LES FACTEURS GATA6, PDX1, CDX2, C/EBP $\alpha$ ET LES MAPKINASES	30
2.5.	HNF4 $\alpha$ ET SES LIGANDS .....	31
2.6.	RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DE HNF4 $\alpha$ .....	32
2.6.1.	RÉGULATION PAR DIMÉRISATION.....	32
2.6.2.	RÉGULATION PAR ACÉTYLATION .....	32
2.6.3.	RÉGULATION PAR PHOSPHORYLATION .....	34
2.6.4.	RÉGULATION PAR NITROSYLATION .....	35
2.6.5.	RÉGULATION PAR LIAISON DE COFACTEURS .....	36
2.7.	RÔLES ET FONCTIONS DE HNF4 $\alpha$ .....	37
2.7.1.	HNF4 $\alpha$ ET LE MÉTABOLISME LIPIDIQUE .....	37
2.7.2.	HNF4 $\alpha$ ET LE MÉTABOLISME DU GLUCOSE .....	38
2.7.3.	HNF4 $\alpha$ ET LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE.....	39
2.7.4.	AUTRES FONCTIONS DE LA PROTÉINE HNF4 $\alpha$ .....	39
2.7.5.	FONCTIONS DE HNF4 $\alpha$ DANS L'INTESTIN .....	40
2.8.	PATHOLOGIES IMPLIQUANT HNF4 $\alpha$ .....	42
	<b>HYPOTHÈSE DE TRAVAIL.....</b>	<b>44</b>
	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>46</b>
1.	<b>CULTURE CELLULAIRE .....</b>	<b>46</b>

<b>2.</b>	<b>GÉNÉRATION DE LA LIGNÉE CELLULAIRE IEC-6 HNF4<math>\alpha</math>1 .....</b>	<b>47</b>
2.1.	CLONAGE DE HNF4 $\alpha$ 1 .....	47
2.2.	PRÉPARATION DES RÉTROVIRUS.....	47
2.3.	INFECTION DES CELLULES IEC-6 .....	48
<b>3.</b>	<b>EXTRACTION DES PROTÉINES ET DOSAGE .....</b>	<b>49</b>
3.1.	EXTRACTION DES PROTÉINES NUCLÉAIRES .....	49
3.2.	EXTRACTION DE PROTÉINES TOTALES.....	50
3.3.	DOSAGE DES PROTÉINES .....	50
<b>4.</b>	<b>IMMUNOBUVARDAGE .....</b>	<b>50</b>
4.1.	MIGRATION ET TRANSFERT DES PROTÉINES .....	51
4.2.	MARQUAGE ET RÉVÉLATION DES IMMUNOBUVARDAGES.....	51
<b>5.</b>	<b>GELS DE RÉTENTION .....</b>	<b>52</b>
5.1.	PRÉPARATION DES SONDAS RADIOMARQUÉES.....	52
5.2.	PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET MIGRATION.....	55
<b>6.</b>	<b>IMMUNOFLUORESCENCE .....</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE.....</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>PRÉPARATION DES ARNS ET ANALYSES PAR RT-PCR.....</b>	<b>58</b>
8.1.	PRÉPARATION DES ARNS .....	58
8.2.	SYNTHÈSE DES ADN COMPLÉMENTAIRES (ADNC) .....	59
8.3.	AMPLIFICATION DE L'ADNC PAR RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR) ...	59
<b>9.</b>	<b>ANALYSE PAR MICROPUCE À ADN .....</b>	<b>60</b>
<b>10.</b>	<b>MESURE DU MÉTABOLISME LIPIDIQUE.....</b>	<b>62</b>
10.1.	MESURE DE LA SYNTHÈSE D'APOLIPROTEINES DE NOVO.....	62
10.2.	MESURE DE LA SYNTHÈSE ET DE LA SÉCRÉTION LIPIDIQUE .....	63

10.3.	MESURE DE LA SÉCRÉTION DE LIPOPROTÉINES .....	64
<b>11.</b>	<b>TRANSFECTIONS TRANSITOIRES ET ESSAIS LUCIFÉRASE.....</b>	<b>64</b>
11.1.	TRANSFECTIONS TRANSITOIRES.....	64
11.2.	ESSAIS LUCIFÉRASES .....	65
<b>12.</b>	<b>ANALYSE DES RÉSULTATS ET STATISTIQUES .....</b>	<b>66</b>
12.1.	ANALYSES DES MICROPUCES À ADN.....	66
12.2.	ANALYSE DE LA RÉSISTANCE TRANS-ÉPITHÉLIALE .....	66
	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>67</b>
<b>1.</b>	<b>VALIDATION DU MODÈLE D'ÉTUDE CELLULAIRE IEC-6 HNF4<math>\alpha</math>1 .....</b>	<b>67</b>
<b>2.</b>	<b>MORPHOLOGIE DES CELLULES EXPRIMANT HNF4<math>\alpha</math>1 .....</b>	<b>69</b>
2.1.	MORPHOLOGIE DES CELLULES INFECTÉES CULTIVÉES SUR PLASTIQUE .....	69
2.2.	MORPHOLOGIE DES CELLULES INFECTÉES CULTIVÉES SUR DIFFÉRENTES MATRICES .....	73
<b>3.</b>	<b>ETABLISSEMENT DES JONCTIONS CELLULAIRES EN PRÉSENCE DE LA PROTÉINE HNF4<math>\alpha</math>1.....</b>	<b>75</b>
3.1.	LOCALISATION DE DIFFÉRENTES PROTÉINES DES JONCTIONS CELLULAIRES .....	75
3.2.	MESURE DE LA RÉSISTANCE TRANS-ÉPITHÉLIALE .....	77
<b>4.</b>	<b>DÉTERMINATION DE NOUVELLES CIBLES DE HNF4<math>\alpha</math>1 DANS LES CELLULES INTESTINALES .....</b>	<b>77</b>
4.1.	DÉTERMINATION DE NOUVELLES CIBLES DE HNF4 $\alpha$ 1 PAR L'UTILISATION DE MICROPUCES À ADN.....	79
4.2.	CARACTÉRISTIQUES DES GÈNES INDUITS PAR HNF4 $\alpha$ 1 .....	80
4.3.	CARACTÉRISTIQUES DES GÈNES RÉPRIMÉS PAR HNF4 $\alpha$ 1 .....	85
4.4.	CONFIRMATION DE LA SUREXPRESSION DE DIFFÉRENTS GÈNES DANS LES CELLULES IEC- 6 HNF4 $\alpha$ 1 .....	85
4.5.	SUREXPRESSION DE HNF4 $\alpha$ 1 ET RÉGULATION DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES .....	91

<b>5. HNF4<math>\alpha</math>1 ET LE MÉTABOLISME LIPIDIQUE.....</b>	<b>91</b>
<b>6. HNF4<math>\alpha</math>1 ET RÉGULATION DE PRKAA2 (AMPK) .....</b>	<b>93</b>
<b>7. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE HNF4<math>\alpha</math> PAR LA PROTÉINE CDX2.....</b>	<b>98</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>103</b>
<b>1 – IDENTIFICATION DE NOUVELLES CIBLES DE HNF4<math>\alpha</math>1.....</b>	<b>104</b>
<b>2 – HNF4<math>\alpha</math>1 ET LE MÉTABOLISME CELLULAIRE .....</b>	<b>108</b>
<b>3 - HNF4<math>\alpha</math>1 ET LA DIFFÉRENCIATION INTESTINALE.....</b>	<b>111</b>
<b>4 – ACTIVATION DE HNF4<math>\alpha</math>1 PAR CDX2.....</b>	<b>115</b>
<b>CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>119</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>124</b>
<b>ANNEXE 1: LISTE DES GÈNES CIBLES DÉJÀ IDENTIFIÉS DE HNF4<math>\alpha</math> .....</b>	<b>146</b>
<b>ANNEXE 2: LISTE DES GÈNES SUREXPRIMÉS PLUS DE QUATRE FOIS DANS LES CELLULES IEC-6 HNF4<math>\alpha</math>1 .....</b>	<b>149</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1: Expression de HNF4 $\alpha$ dans l'organisme .....	26
Tableau 2: Effets de l'inactivation de HNF4 $\alpha$ dans différents modèles .....	41
Tableau 3: Liste des anticorps utilisés pour les immunobuvardages et immunofluorescences .....	53
Tableau 4: Séquence des sondes utilisées pour les gels de rétention .....	54
Tableau 5 : Séquence des oligonucléotides utilisés pour les RT-PCR .....	61
Tableau 6: Classification des gènes modulés par HNF4 $\alpha$ 1 .....	81
Tableau 7: Sélection de gènes induits par HNF4 $\alpha$ 1 .....	82
Tableau 8: Sélection de gènes sous exprimés lors de la surexpression de HNF4 $\alpha$ 1 .....	87
Tableau 9: Métabolisme lipidique lors de la surexpression de HNF4 $\alpha$ 1 .....	94
Tableau 10: Comparaison de l'effet de la surexpression de Cdx2 ou HNF4 $\alpha$ 1 dans les cellules IEC-6.....	99

## Liste des figures

Figure 1: Système digestif et structure générale de l'intestin .....	2
Figure 2: Ultrastructures de l'intestin.....	4
Figure 3: Cycles de maintien et de renouvellement de l'intestin grêle .....	6
Figure 4: Voies de signalisation induites par les protéines WNT .....	8
Figure 5: Voie de signalisation induite par les protéines Notch.....	14
Figure 6: Voie de signalisation induite par les protéines BMP .....	17
Figure 7: Structure du gène codant pour HNF4 $\alpha$ .....	19
Figure 8: Structure générale des récepteurs nucléaires et des isoformes de HNF4 $\alpha$ .....	21
Figure 9: Voies d'activation ou de répression du gène HNF4 $\alpha$ .....	27
Figure 10: Voies d'activation ou de répression de la protéine HNF4 $\alpha$ .....	33
Figure 11 : Validation du modèle expérimental IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 .....	68
Figure 12: Morphologie des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 observées par microscopie électronique à transmission .....	71
Figure 13: Morphologie de la membrane plasmique des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 par microscopie électronique à balayage.....	72
Figure 14: Morphologie des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 cultivées sur différentes matrices, observées par microscope électronique à transmission.....	74
Figure 15: Localisation par immunofluorescence des protéines $\beta$ -caténine, dlg3, E- cadhérine, Zo-1 et de l'occludine dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 .....	76



Figure 16: Résistance trans-épithéliale dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 à différents temps de confluence .....	78
Figure 17: Analyse des micropuces à ADN par le logiciel Genmapp2 .....	86
Figure 18: Analyse par RT-PCR et immunobuvardage de l'expression de divers gènes et protéines dans les cellules exprimant HNF4 $\alpha$ 1 .....	92
Figure 19: Modulation de l'expression de prkaa2 dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 .....	96
Figure 20: Structure du promoteur de prkaa2 .....	97
Figure 21: Impact de la surexpression de Cdx2 sur l'expression de HNF4 $\alpha$ .....	101

## Liste des abréviations

$\alpha$ 1-AT :  $\alpha$ 1-antitrypsine.

aa : acides aminés.

ADN : acide désoxyribonucléique.

ADNc : ADN complémentaire.

AF : activating factor.

AMPK ; “5’-AMP-activated-protein kinase”.

Apo : apolipoprotéine.

ARNm : ARN messenger.

BMP : “Bone Morphogenic Protein”.

BSA : sérum albumine de bœuf.

CAR : récepteur constitutif aux androstanes,

Cdx2 : “caudal type homeobox transcription factor 2”.

Cdk : “cyclin dependent kinase”.

CPS : comptes par seconde.

CRM1 : protéine exportin1, homologue à la protéine CRM1 de la levure.

CTE : extension carboxy-terminale.

DR1 : élément de réponse de type direct comportant deux demi-séquences séparées par une paire de bases.

EDTA : éthylènediamine disodium tétraacétate.

ER : élément régulateur situé 6 kb avant le promoteur P1 de HNF4 $\alpha$ .

Gata: “GATA binding protein”.

HDAC : histone désacétylase.

Hep3B : lignée cellulaire hépatique.

HepG2 : lignée cellulaire hépatique.

HNF : “hepatocyte nuclear factor” ou facteur nucléaire hépatique.

IEC-6 : lignée cellulaire épithéliale intestinale.

IL-1 $\beta$  : interleukine 1 $\beta$ .

kb : kilobase.

LKB1 : protéine impliquée dans le syndrome de Peutz-Jeghers, aussi nommée sérine/thréonine kinase STK11.

LPS: lipopolysaccharide.

MAPK: “mitogen activated protein kinase”.

MEB : microscope électronique à balayage.

MET : microscope électronique à transmission.

MODY: “mature onset diabetes of the young”.

MTP: “microsomal triglyceride transport protein”.

NCOR: nuclear receptor corepressor.

NLS : signal de localisation nucléaire.

NO : oxyde nitrique.

Notch-IC : domaine intracellulaire de Notch, produit par clivage.

P1 : promoteur 1.

P2 : promoteur 2.

Pdx1 : “insulin promoter factor 1”(IPF1).

PKA: protéine kinase A.

PMSF: phenylmethanesulfonylfluoride.

PPAR $\alpha$ : “peroxysome proliferator-activated receptor alpha”.

RAR $\beta$  : “retinoic acid receptor beta”.

RTE : résistance trans-épithéliale

SHP : “short heterodimer partner ”.

SMRT: “silencing mediator of repressed transcription”.

SRBI: “scavenger receptor BI”

UA: unités arbitraires.

# Détermination des fonctions de HNF4 $\alpha$ dans les cellules épithéliales intestinales

par :

**Delabre Jean-Francois**

Thèse présentée à la faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire, Université de Sherbrooke

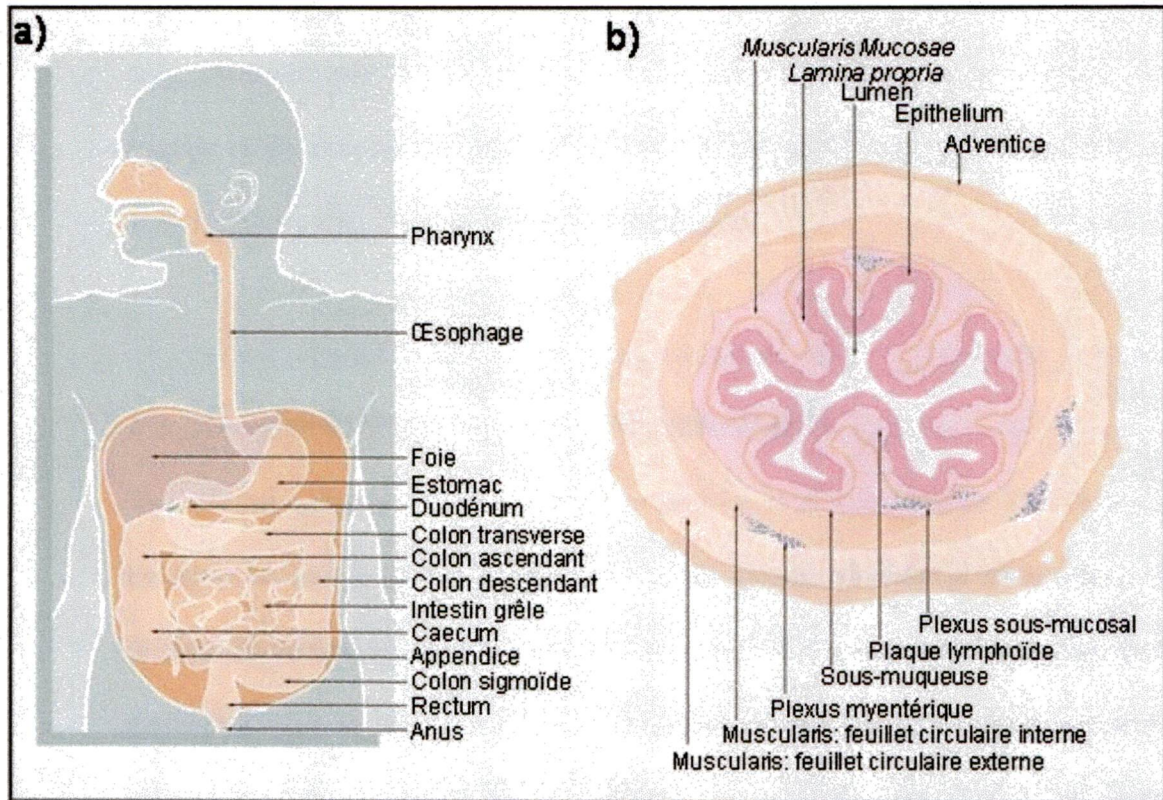
**Introduction :** La protéine HNF4 $\alpha$  est un récepteur nucléaire orphelin exprimé dans le foie et tout au long de l'axe gastro-intestinal. De nombreuses études effectuées dans le foie ou des cultures cellulaires ont mis en évidence l'implication de HNF4 $\alpha$  dans des mécanismes de différenciation cellulaire ainsi que dans le contrôle du métabolisme lipidique. Toutefois, le rôle de cette protéine dans les processus de différenciation et dans le contrôle du métabolisme des cellules épithéliales intestinales est encore mal connu. Nous avons donc décidé d'étudier les rôles de la protéine HNF4 $\alpha$  dans l'intestin et de déterminer de nouvelles cibles transcriptionnelles. **Méthodes :** Des cellules épithéliales intestinales non différenciées IEC-6 ont été infectées avec un vecteur pBabepuro vide ou exprimant l'isoforme HNF4 $\alpha$ 1. La morphologie des cellules a été observée par microscopie optique et électronique. L'impact de l'expression de HNF4 $\alpha$ 1 dans les cellules IEC-6 a été étudié à l'aide de micropuces à ADN de type Affymetrix. L'expression et l'activité de différents gènes sélectionnés sur les micropuces à ADN ont été testées par RT-PCR, immunobuvardage, essais luciférase et gels par retard de migration. Finalement l'activité métabolique a été testée en mesurant la synthèse et la sécrétion des apolipoprotéines et des lipoprotéines après marquage avec de l'acide oléique marqué au carbone 14 et de la méthionine marquée au soufre 35. **Résultats :** 1) les cellules qui expriment HNF4 $\alpha$ 1 présentent des microvillosités, habituellement observées sur des cellules épithéliales intestinales différenciées, ainsi que des modifications de la forme des cellules. Parallèlement, on peut noter une meilleure organisation des jonctions intercellulaires. 2) On peut observer une augmentation de l'expression de la villine qui est habituellement observée au niveau de la bordure en brosse. 3) On observe une importante modification d'expression des protéines RAR $\beta$  et PPAR $\beta$  qui sont notamment impliquées dans le contrôle de mécanismes de différenciation. 4) L'analyse des micropuces à ADN met en évidence l'augmentation d'un nombre important de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. Parallèlement, il y a augmentation de la synthèse d'apolipoprotéines et de HDL. 5) Les micropuces à ADN ont permis d'identifier que la protéine prkaa2, une sous-unité catalytique de l'AMPK, est une cible de HNF4 $\alpha$ 1. 6) La protéine Cdx2 peut induire l'expression de HNF4 $\alpha$  via son promoteur. **Conclusions :** HNF4 $\alpha$ 1 est impliquée dans les mécanismes de différenciation et de métabolisme intestinaux. Elle permet l'établissement d'un réseau transcriptionnel qui conduit à une modification des interactions intercellulaires, de la morphologie cellulaire ainsi qu'à l'apparition de microvillosités. De plus, HNF4 $\alpha$ 1 induit une augmentation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique ainsi qu'à une augmentation de la synthèse lipidique. Parallèlement, nous avons pu montrer que HNF4 $\alpha$ 1 contrôlait l'expression de la sous-unité prkaa2 de l'AMPK et que HNF4 $\alpha$ 1 et Cdx2 étaient impliquées dans des voies de régulation communes, notamment dans la différenciation intestinale.

# Introduction

## 1. Le système intestinal

### 1.1. Anatomie et fonctions du système intestinal

Le système digestif, ou tractus gastrointestinal, est un ensemble complexe d'organes intervenant principalement au niveau de la digestion et de l'ingestion des aliments (figure 1a). La digestion permet la transformation d'aliments en éléments utilisables par l'organisme (glucides, lipides et protides notamment) par le biais d'actions mécaniques ou enzymatiques. Brièvement, les aliments sont tout d'abord broyés au niveau de la bouche et mélangés à la salive avant que le bol alimentaire ne descende dans l'estomac par le biais de l'œsophage. Dans l'estomac, la fragmentation mécanique des aliments est complétée tandis que les sucs gastriques commencent le cycle de dégradation enzymatique des nutriments. Le contenu de l'estomac est ensuite transféré dans les intestins qui sont composés dans l'ordre de l'intestin grêle (composé du duodénum, du jéjunum, et de l'iléon) et du gros intestin (lui-même composé du colon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde). Au niveau du duodénum, les enzymes sécrétées par les cellules intestinales, le pancréas (suc pancréatique) et la vésicule biliaire (bile) agissent de façon coordonnée dans la dégradation finale des nutriments. La majorité de l'absorption des aliments et des liquides sécrétés au cours de la digestion s'effectue au niveau de l'intestin grêle tandis que le colon intervient



**Figure 1 : Système digestif et structure générale de l'intestin**

**a)** Le système digestif est constitué d'un ensemble d'organes qui participent à l'ingestion, la digestion, au stockage ou à la redistribution des nutriments. **b)** Structure générale de l'intestin, coupe transversale. Le tube digestif est constitué d'un ensemble de couches circulaires qui possèdent chacune un rôle dans la digestion et l'ingestion des nutriments, ainsi que leur redistribution dans l'organisme.

Tiré de Young et Heath (2000).

principalement dans la récupération de l'eau et la fin de l'absorption des aliments. Les résidus alimentaires sont finalement stockés au niveau du sigmoïde et plus particulièrement du rectum. Le déplacement des aliments s'effectue principalement par des contractions volontaires des muscles au niveau de la bouche et de l'œsophage puis par des mouvements de contractions réflexes des muscles lisses appelés mouvements péristaltiques.

## 1.2. Structure et ultrastructure de l'intestin grêle

Le système gastro-intestinal présente une structure générale similaire dans ses différentes parties. Il est globalement de la forme d'un tube composé de quatre parties principales : la muqueuse (comprenant un épithélium, la *lamina propria* et la *muscularis mucosae*), la sous-muqueuse, une couche musculaire et l'adventice. La muqueuse, située en contact avec le lumen, présente une épaisseur variable tout au long du système digestif (figure 1b). Plus spécifiquement, l'intestin grêle mesure environ six mètres chez l'humain et présente de nombreux plis circulaires (aussi appelé valves de Kerkring) formés de la muqueuse et de la sous-muqueuse (figure 2a). La surface de la muqueuse est composée de nombreuses projections dans le lumen appelées villosités tandis qu'au pied de ces villosités la muqueuse prend la forme de cryptes, aussi appelées cryptes de Lieberkühn (figures 2b et 2d). Finalement, les villosités présentent elles-mêmes de nombreuses microvillosités sur la membrane apicale des entérocytes (figure 2c).



## **Figure 2 : Système digestif et structure générale de l'intestin**

### **a) Représentation schématique d'une coupe transversale de l'intestin grêle**

L'intestin grêle est une structure complexe composée de plusieurs couches dont des muqueuses, des couches musculaires ainsi que des repliements et des microvillosités qui permettent d'accroître la surface d'absorption des aliments.

PP : plaque de Peyer ; CM : couche circulaire de la *muscularis mucosae* ; PC : plis circulaires ou valves de Kerkring ; S : sous-muqueuse ; V : villosité ; MM : *muscularis mucosae*; LM : couche longitudinale de la *muscularis mucosae* ; Se : couche séreuse.

### **b) Représentation schématique de l'axe crypte - villosité :**

L'intestin grêle est caractérisé par la présence d'un axe crypte-villosité qui tient une place particulière dans les fonctions de l'intestin grêle. V : villosité ; C : crypte de Lieberkühn.

### **c) Représentation de la structure d'un entérocyte :**

Les entérocytes, ou cellules épithéliales intestinales différenciées, sont caractérisés par la présence d'une bordure en brosse, composée de microvillosités, qui participent elles aussi dans l'augmentation de la surface d'absorption. E : entérocyte ; Mv : microvillosité.

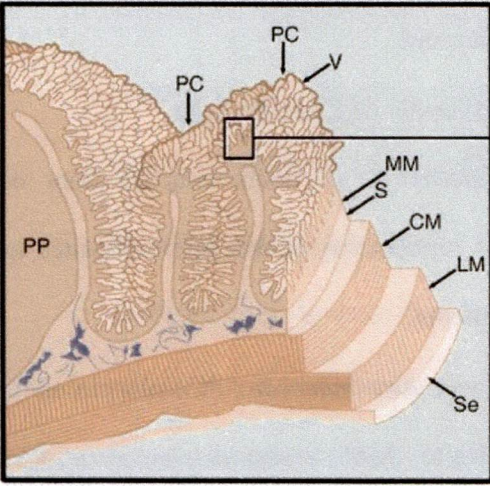
### **d) Coupe histologique de l'intestin grêle**

Cette coupe d'un duodénum humain grossie 15 fois, après une coloration à l'éosine hématoxyline, permet de visualiser l'organisation des différentes structures intestinales.

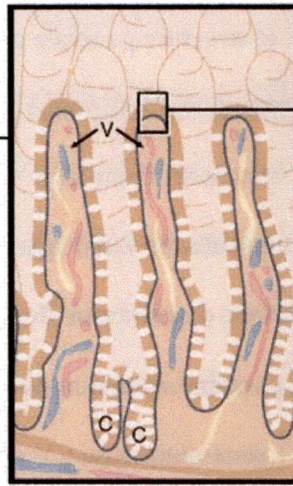
SM : sous - muqueuse ; MM : *muscularis mucosae* ; LP : *lamina propria* ; C : cryptes ; V : villosité.

Tiré de Young B. et Heath J. W. (2000)

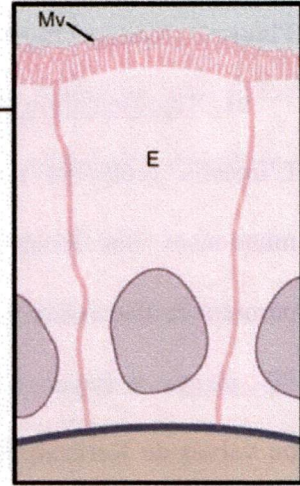
a)



b)



c)



d)



Plusieurs types cellulaires peuvent être observés au niveau de l'intestin grêle. Les entérocytes forment le type cellulaire le plus répandu dans l'intestin et présentent des microvillosités à leur surface apicale. Ces cellules sont spécifiques de l'intestin et sont les principales cellules absorbantes. Les cellules à mucus sont présentes parmi les entérocytes et produisent notamment la mucine nécessaire à la protection de l'épithélium. Les cellules de Paneth sont observées au niveau de la crypte et interviennent dans la défense de l'intestin en produisant des lysozymes et des produits antimicrobiens. Les cellules entéroendocrines produisent localement des hormones qui régulent la motilité gastro-intestinale, l'absorption intestinale et la sécrétion pancréatique. Les cellules souches, situées à la base de la crypte, se divisent continuellement afin de produire les quatre types cellulaires précédemment cités. Finalement, des lymphocytes intra épithéliaux participent à la défense de l'intestin.

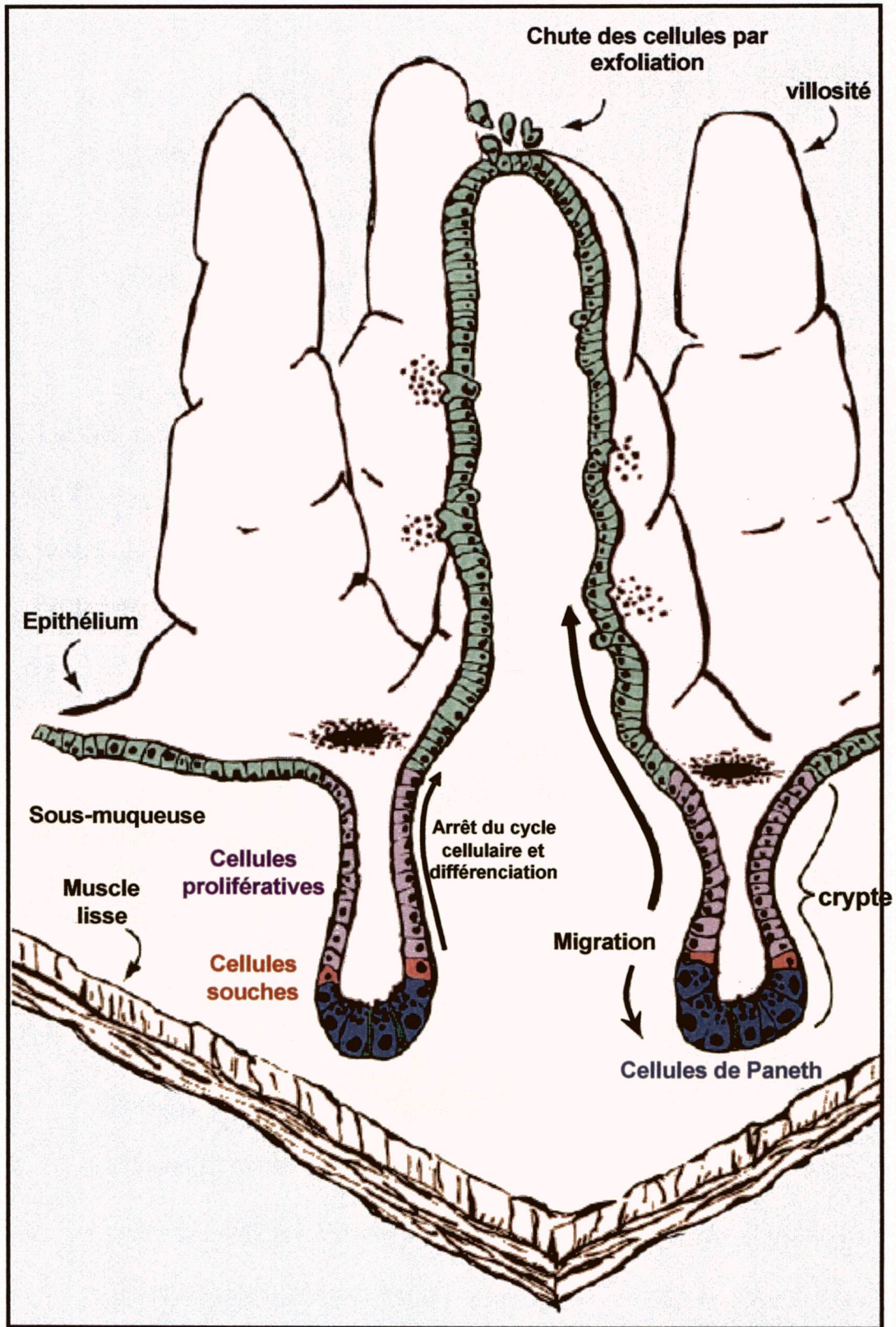
### 1.3. Renouvellement et différenciation de l'épithélium intestinal

Au niveau de l'intestin grêle, les cellules intestinales ont un taux de renouvellement élevé puisque chez l'humain, le renouvellement des cellules de la villosité prend environ cinq jours tandis que les cellules de Paneth ont une espérance de vie d'environ 20 jours. Les cellules différenciées spécifiques de l'intestin grêle proviennent toutes des cellules "pluripotentes" prolifératives localisées dans le bas de la crypte, au niveau de la niche, où commence la différenciation des différents types cellulaires intestinaux (figure 3)

### **Figure 3 : Cycles de maintien et de renouvellement de l'intestin grêle**

Localisation des cycles de différenciation, prolifération et de perte des cellules intervenant dans le maintien de l'intégrité intestinale. Les cellules souches, hautement prolifératives et situées dans la crypte, donnent naissance aux différents types cellulaires intestinaux qui vont progressivement se différencier puis migrer vers le fond de la crypte ou vers l'extrémité de la villosité où elles vont entamer un mécanisme d'exfoliation puis se désolidariser de la villosité.

Tiré de Sancho *et al.* (2004)



(Cheng et Leblond, 1974; Leedham *et al.*, 2005). La niche fournit l'environnement nécessaire aux cycles de renouvellement/différenciation. Les cellules souches peuvent s'auto-reproduire tout en maintenant la production des futures cellules intestinales (Leedham *et al.*, 2005). Les cellules prolifératives, situées dans le bas de la crypte, se différencient et deviennent matures au niveau du dernier tiers de la crypte, avant que les cellules différenciées ne migrent vers l'extrémité de la villosité, à l'exception des cellules de Paneth qui migrent vers le bas de la crypte (Cheng et Leblond, 1974). Au niveau de l'extrémité de la villosité, les cellules sont exfoliées et sont remplacées par de nouvelles cellules, dans un cycle de renouvellement continu (Hall *et al.*, 1994).

#### 1.4. Voies impliquées dans le développement ou le maintien intestinal

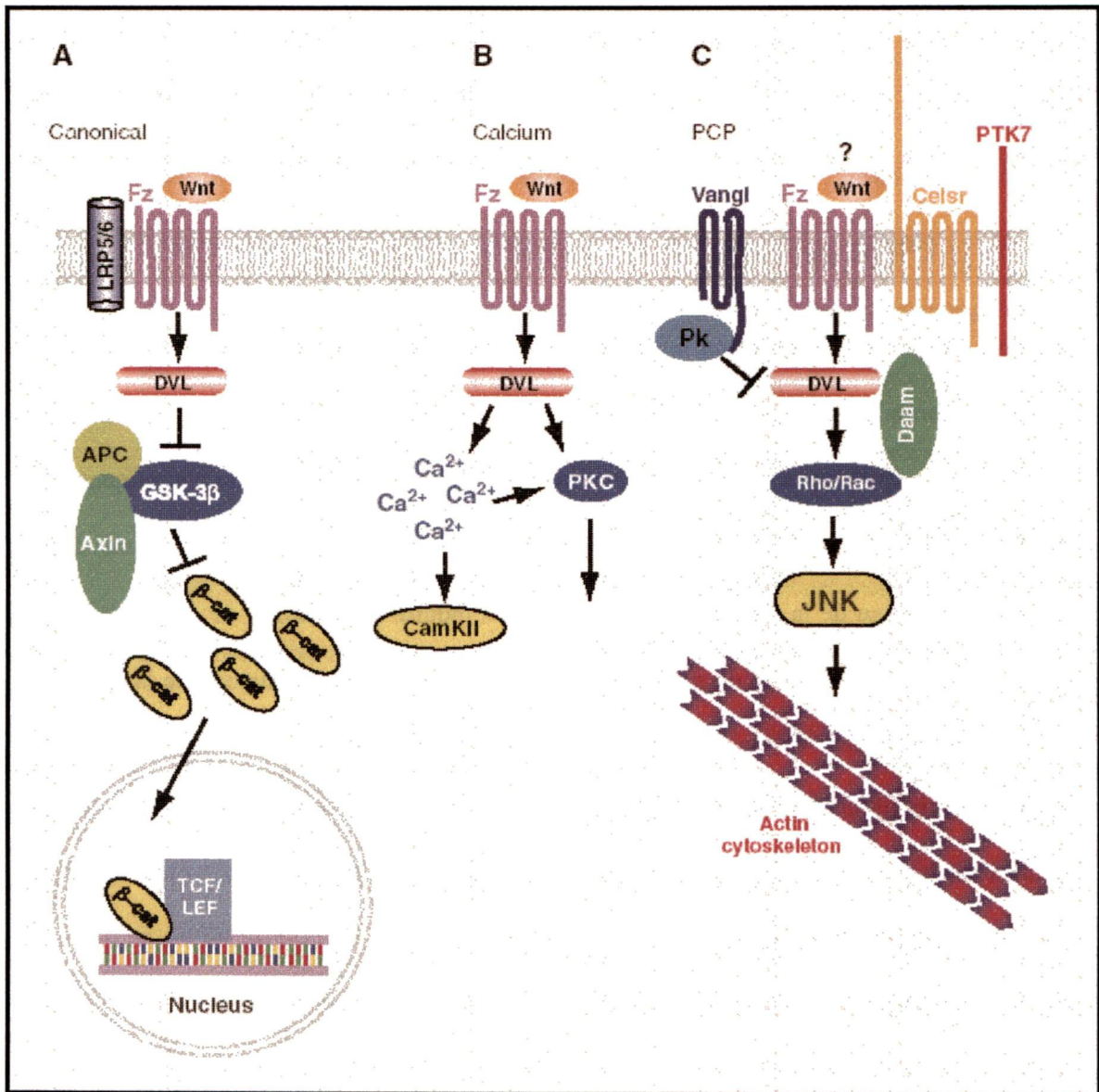
##### 1.4.1. Rôle des protéines Wnt dans le développement ou le maintien intestinal

La voie Wnt est une cascade qui implique notamment la participation du complexe caséine kinase-1/GSK3 $\beta$ , et des protéines APC, Axine et  $\beta$ -caténine (figure 4). Les protéines Wnt sont des facteurs solubles qui, lors de leur liaison sur leurs récepteurs Frizzled, provoquent un blocage de l'activité du complexe formé par les protéines APC, caséine kinase-1 et GSK3 $\beta$ , induisant ainsi une accumulation de la  $\beta$ -caténine qui migre ensuite dans le noyau. Une fois au noyau, la  $\beta$ -caténine se lie aux protéines de la famille TCF/LEF qui agissent comme

**Figure 4 : Voies de signalisation induites par les protéines Wnt**

**a)** Voie canonique de signalisation induite par les protéines Wnt. L'activation du récepteur par la liaison de la protéine Wnt va induire une cascade de signalisation impliquant les protéines Dishevelled et le complexe comprenant la GSK3 $\beta$ , l'axine et APC puis mener à une migration au noyau de la protéine  $\beta$ -caténine qui va induire l'expression de gènes cibles. **b)** Dans certain cas, l'activation de son récepteur par Wnt va induire l'activation de la CAMKII et la protéine kinase C via l'augmentation du Calcium intracellulaire. **c)** Cascade de signalisation impliquant le calcium intracellulaire. **c)** Voies non canoniques de signalisation induites par les protéines Wnt. Finalement, la protéine Wnt peut activer une voie alternative, impliquant une activation de la protéine Jnk, qui va

Tiré de Montcouquiol *et al.* (2006).





des activateurs transcriptionnels des gènes cibles de la protéine Wnt (Montcouquiol *et al.*, 2006). Lors de l'absence de protéine Wnt, la protéine GSK3 $\beta$  phosphoryle la  $\beta$ -caténine cytoplasmique, entraînant ainsi son ubiquitination puis sa dégradation dans le protéasome. Les protéines Wnt peuvent aussi induire des voies impliquant les PKC et le calcium ou la protéine JNK.

Plusieurs études ont jeté un éclairage sur l'importance de la voie Wnt dans la formation de l'intestin fœtal et adulte. Particulièrement, Korinek *et al.* (1998) ont observé que l'absence d'expression de la protéine TCF4 induisait la perte des compartiments prolifératifs de l'intestin grêle. Plus récemment, Gregorieff *et al.* (2005) ont observé que les protéines Wnt et Frizzled étaient exprimées au niveau des cellules épithéliales cryptales. L'inhibition de l'activité de la  $\beta$ -caténine, qui est constitutivement activée dans les cellules de cancers colorectaux conduit ces cellules à passer d'un phénotype de type cryptal à un phénotype différencié semblable à celui observé dans les villosités (van de Wetering *et al.*, 2002). Finalement, la surexpression d'un inhibiteur des protéines Wnt solubles conduit à une baisse significative de la prolifération épithéliale ainsi qu'une perte des cryptes (Pinto *et al.*, 2003).

#### 1.4.2. Rôle des protéines Cdx dans le développement ou le maintien intestinal

Les protéines Cdx sont des facteurs de transcription caractérisés par un homéodomaine qui permet une liaison directe à l'ADN. A ce jour, trois isotypes de

Cdx ont été identifiés chez la souris et l'humain : Cdx1, Cdx2 et Cdx4 (Freund *et al.*, 1998). Au cours du développement embryonnaire murin, la protéine Cdx2 voit progressivement son expression se restreindre à l'endoderme intestinal (Beck *et al.*, 1995). Chez l'adulte, la protéine Cdx2 est localisée essentiellement au niveau des cellules en cours de différenciation situées dans le haut de la crypte et dans les cellules différenciées situées dans la villosité, à l'exception de l'extrémité de la villosité (Boulangier *et al.*, 2005). Chez la souris adulte, l'expression de Cdx2 augmente progressivement à partir du duodénum jusqu'au colon proximal où elle diminue progressivement jusqu'à disparaître dans le colon distal (Silberg *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2006).

Les protéines Cdx jouent un rôle important lors du développement intestinal et permettraient de réguler l'équilibre entre différenciation et prolifération dans les cellules épithéliales intestinales (Beck, 2004). Elles contrôlent notamment l'expression de plusieurs enzymes intestinales telles que la lactase - phlorizine hydrolase et la sucrase - isomaltase (Suh *et al.*, 1994; Fang *et al.*, 2000; van Wering *et al.*, 2002). L'inactivation de l'expression de Cdx2 chez des souris induit l'apparition de polypes intestinaux et un phénomène d'antériorisation intestinale (Chawengsaksophak *et al.*, 1997). De plus, l'expression de Cdx2 dans l'estomac induit l'expression de gènes spécifiques de l'intestin ainsi que l'apparition de cellules en gobelets qui sont spécifiques de l'intestin (Silberg *et al.*, 2002). Cdx2 possède de plus un rôle important dans la régulation de la prolifération et de la différenciation intestinale (Suh et Traber, 1996; Escaffit *et al.*, 2006). Finalement, Mutoh *et al.* (2005) ont observé *in vivo* que la protéine Cdx2 pouvait être

suffisante pour contrôler la morphogénèse et les fonctions absorbatives des cellules intestinales. Ils ont de plus observé dans les cellules épithéliales intestinales de rat IEC-6 que Cdx2 contrôlait l'expression de la protéine Math1, impliquée dans la détermination du devenir des cellules entéroendocrines, en gobelet et de Paneth (Mutoh *et al.*, 2006).

#### 1.4.3. Rôles des protéines LKB1 et AMPK

La protéine kinase LKB1 a été identifiée en 1998 lors de l'analyse génétique de plusieurs familles atteintes de la maladie de Peutz-Jeghers qui touche le système gastro-intestinal (Hemminki *et al.*, 1998). Cette protéine a été impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires, tels que le contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire ou de l'apoptose induite par la protéine p53, des voies Wnt et TGF $\beta$  ou du métabolisme énergétique (Baas *et al.*, 2004b). Afin d'être active, la protéine LKB1 nécessite la présence des protéines STRAD et MO25 qui vont former un complexe d'activation (Boudeau *et al.*, 2003). Lors de l'activation du complexe, la protéine LKB1 active par phosphorylation la protéine "5'-AMP-activated-protein kinase" (AMPK), qui est une protéine clé dans le contrôle métabolique (Woods *et al.*, 2003; Kahn *et al.*, 2005). LKB1 et l'AMPK sont toutes les deux activées lors de stress métaboliques qui conduisent notamment à une diminution de la quantité d'ATP intracellulaire et une augmentation de la quantité d'AMP intracellulaire libre. Ces protéines servent donc de points de contrôle dépendant du niveau énergétique de la cellule et possèdent un rôle central dans le contrôle du

métabolisme de la cellule ou de l'organisme comme le prouve la régulation de leur activité par la ghreline, la leptine, l'insuline, l'hypoglycémie, l'hyperglycémie ou lors de la prise de nourriture (Kahn *et al.*, 2005). La protéine AMPK est une protéine hétérotrimérique composée d'une sous-unité catalytique  $\alpha$ , qui possède une activité kinase, et de deux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$  qui possèdent la capacité d'activer l'activité de l'AMPK lors de la liaison de substrats. Bien que l'activité de l'AMPK soit régulée par la liaison d'AMP et éventuellement de glycogène et que plusieurs modulateurs de son activité aient été identifiés, aucun régulateur de l'expression de l'AMPK n'a encore été identifié (Kahn *et al.*, 2005).

L'AMPK possède un rôle central dans la cellule en contrôlant notamment la lipolyse, les sécrétions par les canaux chlorures, la synthèse ou l'oxydation des acides gras, la croissance cellulaire ou la synthèse de protéines, notamment via l'activation de la protéine mTor (Hardie, 2005). L'inactivation spécifique de la sous-unité  $\alpha_2$  (*prkaa2*) de l'AMPK induit une résistance à l'insuline ainsi qu'une augmentation de la prise de poids de rats suite à une diète (Jorgensen *et al.*, 2004). Plus spécifiquement, Baas *et al.* (2004a) ont observé que la surexpression de LKB1 dans des cellules de colon induisait une réorganisation du cytosquelette, une relocalisation de marqueurs spécifiques des pôles apical et basal et la formation de microvillosités. Plus récemment, Forcet *et al.* (2005) ont confirmé que la protéine LKB1 jouait un rôle dans la polarisation cellulaire, possiblement via le contrôle de la protéine AMPK.

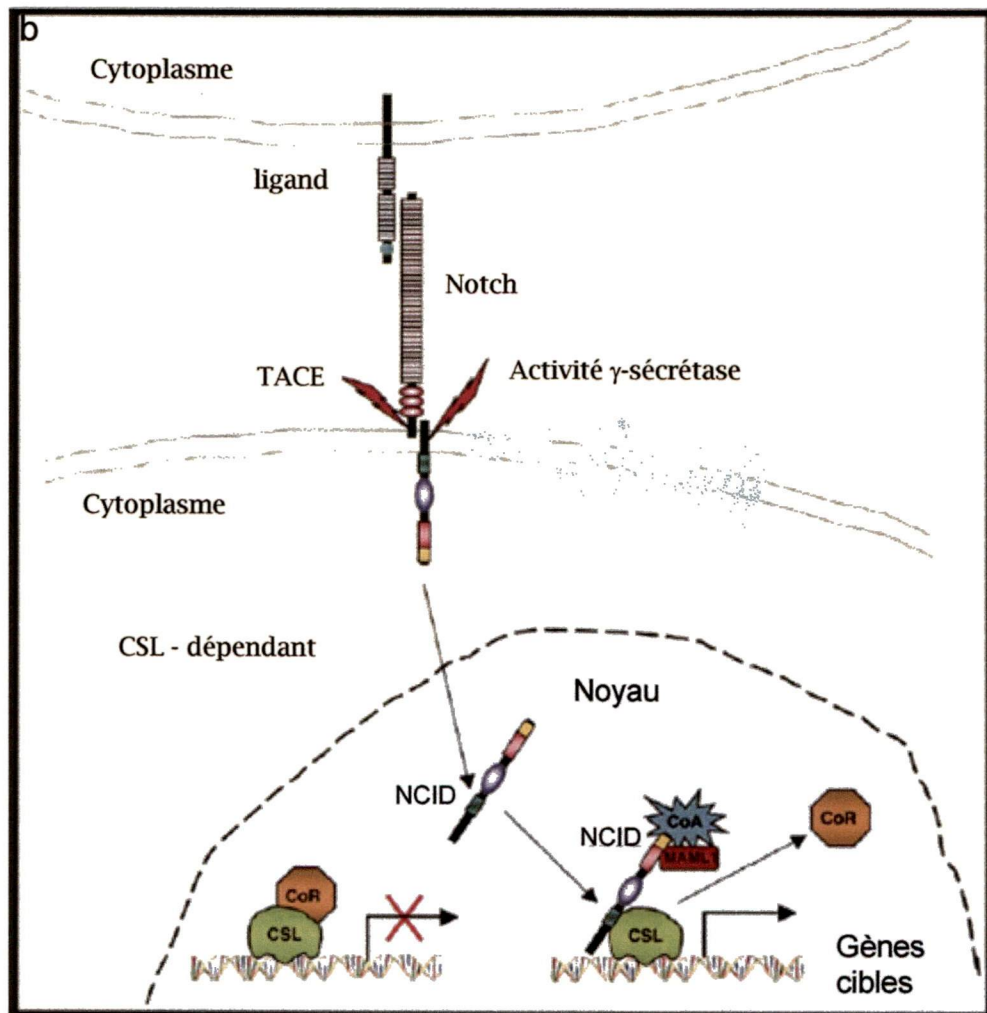
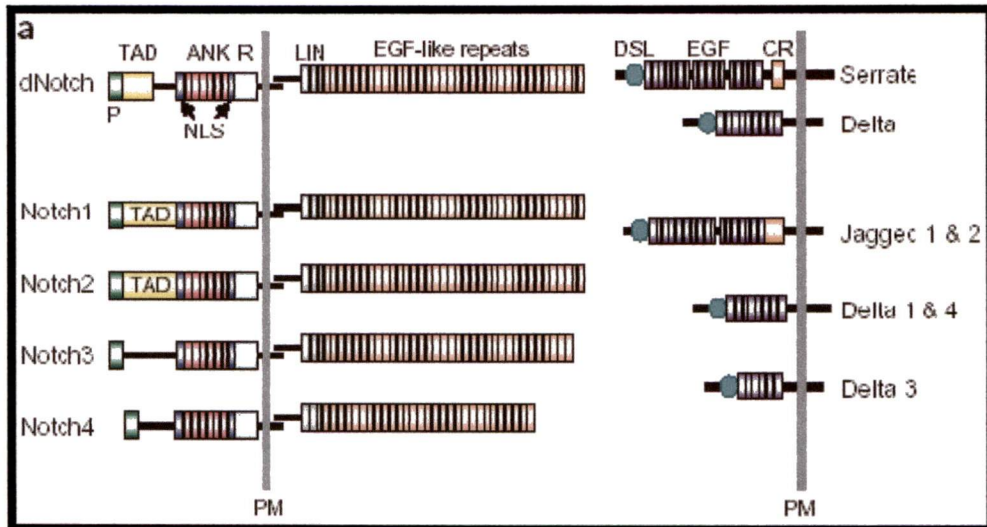
#### 1.4.4. Rôle des protéines Notch dans le développement ou le maintien intestinal

Chez les mammifères, quatre récepteurs Notch (Notch 1-4) ainsi que cinq ligands (delta-like 1, 3 et 4, Jagged 1 et 2) ont été identifiés (figure 5a) (Radtke *et al.*, 2004). Ces protéines sont toutes des protéines transmembranaires situées sur les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes. L'interaction du récepteur et de son ligand induit un clivage protéolytique du récepteur Notch qui va conduire à la libération du domaine intracellulaire (figure 5b). Ce domaine migre dans le noyau où il se lie au facteur de transcription Csl/CBF1. A l'état libre, la protéine Csl/CBF1, liée à des corépresseurs, se comporte comme un inhibiteur transcriptionnel tandis que la liaison du domaine intracellulaire de Notch à Csl/CBF1 induit la transcription des gènes cibles des ligands de Notch. Les protéines Notch contrôlent indirectement plusieurs protéines impliquées dans la différenciation intestinale, telles que les protéines Math-1, Hes1 ou Ngn3 (Schönhoff *et al.*, 2004). L'absence des protéines Ngn3 ou Hes1 (Jensen *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002) perturbe la différenciation des cellules endocrines tandis que l'absence de Math1 entraîne l'absence de toutes les cellules sécrétrice intestinales (Yang *et al.*, 2001). Stanger *et al.* (2005) ont finalement observé que la protéine Notch contrôlait le développement intestinal chez l'adulte en contrôlant l'équilibre entre les cellules de type sécrétrice et absorbante. Parallèlement, Fre *et al.* (2005) ont mis en évidence que l'activation des protéines Notch pouvait inhiber

**Figure 5: Voie de signalisation induite par les protéines Notch**

**a)** Ligands et récepteurs spécifiques de la voie Notch. A l'heure actuelle, cinq protéines Notch différentes, *Notch* et *Notch1* à *4*, ont été identifiées ainsi que cinq récepteurs transmembranaires pour ces ligands, *Serrate*, *Delta*, *Delta 1*, *3* et *4*. **b)** Voie de signalisation par les protéines Notch. La voie Notch est activée lors de la liaison d'un ligand Notch et d'un de leur récepteur entre deux cellules adjacentes. Cette activation induit le clivage du domaine extracellulaire et transmembranaire par les protéines TACE et  $\gamma$ -secrétase respectivement. Ces clivages permettent la libération du domaine intracellulaire (NICD) qui va s'hétérodimériser avec la protéine *Csl* puis migrer dans le noyau où le complexe va activer l'expression de gènes cibles après recrutement de coactivateurs et déplacement de corépresseurs.

Tiré de Wilson et Radtke (2006) et Radtke *et al.* (2004).



la différenciation des cellules intestinales tout en permettant l'augmentation du nombre de cellules souches cryptales. Finalement, Van Es *et al.* (2005) ont montré que l'inhibition de la voie Notch à l'aide d'inhibiteurs induisait une différenciation des cellules cryptales en cellules en gobelet, notamment chez des souris déficientes en APC.

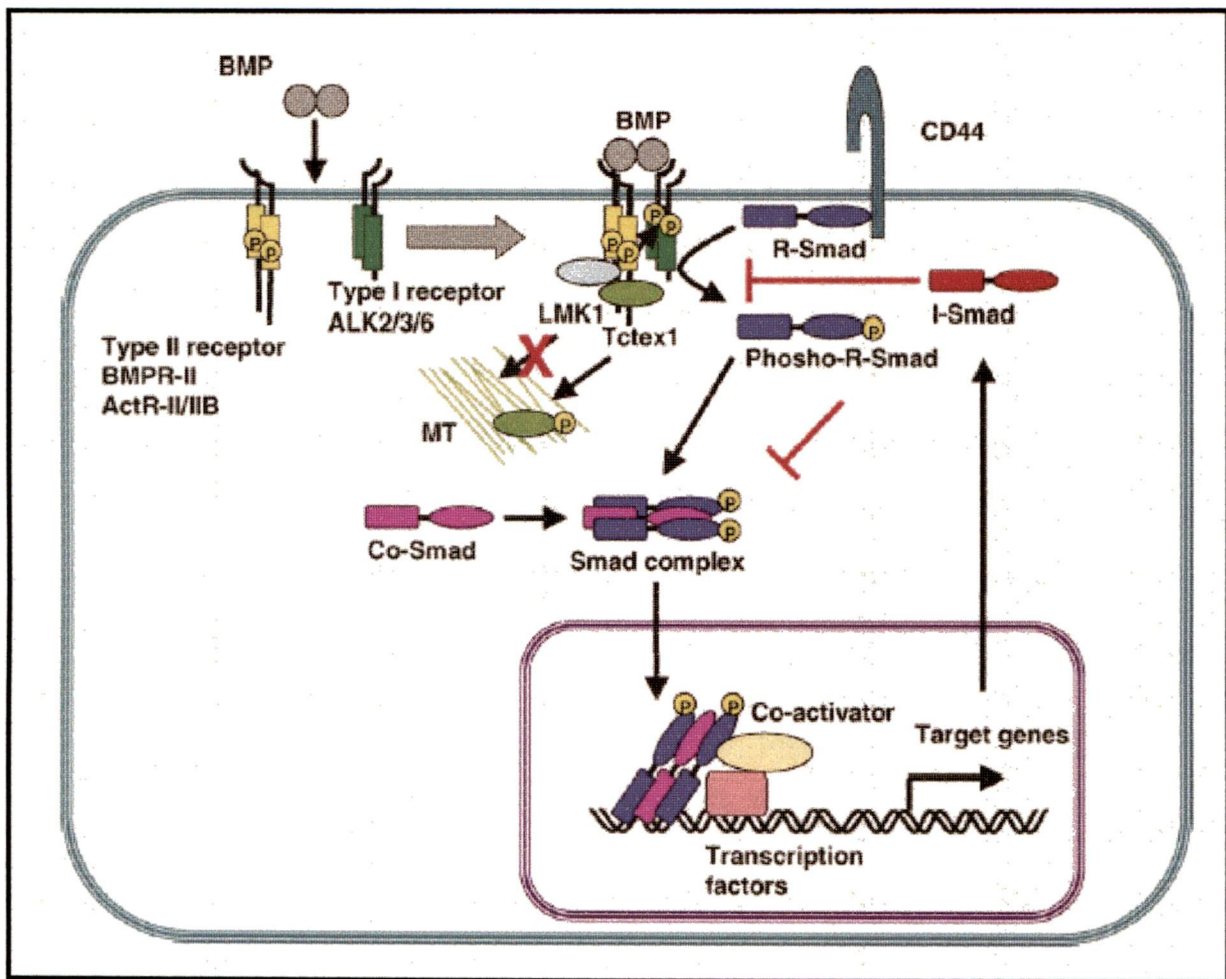
#### 1.4.5. Voie impliquant les protéines Smad et BMP

Les protéines de la sous-famille des protéines « Bone morphogenic proteins » (BMP) font partie de la famille des facteurs de croissance TGF $\beta$  (Transforming Growth Factors). Les protéines BMP ont tout d'abord été identifiées pour leur rôle dans la formation ectopique de cartilage avant de se voir attribuer des rôles de régulation majeurs dans l'embryogenèse précoce, l'organogenèse et l'homéostasie cellulaire chez l'adulte. Les protéines BMP peuvent exercer leur action via deux types de récepteurs caractérisés par leur activité serine/thréonine kinase : les récepteurs de type I (BMPRIa et BMPRIb) et ceux de type II (BMPRII). Lors de la liaison d'une protéine BMP, les BMPRII, constitutivement actives, vont activer par phosphorylation les BMPRI qui vont ensuite activer une cascade de transactivation impliquant les protéines SMADS 1, 5 et 8 (figure 6). Ces dernières, en formant des hétérodimères avec la protéine SMAD4 dans le cytoplasme, vont ensuite s'accumuler dans le noyau avant d'induire l'expression des gènes spécifiques des protéines BMP par le biais du recrutement de co-activateurs ou de protéines modifiant l'état de la chromatine. Plusieurs interconnexions entre la voie



de signalisation des BMP et les voies Notch, Wnt, Jnk et certaines kinases telles que les MAPK ont été observées (Miyazono *et al.*, 2005)..

Plusieurs études ont rapporté un rôle des protéines BMP dans la morphogénèse intestinale. Fritsch *et al.* (2002) ont tout d'abord montré que la syntaxine influençait la morphologie intestinale et la formation de l'axe crypte - villosité, très probablement par l'induction de la voie des BMP. Hardwick *et al.* (2004) ont observé que les protéines BMP2, BMPRIa, BMPRIb et BMPRII sont exprimées dans des lignées de cellules de colon mature tandis que la protéine BMPRIa est fréquemment mutée dans les cas de polypose gastrique familiale. De plus, Batts *et al.* (2006) ainsi que Haramis *et al.* (2004) ont observé lors de la surexpression de la protéine Noggin, un inhibiteur de la voie des BMP, une altération de la formation des villosités au stade précoce de leur développement, ce qui induit la création de villosités déformées et réduites ainsi que l'apparition de nombreuses cryptes ectopiques. Finalement, les protéines BMP peuvent bloquer la voie de signalisation des WNT ce qui permet le maintien d'un taux de renouvellement constant et régulé des cellules souches (He *et al.*, 2004).



**Figure 6 : Voie de signalisation induite par les protéines BMP**

Les protéines BMP (Bone Morphogenetic Protein) peuvent agir via deux types de récepteurs, les récepteurs BMPRII ou BMPRI. Lors de la liaison de leur ligand, les protéines BMPRII vont activer les BMPRI par phosphorylation ce qui va ensuite induire une cascade de transactivation impliquant les protéines SMADS 1, 5 et 8. Ces protéines, en se liant à SMAD4 vont ensuite induire l'expression de cibles spécifiques par le biais du recrutement de co-activateurs ou de protéines modifiant l'état de la chromatine.

Tiré de Miyazono *et al.* (2005).

## 2. “Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$ ” (HNF4 $\alpha$ )

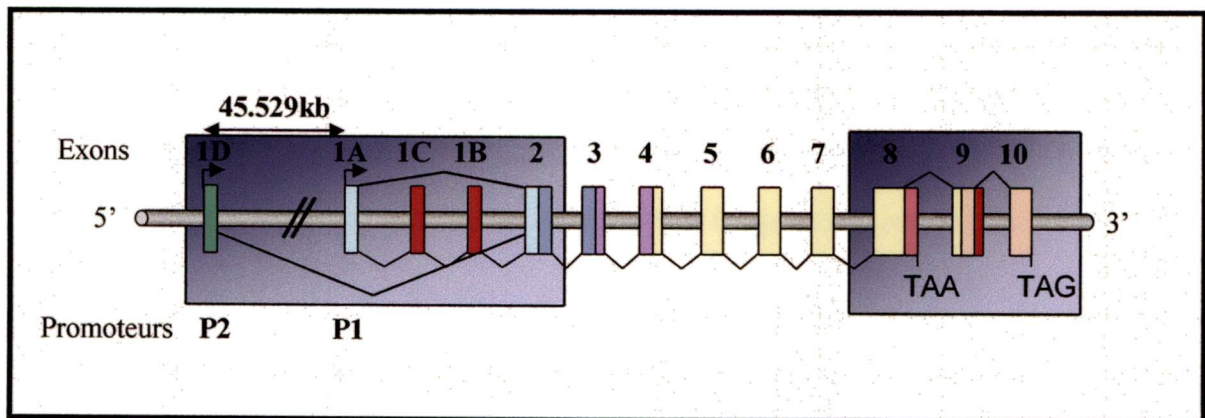
### 2.1. Généralités

Les protéines “Hepatocyte Nuclear Factor-4” (HNF4) sont des récepteurs nucléaires de la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux de type stéroïdien/thyroïdien (Sladek *et al.*, 1990). Le premier membre de cette famille, HNF4 $\alpha$ 1, a été initialement purifié à partir d’extraits de foie (Costa *et al.*, 1989; Sladek *et al.*, 1990). Trois isotypes de HNF4 sont actuellement connus, HNF4 $\alpha$  et HNF4 $\gamma$  chez les mammifères (Costa *et al.*, 1989), et HNF4 $\beta$  qui n’a été observé que chez *Xenopus laevis* (Holewa *et al.*, 1997). Le gène codant pour HNF4 $\alpha$  est situé sur le chromosome 20 chez l’humain ou 2 chez la souris (Avraham *et al.*, 1992).

### 2.2. Structures de HNF4 $\alpha$

#### 2.2.1. Structure du gène HNF4 $\alpha$

Le gène HNF4 $\alpha$  est composé de 13 exons (figure 7) (Furuta *et al.*, 1997). L’expression de ce gène est sous le contrôle de deux promoteurs P1 et P2, séparés de 45 kb (Zhong *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 2001; Boj *et al.*, 2001), comme fréquemment observé pour d’autres récepteurs nucléaires de type stéroïdien tel que



**Figure 7 : Structure du gène codant pour la protéine HNF4 $\alpha$**

Le gène codant pour HNF4 $\alpha$  contient deux promoteurs, P1 et P2, et 13 exons qui permettent la formation de neuf isoformes par l'utilisation alternative des promoteurs et de variations d'épissage. Ces isoformes varient essentiellement au niveau des extrémités N- et C-terminales. Les promoteurs P1 et P2 sont distant de 45 kb.

RAR $\beta$  (Zelent *et al.*, 1991). L'utilisation alternative de ces deux promoteurs et de variations dans l'épissage de l'ARNm permet au gène HNF4 $\alpha$  de coder pour neuf isoformes protéiques numérotées de HNF4 $\alpha$ 1 à HNF4 $\alpha$ 9 (Tanaka *et al.*, 2006). Le promoteur P1 permet la transcription des isoformes  $\alpha$ 1- $\alpha$ 6, tandis que le promoteur P2 initie la transcription d'ARNm codant pour les isoformes  $\alpha$ 7- $\alpha$ 9.

### 2.2.2. Structure protéique de HNF4 $\alpha$

Les isoformes de HNF4 $\alpha$  possèdent six domaines, appelés respectivement domaines de transactivation ligand-indépendant (A/B), domaine de liaison à l'ADN (C), domaine charnière (D), domaine de liaison du ligand (E) et domaine F, similaires à ceux observés habituellement chez les récepteurs nucléaires de type stéroïdien (figure 8a) (Sladek *et al.*, 1990; Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1997). Les neuf isoformes de HNF4 $\alpha$  sont fortement homologues et diffèrent généralement par leurs extrémités, suite à l'insertion d'une séquence de 30 aa du côté N-terminal ou de 10 aa du côté C-terminal (figure 8b) (Tanaka *et al.*, 2006).

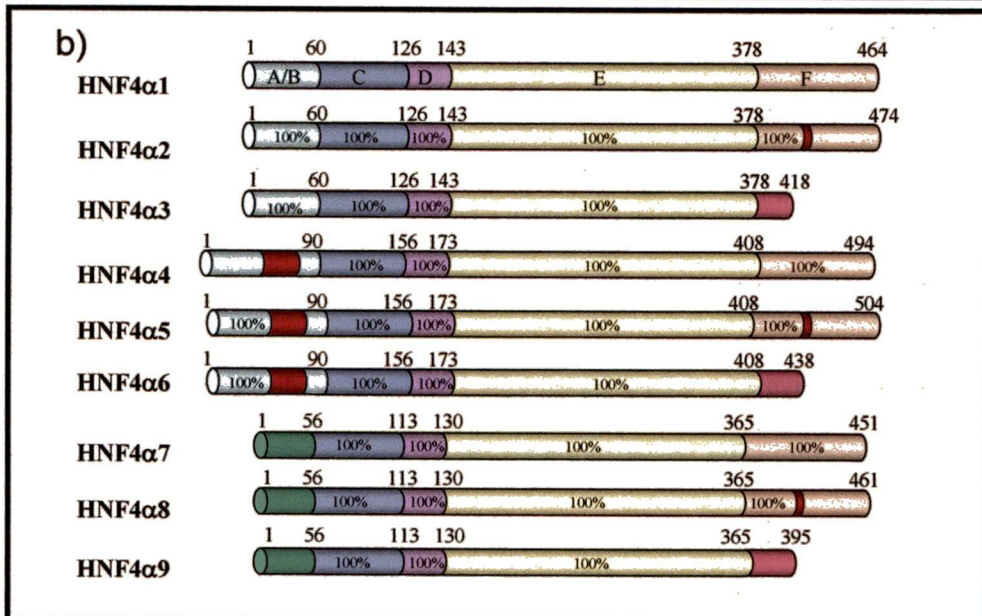
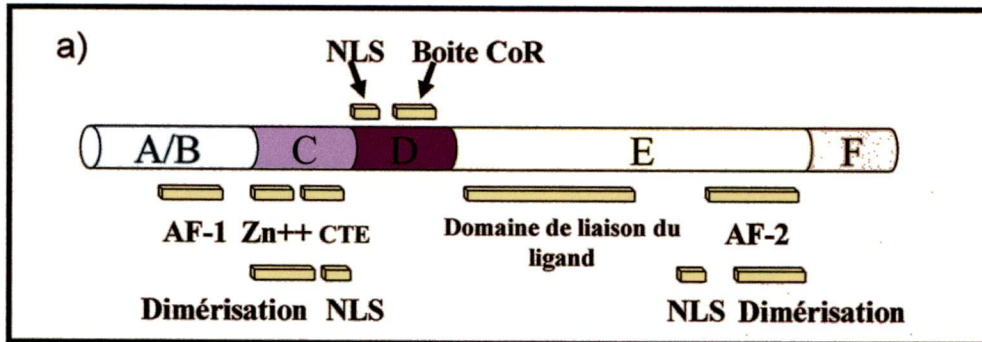
#### 2.2.2.1. Domaine modulateur (A/B)

Le domaine modulateur des récepteurs nucléaires intervient dans l'activation des récepteurs nucléaires et possède une activité variable suivant le contexte cellulaire

**Figure 8: Structure générale des récepteurs nucléaires et des isoformes de HNF4 $\alpha$**

**a)** Structure générale des récepteurs nucléaires de type stéroïdien. Les récepteurs nucléaires possèdent généralement 5 ou 6 domaines, avec un domaine de transactivation indépendant du ligand (A/B), un domaine de liaison de l'ADN (C), une région charnière (D) et un domaine de transactivation dépendant du ligand (E) qui intervient aussi dans la liaison du ligand. Le rôle du domaine est généralement mal connu. **b)** Structure des isoformes de HNF4 $\alpha$ . Tel que spécifié précédemment, les isoformes de HNF4 $\alpha$  varient essentiellement au niveau de leurs extrémités N- et C-terminales.

AF-1 : facteur d'activation transcriptionnelle indépendant du ligand; AF-2 : facteur d'activation transcriptionnelle dépendant du ligand; boîte CoR : séquence de liaison de corépresseurs ; CTE : extension carboxy-terminale ; NLS : signal de localisation nucléaire ; Zn<sup>2+</sup> : domaine de liaison à l'ADN, structure en doigts de zinc. Domaine A/B : domaine d'activation indépendant du ligand; Domaine C : domaine de liaison à l'ADN ; Domaine D : région charnière ; domaine E : domaine de transactivation dépendant du ligand, domaine F : domaine carboxy-terminal.



comme cela a été observé pour le récepteur aux œstrogènes ou le récepteur à la progestérone (Tzukerman *et al.*, 1994; Dowhan et Muscat, 1996). Situé à l'extrémité N-terminale, ce domaine modulateur, aussi appelé domaine A/B ou domaine de transactivation indépendant du ligand, est le domaine qui présente le plus de variabilité chez les récepteurs nucléaires, que ce soit par la taille ou par la séquence. Le domaine A/B contient généralement un facteur d'activation transcriptionnelle appelé AF-1 qui possède une activité constitutive active ou indépendante du ligand via le recrutement de co-activateurs (Nagpal *et al.*, 1993; Dowhan et Muscat, 1996; Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1997). Le domaine AF-1 des protéines HNF4 $\alpha$  mesure 24 aa et est actif par le biais de ses acides aminés de type acide (Green *et al.*, 1998; Kistanova *et al.*, 2001). Chez HNF4 $\alpha$ , les isoformes HNF4 $\alpha$ 7 à HNF4 $\alpha$ 9 possèdent un domaine A/B tronqué avec un domaine AF-1 incomplet, ce qui entraîne une diminution de la capacité de transactivation de ces isoformes (Torres-Padilla *et al.*, 2002).

#### 2.2.2.2. Domaine de liaison à l'ADN (C)

Le domaine C, ou domaine de liaison à l'ADN, possède la séquence la mieux conservée chez les récepteurs nucléaires stéroïdiens/thyroïdiens (Krust *et al.*, 1986). Ce domaine est caractérisé par la présence de deux motifs en doigts de zinc, suivis d'une extension carboxy-terminale qui permet la reconnaissance sur l'ADN d'éléments de liaison spécifiques à chaque récepteur (Glass, 1994; Zhao *et al.*, 1998; Melvin *et al.*, 2004). Au niveau du deuxième doigt de zinc une courte



séquence forme une interface de dimérisation entre les domaines de liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires (Umesono et Evans, 1989). Bien que possédant une structure caractéristique des récepteurs nucléaires, le domaine de liaison à l'ADN de HNF4 $\alpha$  possède une boîte P unique qui n'est pas retrouvée parmi les trois autres classes de récepteurs nucléaires (Sladek *et al.*, 1990; Jiang *et al.*, 1995). De façon spécifique, le domaine de dimérisation des protéines HNF4 $\alpha$  n'intervient que dans la formation d'homodimères et ne permet pas la liaison avec des protéines adaptatrices tel que RXR, comme cela a été généralement observé chez les autres récepteurs nucléaires (Jiang *et al.*, 1995).

#### 2.2.2.3. Domaine charnière (D)

Le domaine D, aussi appelée région charnière, possède la séquence la moins conservée des récepteurs nucléaires et son rôle est encore mal défini. Toutefois, plusieurs études ont démontré que cette région peut intervenir dans différents mécanismes, tels que la localisation intracellulaire, le recrutement de coactivateurs, la dimérisation ou la liaison de récepteurs nucléaires sur l'ADN (Michigami *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2001; Bu *et al.*, 2004). Récemment, Iordanidou *et al.* (2005) ont démontré que la région charnière de HNF4 $\alpha$  participait au recrutement de coactivateurs, notamment PGC-1. Chez HNF4 $\alpha$ , le domaine D, qui est très conservé parmi les différentes isoformes, est important pour l'activité du facteur d'activation AF-2 localisé dans le domaine de liaison du ligand (Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1997).

#### 2.2.2.4. Domaine de liaison du ligand (E)

Le domaine E, ou domaine de liaison du ligand, possède une poche profonde qui permet la liaison de ligands lipophiles, même si l'identité du ou des ligands de HNF4 $\alpha$  est encore sujette à controverse (Hertz *et al.*, 1998; Wisely *et al.*, 2002; Iordanidou *et al.*, 2005). La taille et la forme de cette poche, variables suivant les membres de la famille des récepteurs nucléaires, définissent la spécificité et l'affinité de liaison du ligand (Benoit *et al.*, 2004). Ce domaine joue aussi un rôle dans la dimérisation des récepteurs nucléaires, dans le recrutement de cofacteurs et possède un facteur de transactivation AF-2 (Eeckhoute *et al.*, 2003b). Le domaine de transactivation AF-2 possède généralement une activité dépendante du ligand (Warnmark *et al.*, 2003). Chez HNF4 $\alpha$ , le domaine AF-2 possède une taille très importante (238 aa) et présente une structure très complexe comparativement aux autres récepteurs nucléaires (Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1997). Le domaine E de HNF4 $\alpha$  participe activement dans la formation des homodimères et pourrait aussi probablement contenir une séquence qui inhibe la formation d'hétérodimères avec les protéines RXR (Bogan *et al.*, 2000; Eeckhoute *et al.*, 2003b).

#### 2.2.2.5. Domaine C-terminal (F)

Le domaine F, ou domaine carboxy-terminal, possède une présence variable chez les récepteurs nucléaires et n'est observé que chez quelques récepteurs nucléaires.

Le domaine F permettrait une discrimination dans le recrutement des co-activateurs, comme cela a été observé pour HNF4 $\alpha$ 1 et les récepteurs à l'œstrogène (Warnmark *et al.*, 2001; Ruse Jr *et al.*, 2002). Spécifiquement, chez HNF4 $\alpha$ , le domaine F aurait un rôle inhibiteur lors du recrutement de co-activateurs sur le domaine de liaison du ligand (Sladek *et al.*, 1999).

### 2.3. Expression et localisation de HNF4 $\alpha$

La protéine HNF4 $\alpha$  est majoritairement exprimée au niveau de l'intestin, de l'estomac, du pancréas, du foie et du rein (Tableau 1) (Jiang *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2006). Au niveau de l'épithélium intestinal, plusieurs études ont montré que la protéine HNF4 $\alpha$  était exprimée dans tous les types cellulaires, aussi bien au niveau de la crypte que de la villosité dans l'intestin grêle (Sauvaget *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2003; Garrison *et al.*, 2006). Dans tous les cas, la protéine est observée exclusivement dans le noyau (Jiang *et al.*, 2003).

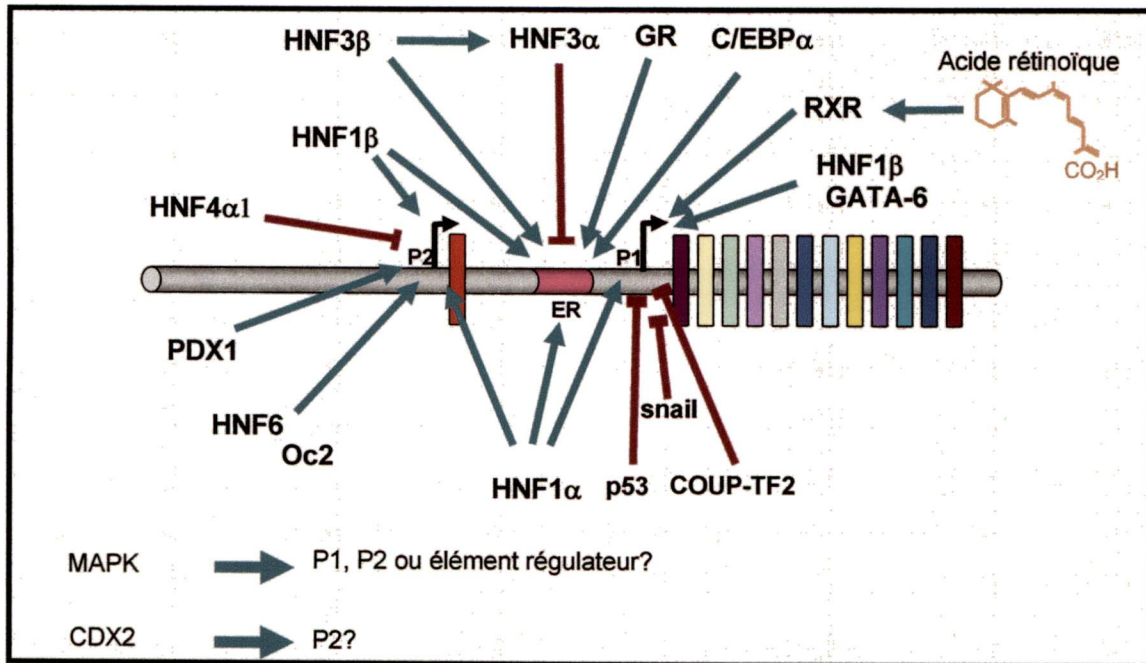
### 2.4. Régulation de l'expression de HNF4 $\alpha$

Plusieurs voies de régulation de l'expression du gène HNF4 $\alpha$  ont été mises en évidence (figure 9). La régulation de ce gène se fait principalement via les promoteurs P1 et P2 ou par le biais d'un élément régulateur (ER) situé six kilobases avant le promoteur P1 (figure 9).

## Tableau 1 : Expression de HNF4 $\alpha$ dans l'organisme

Distribution des différentes isoformes de HNF4 $\alpha$  dans l'organisme tel qu'ont pu l'observer l'équipe de Tanaka et de ses collaborateurs. Tiré de Tanaka *et al.* (2006).

	HNF4 $\alpha$	HNF4 $\alpha$ 1-6	HNF4 $\alpha$ 7-9
<b>Cerveau</b>	-	-	-
<b>Epiderme</b>	-	-	-
<b>Rein</b>			
Glomérule	-	-	-
Tubule proximal	+	+	-
Boucle de Henlé	-	-	-
Tubule distal	-	-	-
Tubule collecteur	-	-	-
Epithélium de transition	-	-	-
<b>Foie</b>			
Hépatocyte	+	+	-
Cellules lignée sinusoidale	-	-	-
Canal biliaire	-	-	+
Cellule Kupffer	-	-	-
<b>Pancréas</b>			
Cellules centroacineuses	+	-	+
Cellules acineuses	+	-	+
Canaux pancréatiques	+	-	+
Ilots de Langerhans	+	-	+
<b>Coeur</b>	-	-	-
<b>Tissu adipeux blanc</b>	-	-	-
<b>Rate</b>	-	-	-
<b>Oesophage</b>	-	-	-
<b>Estomac</b>			
Cellules fovéolaires	+	-	+
Cellules pariétales	-	-	-
Cellules chef	-	-	-
<b>Intestin grêle</b>			
Cellules épithéliales absorbantes	+	+	+
Cellules en gobelet	+	+	+
Cellules de Paneth	+	+	+
<b>Colon</b>			
Cellules épithéliales absorbantes	+	+	+
Cellules en gobelet	+	+	+
<b>Vessie</b>	-	-	-
<b>Testicules</b>			
Tubes séminifères	-	-	-
Cellules Leydig	-	-	-
Cellules de Sertoli	-	-	-
<b>Epididyme</b>			
Canal efférent	+	+	+
Canal de l'épididyme	-	-	-
<b>Ovaires</b>	-	-	-
<b>Glandes adrénégiques</b>	-	-	-
<b>Utérus</b>			
Endothélium	-	-	-
Cervix	-	-	-
<b>Thyroïde</b>	-	-	-
<b>Thymus</b>	-	-	-
<b>Trachée</b>	-	-	-
<b>Poumons</b>	-	-	-
<b>Glandes salivaires</b>	-	-	-
<b>Langue</b>	-	-	-
<b>Glandes mammaires</b>	-	-	-
<b>Placenta</b>	-	-	-
<b>Prostate</b>	-	-	-
<b>Muscle squelettique</b>	-	-	-
<b>Muscle lisse</b>	-	-	-



**Figure 9 : Voies d'activation ou de répression du gène HNF4α.**

Schéma récapitulatif des différentes voies de régulation de l'expression du gène HNF4α via ses différents promoteurs. P1 : promoteur 1 ; P2 : promoteur 2 ; ER : élément régulateur ; GR : récepteur aux glucocorticoïdes.

—: Répression  
 → : Activation

#### 2.4.1. Induction de l'expression du gène HNF4 $\alpha$ par les facteurs HNF

HNF1 $\alpha$  est la protéine régulatrice la mieux connue de HNF4 $\alpha$ . Cette protéine permet une activation de l'expression de HNF4 $\alpha$  via les promoteurs P1, P2 ou via l'ER, tel que mis en évidence dans les cellules  $\beta$  du pancréas ou dans le foie (Bailly *et al.*, 2001; Hatzis et Talianidis, 2001; Hansen *et al.*, 2002; Briançon *et al.*, 2004). Cette voie est particulièrement étudiée en raison de son importance dans les cas de diabète de type MODY (voir plus loin). De son côté, la protéine HNF1 $\beta$  contrôle faiblement l'expression de HNF4 $\alpha$ 1 en l'induisant lors du développement hépatique via l'ER (Bailly *et al.*, 2001; Hatzis et Talianidis, 2001). Toutefois, l'absence d'expression de HNF1 $\beta$  chez les souris HNF1 $\beta$ <sup>-/-</sup> empêche l'activation du gène HNF4 $\alpha$  lors du développement précoce de l'endoderme viscéral, ce qui suggère que HNF1 $\beta$  possède tout de même un rôle majeur dans la régulation de l'expression du gène codant pour HNF4 $\alpha$  (Coffinier *et al.*, 1999). L'effet majeur de HNF1 $\beta$  semble provenir de sa capacité d'agir en synergie avec le facteur GATA6, une combinaison de ces deux facteurs entraînant une forte expression du gène HNF4 $\alpha$  (Hatzis et Talianidis, 2001).

Parallèlement à la régulation de HNF4 $\alpha$  par les facteurs HNF1, Duncan *et al.* (1998) ont observé un réseau complexe de régulation de l'expression de HNF4 $\alpha$  par les protéines HNF3 $\alpha$  et HNF3 $\beta$  dans des cellules souches embryonnaires.

Brièvement, la protéine HNF3 $\beta$  régule de façon positive l'expression des protéines HNF3 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$  tandis que la protéine HNF3 $\alpha$  réprime l'expression de HNF4 $\alpha$  et HNF1 $\alpha$ . HNF3 $\beta$  peut de plus induire l'expression de HNF3 $\alpha$  (Duncan *et al.*, 1998). Briançon *et al.* (2004) ont finalement mis en évidence un mécanisme de stimulation du gène HNF4 $\alpha$  par la protéine HNF6. L'élément de réponse spécifique lié par HNF6 est aussi lié par la protéine Oc2 de la famille des oncut et permet une activation spécifique du promoteur P2 (Briançon *et al.*, 2004). Les protéines HNF1 $\alpha$  et HNF6 peuvent agir en synergie ou de façon additionnelle suivant le promoteur (Hatzis et Talianidis, 2001; Briançon *et al.*, 2004).

#### 2.4.2. Autorégulation par HNF4 $\alpha$ 1

La protéine HNF4 $\alpha$ 1 peut autoréguler son expression de façon sélective en réprimant l'expression des isoformes issues du promoteur P2 dans le foie adulte, favorisant ainsi l'expression des isoformes issues du promoteur P1 (Briançon *et al.*, 2004). Le mécanisme de répression du gène HNF4 $\alpha$  par HNF4 $\alpha$ 1 est encore obscur et favorise l'expression d'isoformes ayant une plus forte capacité d'activation transcriptionnelle.

#### 2.4.3. Inhibition de l'expression de HNF4 $\alpha$ par les récepteurs RXR, GR et COUP-TFII

Plusieurs études ont mis en évidence un mécanisme de régulation de l'expression de HNF4 $\alpha$  par l'acide rétinoïque via ses récepteurs (Qian *et al.*, 2000; Hatzis et Talianidis, 2001). L'ajout d'acide rétinoïque induit l'expression du gène HNF4 $\alpha$  dans les lignées hépatiques HepG2 et Hep3B. Toutefois, Hatzis et Talianidis (2001) ont observé que cette stimulation induisait une réponse rapide et brève. De son côté, la protéine COUP-TFII inhibe l'expression de la protéine HNF4 $\alpha$  en agissant directement sur le promoteur P1, sur un élément de réponse chevauchant celui des récepteurs RXR $\alpha$  (Hatzis et Talianidis, 2001). Finalement, Bailly *et al.* (2001) ont observé que les récepteurs aux glucocorticoïdes induisaient l'expression du gène HNF4 $\alpha$  dans différentes cellules hépatiques en se liant sur l'ER.

#### 2.4.4. Régulation par les facteurs Gata6, Pdx1, Cdx2, C/EBP $\alpha$ et les MAPkinases

Morrisey *et al.* (1998) ont montré que la protéine GATA6 contrôlait l'expression du gène HNF4 $\alpha$  lors de la différenciation de l'endoderme viscéral via l'ER tandis que Thomas *et al.* (2001) ont observé que les facteurs Cdx2 et Pdx1 (IPF1) peuvent induire l'expression du gène HNF4 $\alpha$  dans les cellules pancréatiques en se liant sur le promoteur P2. Toutefois, des études par mutagenèse dirigée n'ont pas permis d'identifier l'élément de liaison de Cdx2 sur le promoteur P2, ce qui laisse supposer une régulation indirecte de HNF4 $\alpha$  par la protéine Cdx2 (Thomas *et al.*, 2001). La protéine C/EBP $\alpha$  quant à elle peut induire l'expression de HNF4 $\alpha$  via



l'ER (Bailly *et al.*, 2001). Finalement, les protéines ERK1/2 de la famille des Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) peuvent réprimer l'expression du gène codant pour HNF4 $\alpha$  dans les cellules hépatiques (Reddy *et al.*, 1999). Le mécanisme de régulation de HNF4 $\alpha$  par ERK1/2 n'a pas encore été déterminé.

## 2.5. HNF4 $\alpha$ et ses ligands

Comme tous les récepteurs de type stéroïdien, HNF4 $\alpha$  possède un domaine de liaison de ligand de structure classique (domaine E ; figure 8) (Sladek *et al.*, 1990). L'activité des récepteurs nucléaires est généralement régulée par la liaison ou non de ligands. Toutefois, la possibilité d'une régulation de HNF4 $\alpha$  par un ligand fait encore débat.

Hertz *et al.* (1998, 2003, 2005) ont observé une modulation de l'activité de HNF4 $\alpha$  par des acides gras insaturés de type C16:0 (activation) ou C18:0 (répression) sous la forme d'esters liés à la coenzyme A. Cette équipe a de plus montré qu'il était possible d'utiliser ces ligands dans un but thérapeutique (Hertz *et al.*, 2003). De façon diamétralement opposée, Wisely *et al.* (2002) ont démontré que les protéines HNF4 $\alpha$  liaient de façon constitutive des acides gras, probablement lors de la formation des structures tertiaire et quaternaire de la protéine. Ces acides gras seraient de plus indissociables de la protéine. Plusieurs équipes de chercheurs suggèrent que la protéine HNF4 $\alpha$  est constitutivement active et que sa régulation ne se fait pas au niveau de la liaison du ligand (Bogan *et*

*al.*, 2000; Ruse Jr *et al.*, 2002; Wisely *et al.*, 2002; Sladek, 2002). Cette controverse fait que HNF4 $\alpha$  est encore fréquemment considéré comme un récepteur nucléaire orphelin.

## 2.6. Régulation de l'activité transcriptionnelle de HNF4 $\alpha$

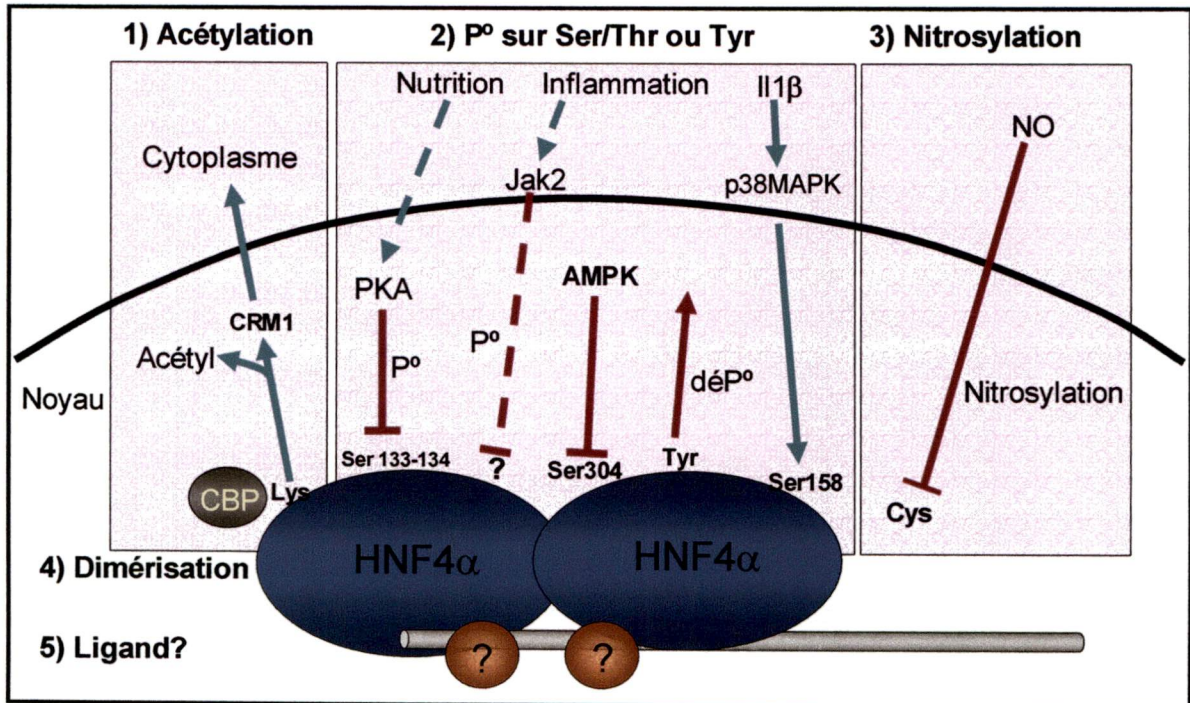
Indépendamment de l'identification d'un ligand pour HNF4 $\alpha$ , plusieurs études ont montré que l'activité transcriptionnelle de cette protéine pouvait être modulée par plusieurs mécanismes, tels que l'acétylation, la phosphorylation, la nitrosylation ou la liaison de cofacteurs (figure 10).

### 2.6.1. Régulation par dimérisation

Contrairement à la majorité des récepteurs nucléaires de type stéroïdiens qui forment régulièrement des hétérodimères avec les protéines RXR, la protéine HNF4 $\alpha$  ne se lie à l'ADN que sous la forme d'homodimères (Jiang *et al.*, 1995).

### 2.6.2. Régulation par acétylation

Soutoglou *et al.* (2000) ont tout d'abord montré que l'acétylation de lysines avait un rôle essentiel dans la localisation intranucléaire de la protéine HNF4 $\alpha$ .



**Figure 10 : Voies d'activation ou de répression de la protéine HNF4 $\alpha$**

L'activité des protéines HNF4 $\alpha$  peut être régulée de cinq façons principales. 1) L'état d'acétylation de HNF4 $\alpha$  détermine tout d'abord sa localisation intracellulaire et par conséquent son activité. Une désacétylation de HNF4 $\alpha$  induit un transfert actif du noyau vers le cytoplasme. 2) La modification de l'état de phosphorylation sur Serine/Thréonine ou tyrosine de HNF4 $\alpha$ , par l'AMPK ou lors des phénomènes induits lors de l'inflammation ou de la nutrition, va généralement induire une baisse de son activité. De façon exceptionnelle, la phosphorylation de HNF4 $\alpha$  sur la sérine 158 par la p38 MAPK va induire une induction de sa capacité de transactivation. L'absence de phosphorylation sur tyrosine va induire un changement de localisation intranucléaire et une baisse d'activité de transactivation de HNF4 $\alpha$ . 3) La nitrosylation des cystéines localisées au niveau du domaine de liaison à l'ADN de HNF4 $\alpha$  va quant à elle induire une déstabilisation du complexe ADN-HNF4 $\alpha$  et une diminution de sa capacité de transactivation. 4) Afin d'être transcriptionnellement actif, les protéines HNF4 $\alpha$  doivent agir sous forme d'homodimères uniquement, ce qui est unique parmi les récepteurs nucléaires de type stéroïdien. 5) Des incertitudes demeurent sur la régulation de l'activité de HNF4 $\alpha$ 1 par liaison d'un ligand.

P° : phosphorylation ; déP° : déphosphorylation.

- | : Répression
- -| : Répression indirecte
- > : Activation
- > : Migration du noyau vers le cytoplasme.

L'acétylation par la protéine CBP de lysines au niveau du signal de localisation nucléaire situé dans le domaine de liaison à l'ADN de HNF4 $\alpha$  empêcherait la sortie active du noyau via la voie CRM1 (Soutoglou *et al.*, 2000). Plus récemment, Maeda *et al.* (2002) ont rapporté que la protéine p53 se lie à la protéine HNF4 $\alpha$  et induit le recrutement de désacétylase de type HDAC, menant à une diminution de son activité transcriptionnelle.

### 2.6.3. Régulation par phosphorylation

Actuellement, deux types de phosphorylation ont été observés pour cette protéine, sur tyrosine ou sur sérine/thréonine. Lors de la déphosphorylation des tyrosines suite à un traitement à la génistéine, un inhibiteur des tyrosines kinases, Ktistaski *et al.* (1995) ont observé que HNF4 $\alpha$  possédait une localisation plus diffuse dans le noyau parallèlement à une baisse d'activité transcriptionnelle. La phosphorylation sur tyrosine influencerait donc la capacité de HNF4 $\alpha$  à lier l'ADN dans des zones transcriptionnellement actives.

Plusieurs études indépendantes ont prouvé que les phosphorylations sur les résidus sérine et thréonine avaient une place importante dans la régulation de l'activité de HNF4 $\alpha$ . Ainsi, HNF4 $\alpha$  est phosphorylée par la protéine PKA au niveau du domaine de liaison à l'ADN sur les sérines 133 et 134 suite à une induction par le glucagon ou lors de stimuli nutritionnels (Viollet *et al.*, 1997; You *et al.*, 2002; Song et Chiang, 2006). De la même façon, la protéine AMPK, protéine clé dans le

contrôle du métabolisme cellulaire, phosphoryle HNF4 $\alpha$  sur la sérine 304 au niveau du domaine de liaison du ligand (Leclerc *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2003). Dans tous ces cas, une phosphorylation sur sérine ou thréonine induit une déstabilisation de l'homodimère HNF4 $\alpha$  et une baisse de la capacité de transactivation.

Parallèlement, plusieurs études ont montré que la protéine HNF4 $\alpha$  était phosphorylée lors de processus inflammatoires, même si les résultats observés peuvent sembler contradictoires. Wang *et al.* (2001) ont tout d'abord montré que des traitements au LPS ou à l'IL-1 $\beta$  induisent une dégradation de HNF4 $\alpha$  dans le protéasome. Li *et al.* (2002) ont de leur côté observé que, lors de phénomènes inflammatoires ou de stress, l'IL-1 $\beta$  induisait une phosphorylation de HNF4 $\alpha$  sur des résidus indéterminés via un mécanisme impliquant la protéine Jak2, ce qui conduit à une baisse d'activité transcriptionnelle. Finalement, de façon surprenante, Guo *et al.* (2006) ont récemment observé que lors de traitement d'hépatocytes de rat à l'IL-1 $\beta$ , HNF4 $\alpha$  était phosphorylée sur la sérine 158 via la voie de la MAPK p38. Cette phosphorylation induirait une augmentation de la capacité de transactivation de HNF4 $\alpha$  sur le promoteur du gène iNOS.

#### 2.6.4. Régulation par nitrosylation

Lucas *et al.* (2004) ont observé que, lors de traitements à l'oxyde nitrique (NO), la protéine HNF4 $\alpha$  avait une moins bonne capacité de transactivation. Le NO

induirait une nitrosylation au niveau des cystéines présentes dans le domaine de liaison à l'ADN, conduisant à une déstabilisation du complexe HNF4 $\alpha$ -ADN.

#### 2.6.5. Régulation par liaison de cofacteurs

En plus d'être régulée par le biais de modifications post-traductionnelles, l'activité de HNF4 $\alpha$  est modifiée par le recrutement de cofacteurs. Plusieurs groupes de chercheurs ont montré que ces cofacteurs ont un effet variable suivant les isoformes, chaque isoforme ayant une activité spécifique (Soutoglou *et al.*, 2000; Torres-Padilla *et al.*, 2002; Torres-Padilla et Weiss, 2003; Eeckhoute *et al.*, 2003a).

Les protéines HNF4 $\alpha$  se lient à des co-activateurs tels que les protéines Smad3, Grip-1, PGC-1, Src-1, Trip3 et CBP/p300 qui induisent une augmentation de l'activité transcriptionnelle (Wang *et al.*, 1998; Soutoglou *et al.*, 2000; Iwahashi *et al.*, 2002; Torres-Padilla *et al.*, 2002; Chou *et al.*, 2003; Rhee *et al.*, 2006). De la même façon, HNF4 $\alpha$  se lie à des co-répresseurs tels que les protéines SHP, SMRT, Prox1, SREBP-1 ou p53 qui modifient son activité transcriptionnelle directement ou par le biais du recrutement d'autres protéines (Maeda *et al.*, 2002; Torres-Padilla *et al.*, 2002; Shimamoto *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2006).

Le recrutement des co-régulateurs se fait par le biais des domaines AF-1, AF-2 et d'une partie de la région charnière qui permettent la formation de complexes (Torres-Padilla *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2004; Iordanidou *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006). De façon complémentaire, le domaine F permettrait de faire une sélection dans le recrutement des co-régulateurs grâce à un domaine riche en proline (Iyemere *et al.*, 1998; Suaud *et al.*, 1999; Ruse Jr *et al.*, 2002). La capacité de sélection du domaine F serait elle aussi variable suivant l'isoforme étudiée (Sladek *et al.*, 1999).

## 2.7. Rôles et fonctions de HNF4 $\alpha$

Les études menées sur la protéine HNF4 $\alpha$  ont mis en évidence une importante diversification des rôles de cette protéine dans les cellules. Les fonctions les mieux étudiées de HNF4 $\alpha$  sont son implication dans le métabolisme des lipides ou du glucose ainsi que dans la différenciation cellulaire (Hayhurst *et al.*, 2001; Watt *et al.*, 2003; Crestani *et al.*, 2004; Garrison *et al.*, 2006).

### 2.7.1. HNF4 $\alpha$ et le métabolisme lipidique

HNF4 $\alpha$  contrôle notamment l'expression de plusieurs apolipoprotéines impliquées dans le transport et le métabolisme des lipides ainsi que l'expression de la protéine MTP impliquée dans le contrôle de la synthèse des chylomicrons intestinaux ou l'expression du récepteur scavenger BI (SR-BI) qui permet la capture du

cholestérol dans le foie (Antes et Levy-Wilson, 2001; Kardassis *et al.*, 2002; Malerod *et al.*, 2003; Malik, 2003; Sheena *et al.*, 2005; Prieur *et al.*, 2005). Hayhurst *et al.* (2001) ont de plus montré chez la souris que l'inactivation spécifique de HNF4 $\alpha$  dans le foie perturbait le métabolisme lipidique hépatique et, de façon plus globale, entraînait de fortes perturbations des taux circulants de cholestérol et de triglycérides dans le sérum. De nombreuses autres cibles de HNF4 $\alpha$  impliquées dans le métabolisme lipidique ont aussi été identifiées dans la présente étude ( voir annexe 1).

#### 2.7.2. HNF4 $\alpha$ et le métabolisme du glucose

Parallèlement, plusieurs études ont mis en évidence l'importance de HNF4 $\alpha$  dans la régulation du métabolisme du glucose. Ainsi, HNF4 $\alpha$  peut moduler l'expression de la glucose-6-phosphatase, de la glucokinase, de l'insuline et de la protéine Kir6.2 (Bartoov-Shifman *et al.*, 2002; Massillon *et al.*, 2003; Roth *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2005). Miura *et al.* (2006) ont observé que l'inactivation spécifique de HNF4 $\alpha$  dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas suffisait à désorganiser la sécrétion d'insuline tandis qu'Oyadomari *et al.* (2000) ont observé que l'expression de HNF4 $\alpha$  pouvait être activée par le glucagon et réprimée par l'insuline. Ces études ainsi que l'implication de la protéine HNF4 $\alpha$  dans les diabètes de type MODY1 laissent supposer un rôle central de HNF4 $\alpha$  dans la régulation du glucose.



### 2.7.3. HNF4 $\alpha$ et la différenciation cellulaire

Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de la protéine HNF4 $\alpha$  dans des processus de différenciation et d'adhésion cellulaire. Notamment, la protéine HNF4 $\alpha$  semble indispensable pour l'organogenèse du côlon et du foie tandis qu'une invalidation spécifique de son expression conduit à une absence de développement de l'endoderme viscéral (Hakoda *et al.*, 2003; Parviz *et al.*, 2003; Garrison *et al.*, 2006). Toutefois, HNF4 $\alpha$  n'interviendrait pas lors de la détermination hépatique et ne serait indispensable que pour la phase de différenciation (Li *et al.*, 2000). De façon complémentaire, plusieurs équipes de chercheurs ont mis en évidence la capacité de HNF4 $\alpha$  d'inhiber la prolifération cellulaire et d'avoir un rôle clé dans la mise en place des jonctions serrées des cellules F9 ou HEK293T (Chiba *et al.*, 2003; Chiba *et al.*, 2005; Lucas *et al.*, 2005; Satohisa *et al.*, 2005).

### 2.7.4. Autres fonctions de la protéine HNF4 $\alpha$

On sait aussi que la protéine HNF4 $\alpha$  intervient dans de nombreux autres mécanismes cellulaires, tels que le métabolisme des acides aminés, la prolifération cellulaire (régulation directe de la protéine p21), la réponse inflammatoire (régulation de la protéine iNOS notamment) et la régulation de transporteurs tels que des canaux ioniques (Dusing *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2002; Popowski *et al.*, 2005). D'un point de vue plus physiologique, HNF4 $\alpha$  régule aussi

des protéines importantes pour la coagulation sanguine (Reijnen *et al.*, 1992; Wilberding et Castellino, 2000; Tarumi *et al.*, 2002) ou la morphogenèse du foie ou de l'intestin comme l'ont montré plusieurs études par inactivation du gène codant pour HNF4 $\alpha$  (tableau 2) (Garrison *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2006). La diversification des rôles de HNF4 $\alpha$  se retrouve aussi dans la diversification et le nombre important de gènes régulés directement par HNF4 $\alpha$  (Annexe 1).

#### 2.7.5. Fonctions de HNF4 $\alpha$ dans l'intestin

Peu d'études ont porté sur le rôle de HNF4 $\alpha$  au niveau de l'intestin, la plupart d'entre elles ayant pris des cellules de pancréas ou de foie comme modèle. Toutefois, quelques résultats ont permis de préciser le rôle de HNF4 $\alpha$  dans l'intestin. Garrison *et al.* (2006) ont récemment observé que HNF4 $\alpha$  était une protéine essentielle dans le développement embryonnaire du côlon. De la même façon, Olsen *et al.* (2005) ont rapporté que HNF4 $\alpha$  régulait l'expression de la phosphatase alcaline humaine, souvent utilisée comme marqueur de différenciation intestinale, dans les cellules intestinales Caco-2/15, et ce de façon proportionnelle à l'état de différenciation des cellules. La protéine HNF4 $\alpha$  peut de plus réguler l'expression des apolipoprotéines AI (ApoAI), AIV (ApoAIV), B (ApoB) ainsi que de l' $\alpha$ 1-antitrypsine ( $\alpha$ 1-AT) et la guanylyl cyclase C dans les cellules intestinales (Ginsburg *et al.*, 1995; Hu et Perlmutter, 1999; Swenson *et al.*, 1999; Antes et Levy-Wilson, 2001; Peignon *et al.*, 2006).

**Tableau 2 : Effets de l'inactivation de HNF4 $\alpha$  dans différents modèles**

<b>Etude</b>	<b>Inactivation</b>	<b>Modèle</b>	<b>Effets</b>	<b>Survie</b>
Garrison <i>et al.</i> (2006)	Cre/Lox	Cellules épithéliales de colon foetal	- Blocage de la gastrulation - Absence de crypte dans le colon - Baisse du nombre de cellules à mucus	Mutation létale
Miura <i>et al.</i> (2006)	Cre/Lox	Cellules $\beta$ du pancréas de souris	- Diminution de la sécrétion insuline - Perturbation du métabolisme glucidique	Mutation viable
Gupta <i>et al.</i> (2005)	Cre/Lox	Cellules $\beta$ du pancréas de souris	- Hyperinsulinémie - Perturbation du métabolisme glucidique - Régulation canal potassique	Mutation viable
Parviz <i>et al.</i> (2003)	Cre/Lox	Hépatocytes de souris	- Modification de la structure du foie - Lésions hépatiques - Perte des contacts cellulaires	Mutation létale
Hayhurst <i>et al.</i> (2001)	Cre/Lox	Hépatocytes de souris	- Accumulation de lipides dans le foie - Baisse des taux circulants de cholestérol et de triglycérides dans le sang - Augmentation du taux circulant d'acides biliaires dans le sang	Mutation viable
Duncan <i>et al.</i> (1997)	mutation	Cellules embryonnaires	- Blocage de la différenciation en cellules de l'endoderme viscéral.	-
Chen <i>et al.</i> (1994)	Recombinaison homologue	Cellules souches embryonnaires de souris	- Blocage de la gastrulation - Augmentation de la mort cellulaire des cellules ectodermiques	Mutation létale

## 2.8. Pathologies impliquant HNF4 $\alpha$

A l'heure actuelle, deux pathologies sont directement reliées à HNF4 $\alpha$ . Reijnen *et al.* (1992, 1993) ont été les premiers à observer des mutations dans le promoteur du gène du facteur IX de coagulation lors de cas d'hémophilie de type B ou de Leyden. L'hémophilie de type B est caractérisée par une absence ou une forte diminution de l'expression du facteur IX de coagulation, ce qui entraîne des hémorragies prolongées plus ou moins sévères. Les mutations touchent particulièrement un élément de liaison de la protéine HNF4 $\alpha$ . Ces mutations bloquent la liaison de la protéine HNF4 $\alpha$  sur le promoteur du facteur IX, entraînant ainsi une baisse d'expression du facteur de coagulation.

Des mutations sur la protéine HNF4 $\alpha$  ont aussi été observées comme étant responsables du diabète juvénile de type 1 (MODY1; Maturity-Onset Diabete of the Young) (Gupta et Kaestner, 2004). Yamagata *et al.* (2006) ont pour la première fois observé que des mutations dans la séquence codant pour HNF4 $\alpha$  suffisaient pour induire des diabètes de type MODY1. Ces mutations bloquent généralement l'expression du gène HNF4 $\alpha$  (mutations sur le promoteur) ou la capacité de transactivation de la protéine, conduisant à une baisse de sécrétion de l'insuline (Lausen *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001). Récemment, Tanaka *et al.* (2006) ont observé que l'expression des isoformes de HNF4 $\alpha$  variait dans de nombreux cas de cancers. Plus spécifiquement, leurs résultats obtenus par immunohistochimie

montrent que l'équilibre d'expression entre les isoformes issues des promoteurs P1 et P2 est affectée dans les organes atteints de cancers (Tanaka *et al.*, 2006). Lazarevitch *et al.* (2004) ont de leur côté observé que HNF4 $\alpha$  n'est plus exprimé dans des carcinomes hépatiques agressifs tandis que des carcinomes faiblement prolifératifs possèdent encore une expression normale de HNF4 $\alpha$ . De plus, le fait de ré-exprimer HNF4 $\alpha$ 1 est suffisant pour inhiber la prolifération dans les cellules de carcinomes à fort taux de prolifération (Lazarevitch *et al.*, 2004). Toutefois, aucune étude n'a été en mesure de montrer que HNF4 $\alpha$  pouvait être un suppresseur de tumeurs.

## **Hypothèse de travail**

De par sa fonction centrale dans la digestion, de nombreuses études portent sur le système intestinal et particulièrement sur les voies métaboliques impliquées dans le transfert des nutriments de l'intestin vers la circulation sanguine ainsi que sur les mécanismes qui interviennent dans l'établissement de sa structure complexe, nécessaire à son bon fonctionnement.

Parallèlement, dans les cellules pancréatiques ou hépatiques, la protéine HNF4 $\alpha$  s'est imposée comme une protéine clef dans les processus de différenciation, du métabolisme cellulaire ainsi que dans l'établissement des jonctions cellulaires. De plus, plusieurs études ont mis en évidence un rôle probable de la protéine HNF4 $\alpha$  dans des phénomènes inflammatoires ou dans les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire.

Toutefois, peu d'études se sont intéressées au rôle de cette protéine au niveau de l'intestin. Ainsi, bien que l'épithélium intestinal soit un organe largement étudié tant au niveau de la différenciation cellulaire, de l'établissement des jonctions cellulaires que des phénomènes métaboliques impliqués dans l'absorption et le transfert des nutriments, et que la protéine HNF4 $\alpha$  ait été identifiée dans le foie et le pancréas comme étant une protéine clef dans ces mêmes mécanismes, le rôle de cette protéine dans l'épithélium intestinal est encore très mal défini.

Au vu des études effectuées dans le foie, nous avons posé l'hypothèse que la protéine HNF4 $\alpha$  pouvait avoir un rôle clé dans l'intestin. Nous avons décidé

d'éclaircir les rôles de HNF4 $\alpha$  dans l'intestin, en focalisant tout particulièrement sur son implication dans les phénomènes de différenciation intestinale, d'établissement des jonctions cellulaires ainsi que dans l'identification de nouvelles cibles, spécifiques à l'intestin.

## Matériel et méthodes

### 1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire intestinale épithéliale de rat IEC-6 (Quaroni *et al.*, 1978) et les lignées cellulaires IEC-6 infectées par les virus pBabePuro ou pBabePuro HNF4 $\alpha$ 1 ont été cultivées dans du milieu «Dulbecco's Modified Eagle's Medium» (DMEM) (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) complété avec 5% de sérum fœtal bovin inactivé par la chaleur (FBS) (Wisent, St-Bruno, QC, Canada), 2 mM de L-Glutamine (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) et 50 UI/50  $\mu$ g/ml de pénicilline/streptomycine (Wisent, St-Bruno, QC, Canada). La lignée cellulaire Caco-2/15 (J.-F. Beaulieu, Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada) issue d'un carcinome de côlon humain a été cultivée dans du milieu DMEM complété avec 10% de FBS, 2 mM de L-Glutamine et 50 UI/50  $\mu$ g/ml de pénicilline/streptomycine. Les cellules HEK293T (A. Nepveu, Université McGill, Montréal, QC, Canada) issues de cellules embryonnaires humaines de reins transformées ont été cultivées dans un milieu identique aux cellules Caco-2/15. Lorsque indiqué, les cellules ont été cultivées dans des plaques de culture dont le fond était recouvert de matrigel, fibronectine, collagène ou laminine (Becton-Dickinson, Bedford, MA, USA). Dans tous les cas, les cellules ont été cultivées dans une étuve à atmosphère humide présentant une température constante de 37°C dont l'atmosphère contrôlée contenait 5% de CO<sub>2</sub>.



## 2. Génération de la lignée cellulaire IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1

### 2.1. Clonage de HNF4 $\alpha$ 1

La séquence codant pour HNF4 $\alpha$ 1 (Sladek *et al.*, 1990) a initialement été clonée dans le vecteur pCMVscript (Stratagene, La Jolla, CA, USA) après amplification par réaction en chaîne du fragment à l'aide des amorces HNF4S : 5'-CAC CAT GGA CAT GGC TGA CTA C-3' et HNF4AS : 5'-GAT GGC TTC CTG CTT GGT GAT CG-3' ce qui a permis d'ajouter une séquence Kozak consensus (CCA CCA TG). La séquence a ensuite été vérifiée par séquençage et comparaison avec la séquence NM\_022180 (genbank) à l'aide de l'algorithme Blast2n (NCBI). Le gène codant pour HNF4 $\alpha$ 1 a ensuite été cloné dans le site *Sna*BI du vecteur rétroviral pBabePuro (Morgenstern et Land, 1990). Les vecteurs recombinants pBabePuroHNF4 $\alpha$ 1 ont ensuite été transformés dans des bactéries Top10 F' (Clontech, Mississauga, ON, Canada) et les clones positifs ont été identifiés à l'aide de l'enzyme *Pvu*I.

### 2.2. Préparation des rétrovirus

Les rétrovirus pBabePuroHNF4 $\alpha$ 1 ont été générés en co-transfectant le vecteur pBabePuroHNF4 $\alpha$ 1 avec un vecteur viral d'encapsulation pAmpho (A. Nepveu, Université McGill, QC, Canada) en présence de Lipofectamine2000 (Invitrogen

Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Une heure avant la transfection, le milieu de culture des cellules a été remplacé par 4 ml de milieu frais. La Lipofectamine2000 a été incubée 5 minutes à température ambiante à raison de 15 µl de lipofectamine2000 par 500 µl d'OptiMEM (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Le mélange contenant la construction plasmidique a été préparé parallèlement en ajoutant 3 µg des vecteurs à 500 µl d'OptiMEM. Les solutions de Lipofectamine2000 et des constructions plasmidiques ont ensuite été mélangées, incubées 20 minutes à température ambiante avant d'être ajoutés au milieu de culture. Les surnageants rétroviraux ont été récoltés deux jours après l'infection puis filtrés avec un filtre de 45 µm (Millipore, Bedford, MA, USA), avant d'être congelés à -80°C.

### 2.3. Infection des cellules IEC-6

La lignée IEC-6 HNF4α1 a été générée en infectant un pétri de 100 mm de cellules IEC-6 à 50% de confluence pendant huit heures avec 1,5 ml de surnageant rétroviral pBabePuroHNF4α1 en présence de 4 µg de polybrène/ml (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Le milieu de culture a ensuite été changé. Les cellules ont été divisées le lendemain et les populations cellulaires sélectionnées dans un milieu contenant 1,5 µg/ml de puromycine (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada).

### 3. Extraction des protéines et dosage

#### 3.1. Extraction des protéines nucléaires

Les protéines nucléaires ont été préparées tel que précédemment décrit par Desilets *et al.* (2000). Brièvement, des boîtes de culture de 100 mm ont été lavées deux fois avec du PBS 1X froid puis les cellules ont été grattées dans 1 ml de PBS 1X froid avant d'être récoltées dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 ml. Suite à une centrifugation de deux minutes à 3000 rpm, le culot de cellules a été re-suspendu dans 100 µl, pour les cellules IEC-6, ou 200 µl, pour les cellules Caco-2/15 ou HEK293T, de tampon de lyse (10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonate pH 7.9, 1 mM éthylènediamine disodium tetraacetate (EDTA), 60 mM KCl, 0,5% Nonidet P-40 (NP40), 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)) puis incubé cinq minutes sur glace. Suite à une centrifugation de 10 secondes à 13000 rpm, le culot contenant les noyaux a été resuspendu dans 200 µl de tampon de re-suspension des noyaux (0,25 M Tris-HCl pH 7.8, 0,06 M de KCl, 1 mM DTT et 1,5 mM PMSF) Le mélange de noyaux a ensuite été soumis trois fois au cycle de congélation/décongélation suivant : deux minutes dans l'azote liquide, deux minutes à 37°C suivi d'une agitation de cinq secondes à l'aide d'un vortex. Finalement, le mélange a été centrifugé 10 minutes à 13000 rpm et à 4°C. Les surnageants contenant les protéines nucléaires ont ensuite été transférés dans de nouveaux tubes puis immédiatement congelés à -80°C.

### 3.2. Extraction de protéines totales

Des pétris de 100 mm de cellules ont été lavés deux fois avec du PBS 1X froid avant que les cellules ne soient lysées dans 1 ml de tampon de lyse (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 40 mM  $\beta$ -glycérophosphate, 50 mM NaF, 200  $\mu$ M sodium orthovanadate, 5% glycérol, 0,5  $\mu$ g/ml aprotinine, 0,5  $\mu$ g/ml leupeptine, 0,7  $\mu$ g/ml pepstatin, 1 mM PMSF). Les cellules ont ensuite été grattées et récupérées dans des tubes eppendorf de 1,5 ml avant une incubation sur glace de 15 minutes. Les lysats ont ensuite été centrifugés cinq minutes à 13000 rpm et à 4°C avant que le surnageant ne soit transféré dans un nouveau tube avant d'être congelé immédiatement à -80°C. Dans le cas de cellules à 50% de confluence, trois pétris ont été regroupés avant l'ajout de 1 ml de tampon de lyse.

### 3.3. Dosage des protéines

Suite aux extractions, les concentrations en protéines des échantillons ont été dosées à l'aide de la technique de dosage de Bradford (BioRad Protein Assay Kit, Biorad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) et l'absorption lue à 595 nm.

## 4. Immunobuvardage

#### 4.1. Migration et transfert des protéines

Afin d'analyser l'expression des différentes protéines étudiées, 35 µg de protéines totales ont été séparées pendant 90 minutes à 150 volts sur des gels de type SDS-PAGE comprenant un gel de concentration 4% et un gel de séparation contenant 12% d'un mélange acrylamide/bis-acrylamide (19/1) (EMD Biosciences, San Diego, CA, USA), dans un tampon de migration standard (0,025 M Tris-HCl, 0,192 mM glycine, 1% SDS), dans un système Mini-protean 3 (Biorad, Mississauga, ON, Canada). Suite à cette migration, les protéines ont été transférées du gel d'acrylamide sur une membrane en PVDF (BioRad, Mississauga, ON, Canada) 2 heures à 50 V, dans un tampon de transfert standard (0.025 M Tris-HCl, 0,192 M glycine, 10% méthanol). Les membranes ont ensuite été bloquées 1 heure avant le marquage dans une solution TBS-Tween20 0,1% contenant 5% de lait en poudre écrémé. Les membranes en PVDF ont été équilibrées dans du méthanol puis rincées dans du tampon de migration préalablement à la migration.

#### 4.2. Marquage et révélation des immunobuvardages

Suite au blocage, les membranes ont été incubées durant la nuit à 4°C dans des solutions TBS-Tween20 0,1% contenant 5% de lait écrémé en poudre ainsi que les anticorps primaires spécifiques des protéines étudiées à des dilutions variables (tableau 3). Suite à ce premier marquage, les membranes ont été lavées trois fois cinq minutes dans une solution TBS-Tween20 1% avant d'être incubées 45

minutes à température pièce dans une solution TBS-Tween20 0,1% contenant un anticorps secondaire couplé à l'HRP spécifique de l'espèce de provenance du premier anticorps utilisé. Les membranes ont ensuite été lavées trois fois cinq minutes dans du TBS-Tween20 0,1% puis exposées dans la solution de révélation, ECL™ Western Blotting Detection Reagents, tel que décrit par le fabricant (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada).

## **5. Gels de rétention**

Les expériences de gel de rétention ont été effectuées tel que décrit par Désilets *et al.* (2000).

### **5.1. Préparation des sondes radiomarquées**

Des sondes d'oligonucléotides double brin portant des séquences de liaison spécifiques des facteurs de transcriptions étudiés ont été utilisées (tableau 4). Ces sondes ont été obtenues en hybridant 50 µg de deux oligonucléotides simple brin complémentaires avec un GG dépassant en 5' et 3', à une concentration de 0,5 µg/µl dans de l'eau chauffée à 95°C puis en laissant l'eau refroidir toute la nuit.

**Tableau 3: Liste des anticorps utilisés pour les immunobuvardages et immunofluorescences**

	Espèce	Dilution		Compagnie	Référence
		WB	IF		
Actine	souris	1/5000	-	Chemicon Int.	MAB1501R
$\beta$ -caténine	souris	-	1/100	BD Biosciences	#610153
Dlg-3	Chèvre	-	1/50	Santa Cruz Biotech.	sc-6925
E-cadhérine	souris	-	1/100	BD Biosciences	#610181
FXR $\alpha$	lapin	1/2000	-	Santa Cruz Biotech.	sc-13063
HNF4 $\alpha$	chèvre	1/250	1/200	Santa Cruz Biotech.	sc-6556
LXR $\alpha$	chèvre	1/200	-	Santa Cruz Biotech.	sc-1202
Occludine	lapin	-	1/200	Zymed	#71-1500
PPAR $\alpha$	chèvre	1/1000	-	Santa Cruz Biotech.	sc-1985
PPAR $\beta$	lapin	1/1500	-	Santa Cruz Biotech.	sc-7197
PPAR $\gamma$	lapin	1/1500	-	Santa Cruz Biotech.	sc-7196
Prkaa2	lapin	1/2000	-	Cell Signaling	#2532
Phospho-Prkaa2	lapin	1/1000	-	Cell Signaling	#2535
RAR $\beta$	chèvre	1/500	-	Santa Cruz Biotech.	sc-552
Zo-1	lapin	-	1/500	Zymed	#61-7300

**Tableau 4: Séquence des sondes utilisées pour les gels de rétention**

cibles	orientation	séquences
HNF4 $\alpha$	Sens	5'- GGC TCA GCT TGT ACT TTG GTA CAA CTA-3'
	antisens	5'- GGT AGT TGT ACC AAA GTA CAA GCT GAG-3'
FXR $\alpha$	Sens	5'- GGG TCC AAG GTC ACC GAT GGG ACA CCG-3'
	antisens	5'- GGC GGT GTC CCA TCG GTG ACC TTG GAC-3'
LXR $\alpha$	Sens	5'- GGG ATC CTT GAA CTT GAG TGA ACT AAG ATC-3'
	antisens	5'- GGG ATC TTA GTT CAC TCA AGT TCA AGG ATC-3'
PPRE	Sens	5'- GGT GAC CTT TGA CCT AGT TTT GC-3'
	antisens	5'- GGG CAA AAC TAG GTC AAA GGT CA-3'



Les oligonucléotides ont été marqués avec du [<sup>32</sup>P]dCTP (NEN PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada) en présence du fragment Klenow de l'ADN polymérase de *Escherichia coli* et de dATP, dCTP et dGTP froid (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada). Les sondes ont ensuite été diluées de façon à avoir une intensité radioactive d'environ 50 comptes par seconde (CPS).

## 5.2. Préparation des échantillons et migration

Les gels de polyacrylamide 4% contenant 5% de tampon Tris-borate (TBE) (45 mM Tris-borate pH 8.0, 40 mM acide borique, 0,1 mM EDTA) et 2% de glycérol ont subi une pré-migration de 30 minutes à 150 V. Pour chaque échantillon, le mélange suivant a été préparé puis incubé 30 minutes à température ambiante : 5 µg d'extraits nucléaires, 2 µl de tampon de réaction 10X (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, 10 mM EDTA, 50% glycérol), 0,25 µg de dIdC (Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) et 1 µl de sonde double brin radiomarquée diluée. Les échantillons ont ensuite été séparés sur les gels de polyacrylamide natifs durant 2 heures à 150 V. Le gel a ensuite été séché sur deux feuilles de papier Whatman avant d'être exposé pendant toute la nuit à -80°C avec un film Kodak Biomax MR (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada). Lorsque nécessaire, 1 µl d'anticorps concentré a été ajouté dans le mélange réactionnel afin de confirmer l'identité de la protéine créant le retard de migration.

## 6. Immunofluorescence

Les cellules ont été transférées dans des chambres de culture huit puits Lab-Tek II (Nalgen, Naperville, IL, USA) dans 500 µl de milieu de culture. Lors de l'arrivée à confluence des cellules, les cellules ont été lavées deux fois cinq minutes avec du PBS 1X puis fixées 10 minutes dans 800 µl de paraformaldéhyde 4%. Suite à deux nouveaux lavages dans du PBS 1X, les cellules ont été bloquées 10 minutes dans 800 µl d'une solution contenant 2 mg/ml de NaBH<sub>4</sub> puis lavées deux fois cinq minutes dans du PBS 1X avant d'être incubées 30 minutes dans 800 µl de solution de perméabilisation (Triton X-100 0,1%, BSA 1,4%, lait en poudre écrémé 5%). Après le retrait de la solution de perméabilisation puis deux lavages avec du PBS 1X, les lames ont été séchées à l'envers quelques secondes. Les cellules fixées ont ensuite été incubées durant la nuit à 4°C dans la solution de dilution des anticorps (1% lait écrémé en poudre, 1,4% BSA et Triton X-100 0,1%) contenant les anticorps spécifiques aux protéines étudiées aux dilutions indiquées (tableau 3). Suite à cette incubation, les lames ont été laissées cinq minutes à température ambiante puis lavées deux fois cinq minutes avec du PBS 1X, avant d'être incubées une heure dans 200 µl de la solution d'anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire utilisé (dilution 1/2000). Les lames ont suite été lavées deux fois cinq minutes avec du PBS 1X avant d'être séchées. Le filtre a ensuite été décollé et les lames ont été montées avec du milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada). Les lames ont été observées sur un microscope à contraste de phase Leica DMIRBE.

## 7. Microscopie électronique

La morphologie des cellules transformées a été observée aux microscopes électroniques à transmission (MET) et à balayage (MEB). Les cellules observées avec un MET ont été préparées comme décrit précédemment (Boucher *et al.*, 2005). Brièvement, les cellules ont été conservées en culture pendant 30 jours dans des pétris de 100 mm. Elles ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS 1X, préfixées 15 minutes dans une solution 1 :1 de milieu de culture DMEM et d'un tampon fraîchement préparé contenant 2,8% de glutaraldéhyde dilué dans un tampon cacodylate (0,1 M cacodylate, 7,5% sucrose), puis fixées 30 minutes à température ambiante dans une solution contenant 2,8% de glutaraldéhyde. Après deux lavages, les cellules ont été post-fixées durant 60 minutes dans un tampon cacodylate contenant 2% de tetroxyde d'osmium. Les échantillons ont ensuite été déshydratés dans des solutions de concentration croissante en éthanol (40, 70, 90, 95, 100%, 3 fois pour chaque dilution), puis recouverts deux fois trois heures d'une fine couche de résine d'araldite 502 (pour remplacer l'éthanol). La résine a ensuite été polymérisée 48 heures à 60°C. Les coupes minces ont été effectuées en utilisant un ultra-microtome LKB puis contrastées en utilisant du tampon citrate et de l'acétate d'uranyl. Les observations ont été effectuées grâce à un MET JEOL-100CX.

Concernant les observations au MEB, les cellules ont été cultivées sur des lamelles en verre stérile durant 30 jours puis fixées dans des solutions contenant 1,4% puis

2,5% de glutaraldéhyde dilué dans un tampon cacodylate 0,1 M pH 7.4. Les cellules ont ensuite été post-fixées dans une solution contenant 1% de tétroxyde d'osmium dilué dans du tampon cacodylate 0,1 M, pH 7.4, puis déshydratées dans une série de solutions contenant des concentrations croissantes d'éthanol (50%-100%). Après avoir enlevé l'éthanol par séchage au point critique, les échantillons ont été recouverts d'un mélange or-palladium avant l'observation ultra-structurale avec un microscope JEOL-840.

## **8. Préparation des ARNs et analyses par RT-PCR**

### 8.1. Préparation des ARNs

Les cellules ont été lysées et l'ARN extrait à l'aide de la solution Trizol (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Brièvement, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X, puis lysées dans 1 ml de solution Trizol durant cinq minutes à température de la pièce. Le mélange a ensuite été centrifugé cinq minutes à 2000 rpm à température de la pièce avant que le surnageant ne soit transféré puis mélangé par agitation manuelle avec 160 µl d'un mélange chloroforme : isoamylalcool (24 :1). Suite à une incubation de 10 minutes à température de la pièce, le mélange a été centrifugé 10 minutes à 13000 rpm et à 4°C. Le culot a ensuite été lavé avec 1 ml d'éthanol 70% préparé avec de l'eau stérile. Les ARNs ont été centrifugés cinq minutes à 13000 rpm avant que le culot ne soit resuspendu dans 20 µl d'eau ultrapure et libre de nucléases.

## 8.2. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)

Suite à l'extraction des ARNs, nous avons synthétisé les ADNc afin de pouvoir procéder à des amplifications spécifiques et déterminer le niveau d'expression des gènes. Nous avons préparé un mélange réactionnel contenant : 5 µg d'ARN, 1 µl de pdT 500 µg / µl et 1 µl de dNTP 10 mM dans un volume final de 10 µl. Ce mélange a été incubé cinq minutes à 65°C puis cinq minutes sur glace. Nous avons ensuite ajouté 4 µl de First strand buffer 5X, 2 µl de DTT 0.1 M et 40 U de RNAGuard (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) avant de pré-incuber ce mélange deux minutes à 42°C. Le mélange a finalement été complété avec 1 µl de Superscript™ II RNase H – reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada), incubé 50 minutes à 42°C puis 15 minutes à 70°C avant d'être mis sur glace puis conservé à +4°C.

## 8.3. Amplification de l'ADNc par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Suite à la synthèse des ADNc, nous avons procédé à des amplifications spécifiques à l'aide d'un thermocycleur. Nous avons préparé le mélange réactionnel suivant : 1 µl d'ADNc, 2 µl d'un mélange de dNTP 10 mM, 5 µl de tampon de réaction 10X avec Mg<sup>2+</sup>, 1,5 µl de chaque solution d'oligonucléotides sens et antisens à 0,1 µg/µl, ainsi que de l'eau pour avoir un volume final de 50 µl avant d'ajouter 1,5 U de Taq DNA polymérase (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). Les

oligonucléotides utilisés étaient spécifiques à chaque gène étudié (tableau 5). Les amplifications étaient composées de 30 répétitions du cycle suivant : une minute à 94°C, 45 secondes à 54°C et 45 secondes à 72°C, précédé d'un cycle de cinq minutes à 94°C. Les ADNs amplifiés ont été déposés dans des gels d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium et ont migré à 100 V pendant environ une heure avant d'être observés à l'aide d'un trans-illuminateur et photographiés avec une caméra d'Alpha Innotech Corporation.

## **9. Analyse par micropuce à ADN**

Afin de pouvoir analyser à grande échelle l'expression de gènes dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ , les ARNs ont été extraits des cellules IEC-6 puro et IEC-6 HNF4 $\alpha$  confluentes dans du Trizol tel que décrit précédemment. La qualité des ARN a ensuite été vérifiée sur gel d'agarose avant que 10  $\mu$ g d'ARN ne soient envoyés à la plateforme de micropuces à ADN du centre d'Innovation Génome Québec (Université McGill). Les ADNc marqués à la biotine ont été synthétisés à l'aide d'une amorce du promoteur T7 possédant une queue polyT avant d'être hybridés sur une micropuce spécifique du rat présentant 31000 transcrits (Affymetrix RAE230A). L'ADN cible a ensuite été coloré à la streptavidine-phycoérythrine avant que les micropuces ne soient analysées à l'aide du module de criblage GeneArray à une longueur d'onde de 488 nm.

**Tableau 5 : Séquence des oligonucléotides utilisés pour les RT-PCR**

Nom		Séquences	début	fin	Ref. séq.
A2M	sens	5'-CCT CGG CTG AGG TAG AGA TG-3'	3662	3682	<a href="#">NM_012488</a>
	antisens	5'-CCT CTC TCG GGA GAA CAC TG-3'	4066	4046	<a href="#">NM_012488</a>
Aflatoxine reductase	sens	5'-ATC AGG AGG GCA AGT TTG TG-3'	453	473	<a href="#">NM_013215</a>
	antisens	5'-AGA ATG ACT GCA TCC CCT TG-3'	918	898	<a href="#">NM_013215</a>
Apolipoprotéine AI	sens	5'-GCC ACT GTG TAT GTG GAT GC-3'	111	130	<a href="#">NM_012738</a>
	antisens	5'-TCA GGG TAG GGT GGT TCT TG-3'	618	599	<a href="#">NM_012738</a>
Apolipoprotéine B	sens	5'-TGG AGA TGG GAG ATG AGG TC-3'	1564	1584	<a href="#">NM_019287</a>
	antisens	5'-ACC GTG AGG GTT GTT TTC AG-3'	2019	1999	<a href="#">NM_019287</a>
Apolipoprotéine CIII	sens	5'-ACA TGG AAC AAG CCT CCA AG-3'	104	124	<a href="#">NM_012501</a>
	antisens	5'-ACG GCT CAA GAG TTG GTG TT-3'	304	284	<a href="#">NM_012501</a>
Apolipoprotéine E	sens	5'-AAC CGC TTC TGG GAT TAC CT-3'	120	140	<a href="#">BC086581</a>
	antisens	5'-GCT CAC GGA TAG CAC TCA CA-3'	567	547	<a href="#">BC086581</a>
GAPDH	sens	5'-CCA AAG TTG TCA TGG ATG AC-3'	3	23	<a href="#">NM_017008</a>
	antisens	5'-GTG AAG GTC GGT GTG AAC GG-3'	49	47	<a href="#">NM_017008</a>
HNF4 $\alpha$	sens	5'-CTT CTG TGA ACT TCT TCT GGA T-3'	637	659	<a href="#">NM_022180</a>
	antisens	5'-AGA GCT TGA TGA ACT GGA TCT-3'	1097	1076	<a href="#">NM_022180</a>
Intestinal alcaline phosphatase I	sens	5'-AAG GAC ACG CTA ACG CTC AT-3'	1146	1166	<a href="#">NM_022665</a>
	antisens	5'-GGT GGT TGG TCT GTT CTC GT-3'	1565	1545	<a href="#">NM_022665</a>
Intestinal alcaline phosphatase II	sens	5'-ATT TGA CCA GTG CAA CAC CA-3'	408	428	<a href="#">NM_022680</a>
	antisens	5'-AGG CCC ATG AGA TAC GTC AC-3'	860	840	<a href="#">NM_022680</a>
Jak2	sens	5'-ACC CAA GTG GAC AGA GTT GG-3'-3'	2321	2340	<a href="#">NM_031514</a>
	antisens	5'-CTC CAT GCC CTT GCA TAT CT-3'	2794	2875	<a href="#">NM_031514</a>
L-Gals4	sens	5'-AGA AGA GCA TGC CTT TCC AA-3'	268	288	<a href="#">NM_012975</a>
	antisens	5'-GTT GCG AAC CAC ACA ATC AC-3'	729	749	<a href="#">NM_012975</a>
Occludine	sens	5'-TCA TAG TCA GCG CAA TCC TG-3'	526	545	<a href="#">BC062037</a>
	antisens	5'-AGT CAT CCA CGG ACA AGG TC-3'	1089	1070	<a href="#">BC062037</a>
Prkaa2	sens	5'-AGC TCG CAG TGG CTT ATC AT-3'	955	974	<a href="#">NM_023991</a>
	antisens	5'-TGC TGG AAT CGA CAC TTG AC-3'	1515	1496	<a href="#">NM_023991</a>
Sucrase Isomaltase	sens	5'-GGG TCC AGC TTT TAT GGT GA-3'	4931	4951	<a href="#">NM_013061</a>
	antisens	5'-CTG ATG TTT ACG GCC TCC AT-3'	5426	5406	<a href="#">NM_013061</a>
T-kininogene	sens	5'-TTC TGA AAC ACG CTG TGG AG-3'	475	498	<a href="#">NM_012741</a>
	antisens	5'-CAT TGC AGT TGA GGC TTT GA-3'	1056	1037	<a href="#">NM_012741</a>
Villine	sens	5'-CAC CTT TGG AAG CTT CTT CG-3'	104	123	<a href="#">XM_237288</a>
	antisens	5'- TAC TCT CTG GCC CAT TCC AC-3'	546	527	<a href="#">XM_237288</a>

Les données ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel « Affymetrix Microarray suite 5.0 » (MAS5) mis a disposition par la plateforme de micropuces à ADN. La classification des gènes a été faite avec les logiciels Genmapp 2 ([www.genmapp.org](http://www.genmapp.org)) et David (<http://apps1.niaid.nih.gov/david/>).

## 10. Mesure du métabolisme lipidique

### 10.1. Mesure de la synthèse d'apolipoprotéines *de novo*

Après avoir été incubées avec 300  $\mu$ Ci de [ $^{35}$ S]-méthionine, les cellules ont été lavées avec du milieu de Leibovitz sans méthionine et homogénéisées dans du PBS contenant 1% de Triton X-100, 2 mM de méthionine, 1 mM de PMSF et 1 mM de benzamidine. Les homogénats ont ensuite été centrifugés pendant 60 minutes à 105000xg à 4°C. Les surnageants ont finalement été mélangés avec des anticorps polyclonaux dirigés contre les apolipoprotéines (Boehringer-Mannheim Biochemicals, Mannheim, Allemagne) durant 18 heures à 4°C. De la pansorbine a ensuite été ajoutée avant que le mélange ne soit incubé 60 minutes à 20°C. Les immunoprécipités ont ensuite été lavés et analysés sur un gradient d'acrylamide linéaire de 4 à 20% précédé d'un gel de concentration de 3%. Les bandes d'apolipoprotéines sur le gel ont ensuite été sélectionnées, puis découpées avant qu'un décompte ne soit fait à la suite d'une nuit d'incubation à 20°C dans 1 ml de BTS-450 (Beckman Fullerton, CA, USA) et 10 ml de liquide de scintillation (Ready solution, Beckman).



## 10.2. Mesure de la synthèse et de la sécrétion lipidique

La synthèse et la sécrétion lipidique ont été mesurées tel que décrit précédemment (Montoudis *et al.*, 2006). Un mélange de [<sup>14</sup>C]-acide oléique (53 mCi/mmol, Amersham, Oakville, ON, Canada) a été mélangé à de l'acide oléique non-marqué puis solubilisé dans du BSA sans acide gras [BSA/acide oléique 1 :5 (mol/mol)]. La concentration finale en acide oléique est 0,7 mM (0,45 µCi)/puits. Les cellules ont été lavées avec du PBS avant que le mélange d'acide oléique marqué au [<sup>14</sup>C] ne soit ajouté. Après 20 heures, les cellules ont été lavées, puis grattées dans une solution de PBS contenant des antiprotéases (PMSF, pepstatin, le tout à une concentration de 1 mM). Un aliquot a ensuite été prélevé en vue d'une extraction de lipides effectuée de façon standard. Les différentes classes de lipides synthétisées à partir de la solution d'acide oléique marquée au [<sup>14</sup>C] ont ensuite été séparées en utilisant un mélange de solvant hexane-ether-acide acétique (80 :20 :3 vol :vol :vol), tel que décrit précédemment. Les zones correspondantes à chaque lipide ont été grattées des plaques de chromatographies et la poudre de silice a été placée dans des compteurs de scintillation avec du liquide de comptage « Ready Safe » (Beckman LS 5000 TD, ON, Canada). La quantité de protéines cellulaires a été quantifiée grâce à la méthode de Bradford tandis que les résultats ont été exprimés en désintégrations par minutes (dpm) par milligramme de protéines cellulaires.

### 10.3. Mesure de la sécrétion de lipoprotéines

Les cellules ont été incubées dans un mélange d'acide oléique marqué au [<sup>14</sup>C], d'antiprotéases et de transporteur de lipides plasmatiques (4 :1 vol : vol) afin de marquer de façon efficace les lipoprotéines synthétisées *de novo*. Les lipoprotéines ont été isolées par ultracentrifugation différentielle avec une ultracentrifugeuse TL-100 (Beckman Instruments, Montréal, QC, Canada), tel que décrit précédemment (Levy *et al.*, 1992). Brièvement, les chylomicrons ont été isolés après une centrifugation de 20000 rpm pendant 20 minutes. Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL, very-low density lipoproteins, 1,006 g/ml) et les lipoprotéines de faible densité (LDL, low density lipoprotein, 1,063 g/ml) ont été séparées par ultracentrifugation à 100000xg pendant 2h 26 minutes à 4°C.

## 11. Transfections transitoires et essais luciférase

Des transfections transitoires et des essais luciférase ont été effectués afin de déterminer l'activité transcriptionnelle de la protéine HNF4 $\alpha$ .

### 11.1. Transfections transitoires

Les transfection des différentes constructions ont été faites dans la lignée cellulaire HEK 293T pendant 24 heures avant d'effectuer des essais luciférase. Les cellules pré-confluentes d'une boîte de culture de 100 mm ont été trypsinisées (Invitrogen

Life Technologies, Burlington, ON, Canada) puis réparties dans des plaques de 24 puits (un pétri de 100 mm permet de faire 96 puits de plaques 24 puits). Le jour suivant, les cellules ont été transfectées à l'aide de LIPOfectamine 2000. La LIPOfectamine 2000 (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) et l'Opti-MEM (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) mélangés dans un rapport 1/50 ont été incubés 5 minutes à température ambiante (solution A). Le mélange contenant l'ADN a été préparé en utilisant 0,1 µg d'ADN de chaque construction dans 50 µL d'Opti-MEM (solution B). Les solutions A et B ont ensuite été mélangées, agitées et incubées à température ambiante pendant 20 minutes. Le mélange contenant la LIPOfectamine 2000 et l'ADN a été ajouté directement au milieu. Huit heures après la transfection, le milieu a été changé et les cellules ont été lysées après 48 heures.

## 11.2. Essais luciférases

Brièvement, les essais luciférases ont été réalisés tels que décrit précédemment (Houde *et al.*, 2001). Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été lysées dans 300 µL de tampon de lyse (25 mM gly-gly, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM EGTA, 1% Triton X-100 et 1 mM DTT) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) pendant 30 minutes sous agitation à température de la pièce. À la lyse cellulaire, on a ajouté 100 µL de tampon d'essais (25 mM gly-gly, 4 mM EGTA, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 mM ATP et 1 mM DTT) et 100 µL d'une solution de luciférine 1 mM (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) ont été ajoutés.

L'activité luciférase a été mesurée durant 20 secondes à l'aide d'un luminomètre Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Gaithersburg, MD, États-Unis).

## **12. Analyse des résultats et statistiques**

### **12.1. Analyses des micropuces à ADN**

Les analyses effectuées sur les micropuces à ADN ont été effectuées sur des triplicatas de chaque condition. Seuls les gènes qui ont vu leur expression augmenter ou diminuer de façon identique dans les trois extraits de cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 ont été sélectionnés. Les augmentations ou diminutions décrites sont donc une moyenne des valeurs observées pour chaque triplicata, comparativement à la moyenne de leur expression dans les cellules IEC-6 puro.

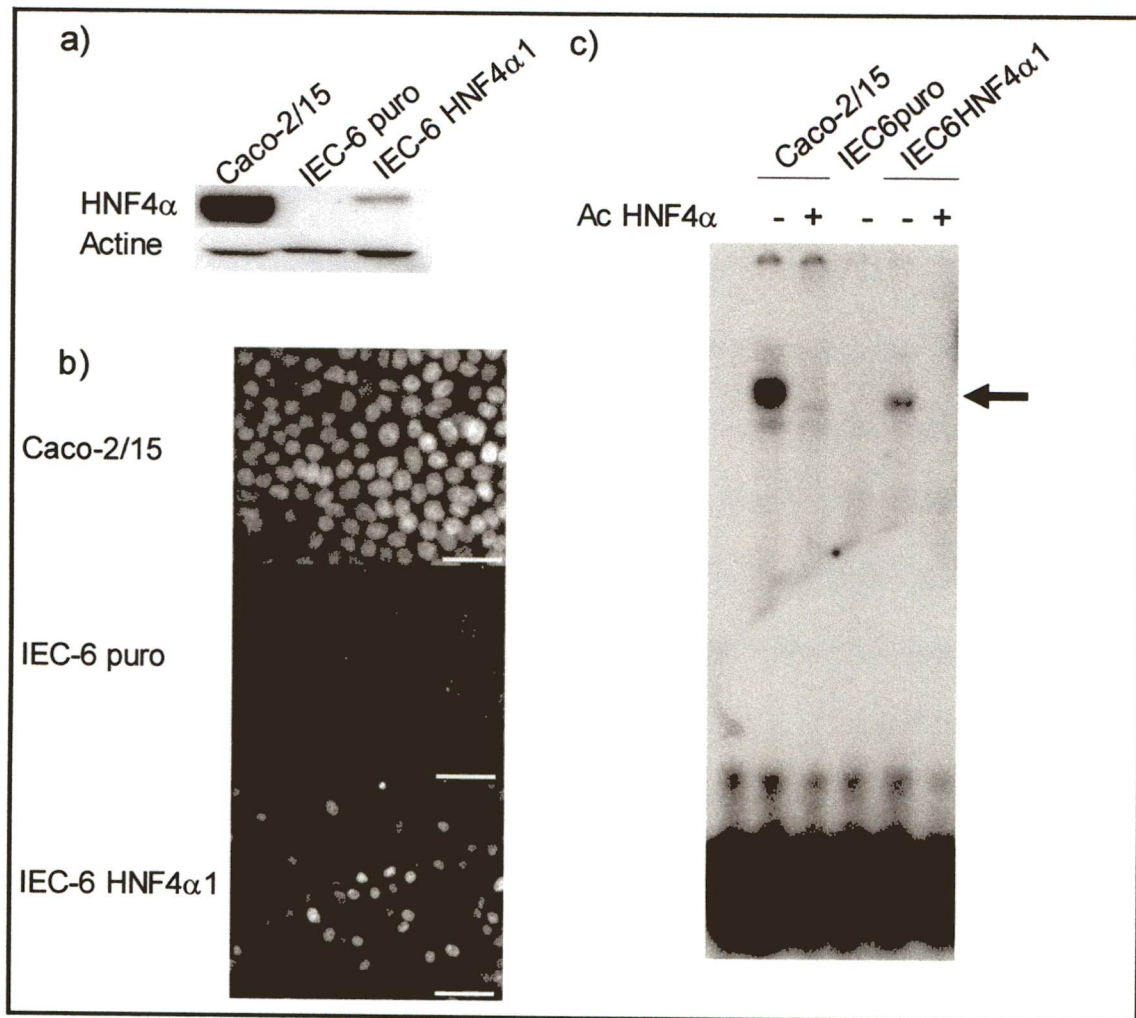
### **12.2. Analyse de la résistance trans-épithéliale**

Les analyses de la résistance trans-épithéliale ont été effectuées sur des duplicatas de chaque condition. Les valeurs reportées sur les graphiques sont les moyennes de la résistance épithéliale de chaque condition. Les écarts-types ainsi que la significativité des résultats déterminés par un test de student ont été calculés pour un seuil de tolérance de  $p=0,05$ .

## **Résultats**

### **1. Validation du modèle d'étude cellulaire IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1**

La première étape de mon projet de recherche a consisté à valider nos modèles d'études IEC-6 puro et IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1. Les cellules IEC-6 sont des cellules non tumorigènes, avec un caryotype normal, provenant de la crypte de l'intestin de rats âgés de 18 jours. Ces cellules d'origine épithéliale intestinale sont non différenciées (Quaroni *et al.*, 1978). Des populations cellulaires ont été isolées par sélection à la puromycine suite à l'infection par le virus pBabepuro et pBabepuro HNF4 $\alpha$ 1. Nous avons voulu déterminer la ou les fonctions de HNF4 $\alpha$ 1 dans l'intestin en réintroduisant son expression dans une lignée cellulaire d'origine épithéliale intestinale. Une première analyse par immunobuvardage à partir d'extraits de protéines totales nous a permis de confirmer une expression de HNF4 $\alpha$  spécifique aux cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1, comparativement aux cellules IEC-6 puro qui ne l'expriment pas (figure 11a). Parallèlement, l'observation par immunofluorescence indirecte de la localisation intracellulaire de HNF4 $\alpha$  a permis d'observer que la protéine est fortement localisée dans le noyau des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 (figure 11b). Finalement, dans le but de confirmer la capacité de liaison et d'activation de la protéine HNF4 $\alpha$ 1 dans nos cellules, des protéines nucléaires ont été extraites puis incubées avec une séquence d'ADN radiomarquée présentant



**Figure 11 : Validation du modèle expérimental IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1**

Afin de valider notre modèle expérimental, les niveaux d'expression, la localisation ainsi que la capacité de liaison des protéines HNF4 $\alpha$  ont été caractérisées dans des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 nouvellement confluentes. **a)** Analyse par immunobuvardage des niveaux d'expression de la protéine HNF4 $\alpha$  dans les cellules IEC-6 puro et IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1. **b)** Détermination de la localisation de la protéine HNF4 $\alpha$  dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 par immunofluorescence. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m **c)** Analyse par retard de migration de l'activité de liaison de la protéine HNF4 $\alpha$  sur une séquence d'ADN spécifique dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1, avec (+) ou sans (-) anticorps dirigé contre HNF4 $\alpha$ . La flèche indique le complexe retardé.

Des extraits de protéines issues de cellules ou des cultures de cellules issues d'adénocarcinome de colon humain Caco-2/15 ont été utilisés comme témoins positifs.

une séquence de liaison spécifique à HNF4 $\alpha$  (tableau 4) avant d'être séparées sur un gel d'acrylamide. Les résultats obtenus ont permis d'observer une liaison spécifique pour les échantillons issus des cellules Caco-2/15 et de cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1, (figure 11c). L'utilisation d'un anticorps dirigé spécifiquement contre HNF4 $\alpha$  a permis de constater que la liaison observée dans les échantillons issus des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 était bien due à la protéine HNF4 $\alpha$ 1. La disparition de la bande spécifique de la liaison à l'ADN, lors de l'ajout de l'anticorps, plutôt qu'un retard de migration dû à la liaison de l'anticorps laisse supposer que ce dernier se lie à une séquence protéique impliquée dans la liaison à l'ADN.

## **2. Morphologie des cellules exprimant HNF4 $\alpha$ 1**

### **2.1. Morphologie des cellules infectées cultivées sur plastique**

Plusieurs observations au microscope ont permis d'observer un phénotype spécifique aux cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1. Celles-ci présentent tout d'abord une tendance à s'agréger à sous confluence et à former des colonies plus serrées que celles observées avec les cellules IEC-6 puro. De plus, les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 semblent s'empiler à post-confluence.

Afin d'avoir une idée plus précise des modifications subies par les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1, nous avons dans un premier temps effectué des observations à l'aide

d'un MET de cellules cultivées 30 jours (figure 12). Ces observations nous ont tout d'abord permis de constater que les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 présentent une structure plus compacte que les cellules contrôles. Généralement plus épaisses que les cellules IEC-6 puro, les cellules qui expriment HNF4 $\alpha$ 1 ont parfois un phénotype cuboïdal, avec une hauteur supérieure à la largeur de la cellule (figures 12b et 12c). De façon tout aussi remarquable, les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 possèdent régulièrement à la surface de la membrane apicale une abondance d'excroissances de la membrane qui rappellent très fortement des microvillosités (figure 12b et 12d). Ces microvillosités sont particulièrement observées au niveau des cellules de forme cuboïdale. On peut parfois observer à la surface des cellules IEC-6 puro de telles microvillosités, mais de façon beaucoup moins importante, tel que décrit par Quaroni *et al.* (1978). Les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 ont de plus la particularité de se recouvrir les unes les autres, rarement plus de deux cellules d'épaisseur, avec parfois formation d'un bourrelet (figure 12b et 12c). Les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 semblent avoir des jonctions cellulaires plus développées que les cellules IEC-6 puro (figures 12e et 12f).

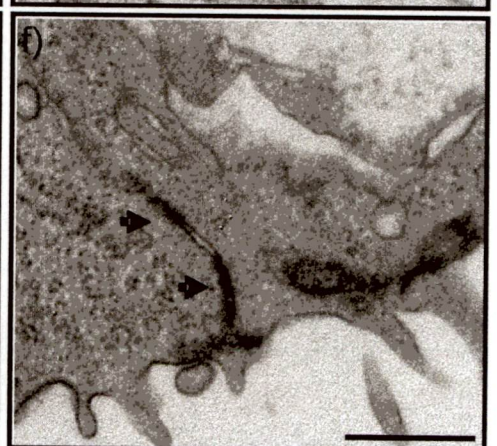
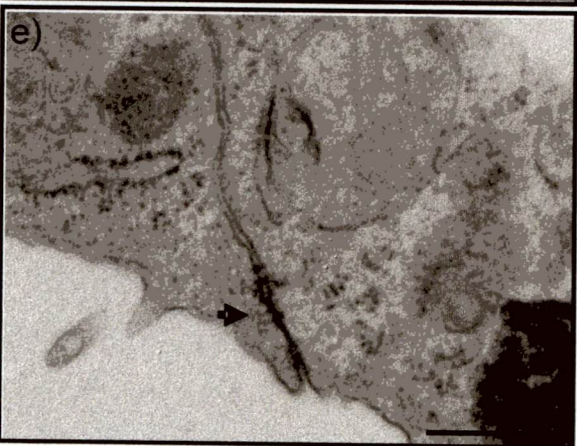
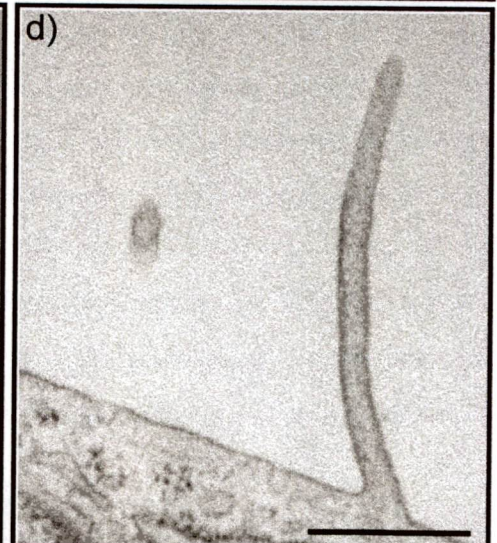
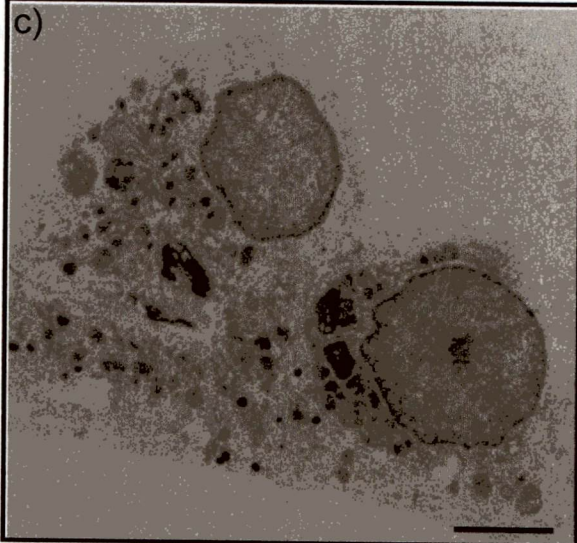
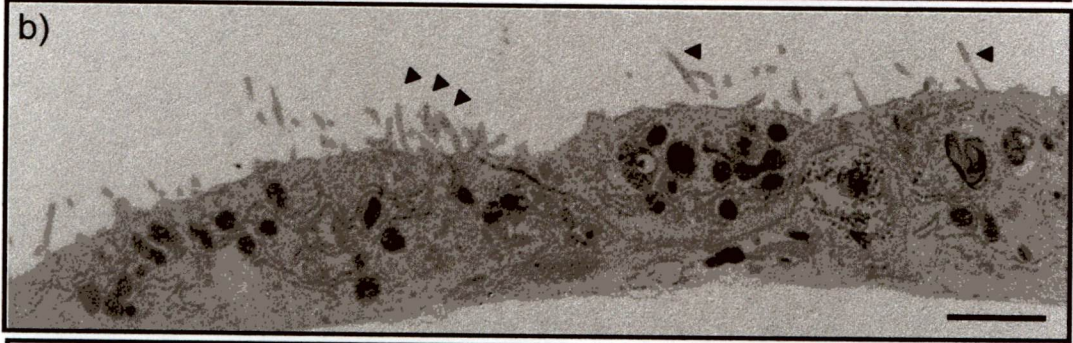
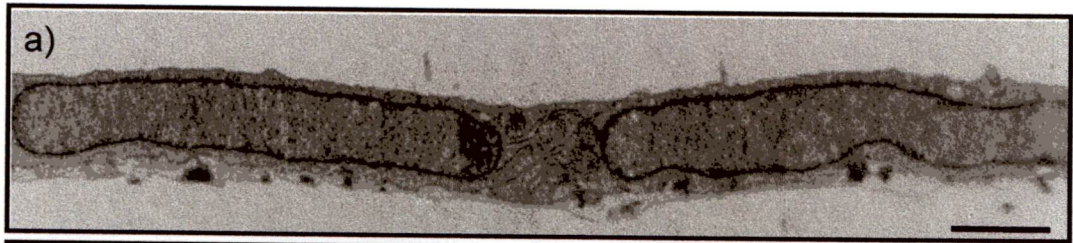
Afin d'avoir une idée plus précise de l'aspect de la surface membranaire des cellules, nous avons observé nos cellules à l'aide d'un MEB. Ces observations ont permis de confirmer un nombre beaucoup plus important de structures de type microvillositaire sur la surface des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 comparativement aux cellules IEC-6 puro qui présentent toutefois quelques microvillosités (figure 13).

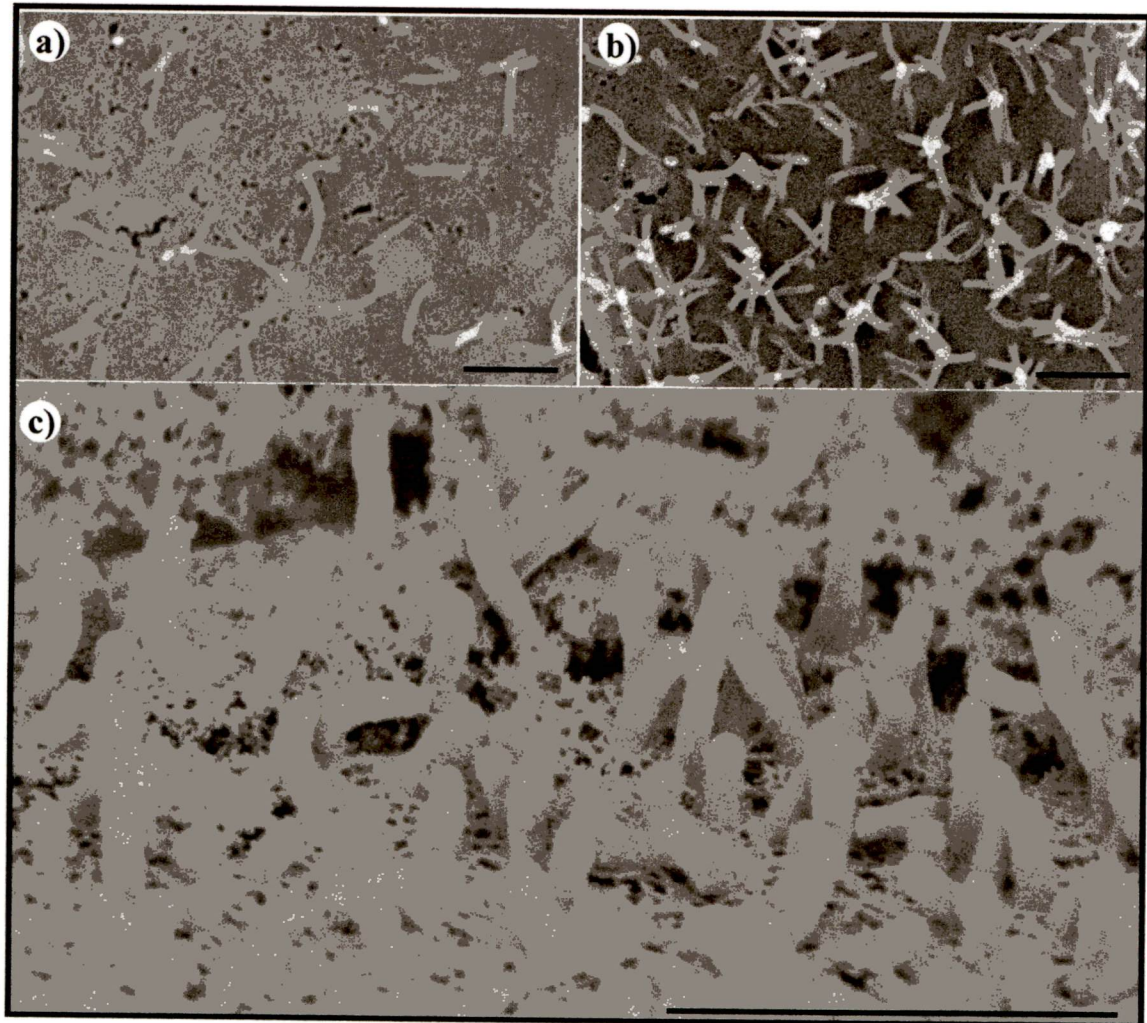


**Figure 12: Morphologie des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 par microscopie électronique à transmission.**

Les cellules IEC-6 infectées avec le virus PuroBabe HNF4 $\alpha$ 1 et cultivées 30 jours après l'atteinte de la confluence ont été observées au microscope électronique à transmission afin d'observer d'éventuelles modifications morphologiques.

**a)** Agrandissement d'une cellule IEC-6 puro, grossie 8000x. **b)** Agrandissement d'une cellule IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1, grossie 8000x.  $\rightarrow$  Indique les microvillosités. **c)** Empilement de cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1, grossies 5000x. **d)** Microvillosité sur la membrane d'une cellule IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 grossie 50000x. **e)** Agrandissement d'une jonction cellulaire de cellules IEC-6 puro, grossie 40000x. **f)** Agrandissement d'une jonction cellulaire de cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1, grossie 40000x. Barres d'échelles, figures a), b) et c) : 2  $\mu$ m ; d), e) et f) : 500 nm.





**Figure 13 : Morphologie de la membrane plasmique des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 par microscopie électronique à balayage**

Nos observations par microscopie électronique à transmission ayant mis en évidence des modifications de la membrane plasmique des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1, nous avons voulu observer de façon plus précise la surface de ces cellules par microscopie électronique à balayage. Les cellules ont été cultivées sur plastique pendant 30 jours après l'atteinte de la confluence. a) IEC-6 puro cultivées sur plastique, grossissement 20000x. b) IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 cultivées sur plastique, grossissement 20000x. c) agrandissement d'une cellule IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1, grossissement 50000x. Barres d'échelles pour les figures a), b) et c) : 1  $\mu$ m.

## 2.2. Morphologie des cellules infectées cultivées sur différentes matrices

Les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 montrent des modifications de leur structure qui indiquent un début de différenciation, aussi nous avons voulu tester la possibilité d'amplifier ces modifications en cultivant les cellules sur différents types de matrices, telles que la laminine, la fibronectine, le collagène de type IV ainsi que le matrigel (figure 14). Notre hypothèse de travail était que nous pourrions ainsi observer une polarisation plus importante des cellules, ainsi que des jonctions cellulaires plus organisées dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1.

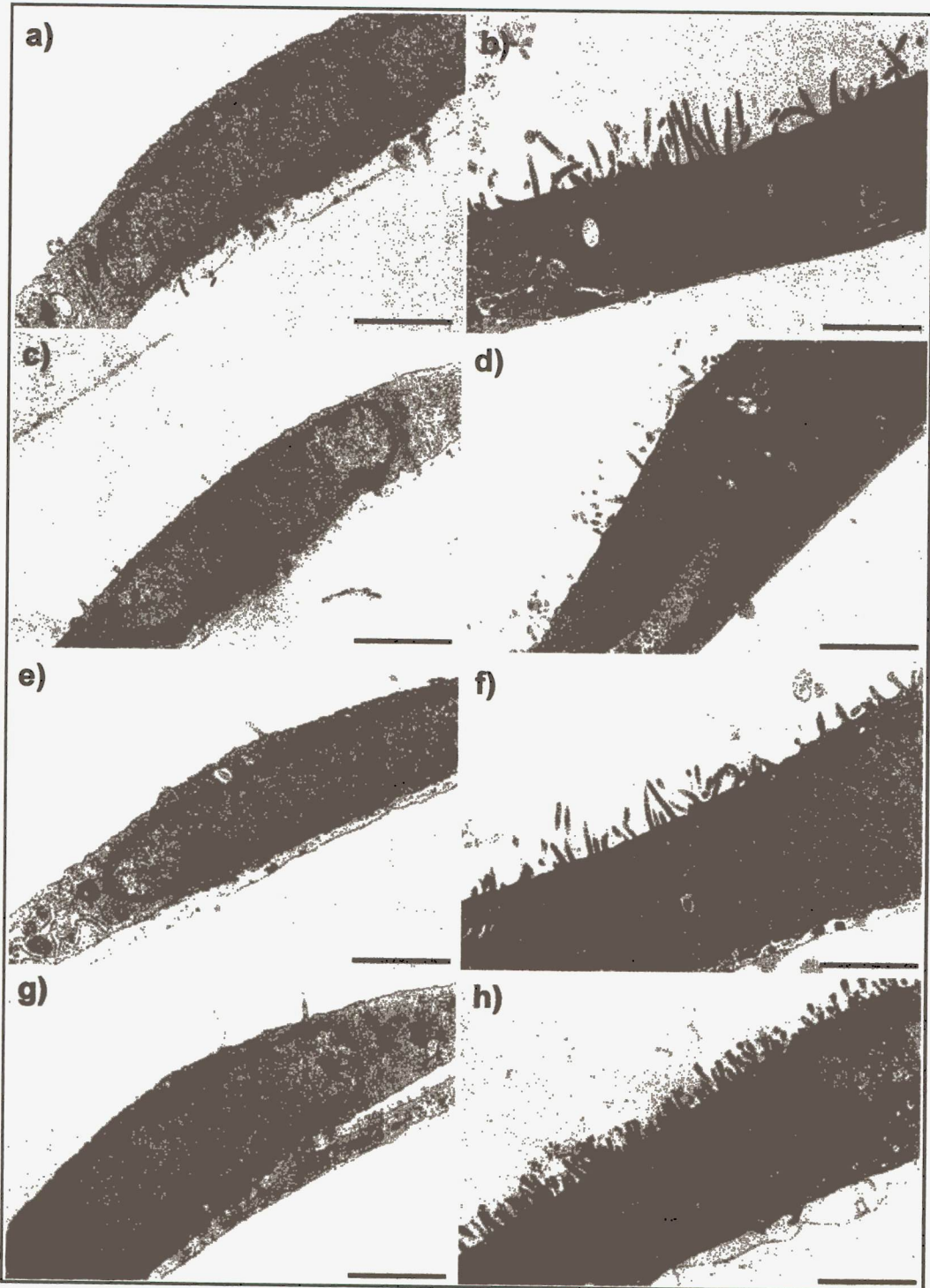
Comme pour les cellules cultivées sur le plastique, les premières observations ont mis en évidence un nombre plus important de microvillosités sur les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 que sur les cellules IEC-6 puro. De plus, la culture sur matrigel augmente considérablement le nombre de microvillosités sur les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1, contrairement aux cellules IEC-6 puro (figures 14g et 14h). Toutefois, nous n'avons pas observé de modification de la polarité baso-latérale ou de changement drastique de morphologie (figure 14). Les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 sont toutefois toujours plus épaisses que les IEC-6 puro. La seule modification notable observée, hormis l'augmentation du nombre de microvillosités sur matrigel, est la présence de vacuoles contenant un matériel fibrillaire indéfini dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$  (non montré). Les jonctions cellulaires semblent aussi légèrement mieux formées que pour les cellules cultivées sur plastique (non

**Figure 14 : Morphologie des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 cultivées sur différentes matrices, observées par microscopie électronique à transmission**

Les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 cultivées 30 jours post-confluence sur différentes matrices ont été observées par MET afin de vérifier s'il était possible d'amplifier les modifications observées lors de culture sur du plastique.

IEC-6 puro grossies 15000x sur **a)** collagène, **c)** fibronectine, **e)** laminine et **g)** matrigel. IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 grossies 15000x sur **b)** collagène, **d)** fibronectine, **f)** laminine et **h)** matrigel.

Barre d'échelle : 2 $\mu$ m.



montré). Il est à noter que les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 semblent notablement plus actives métaboliquement, le milieu s'acidifiant plus rapidement.

### **3. Etablissement des jonctions cellulaires en présence de la protéine HNF4 $\alpha$ 1**

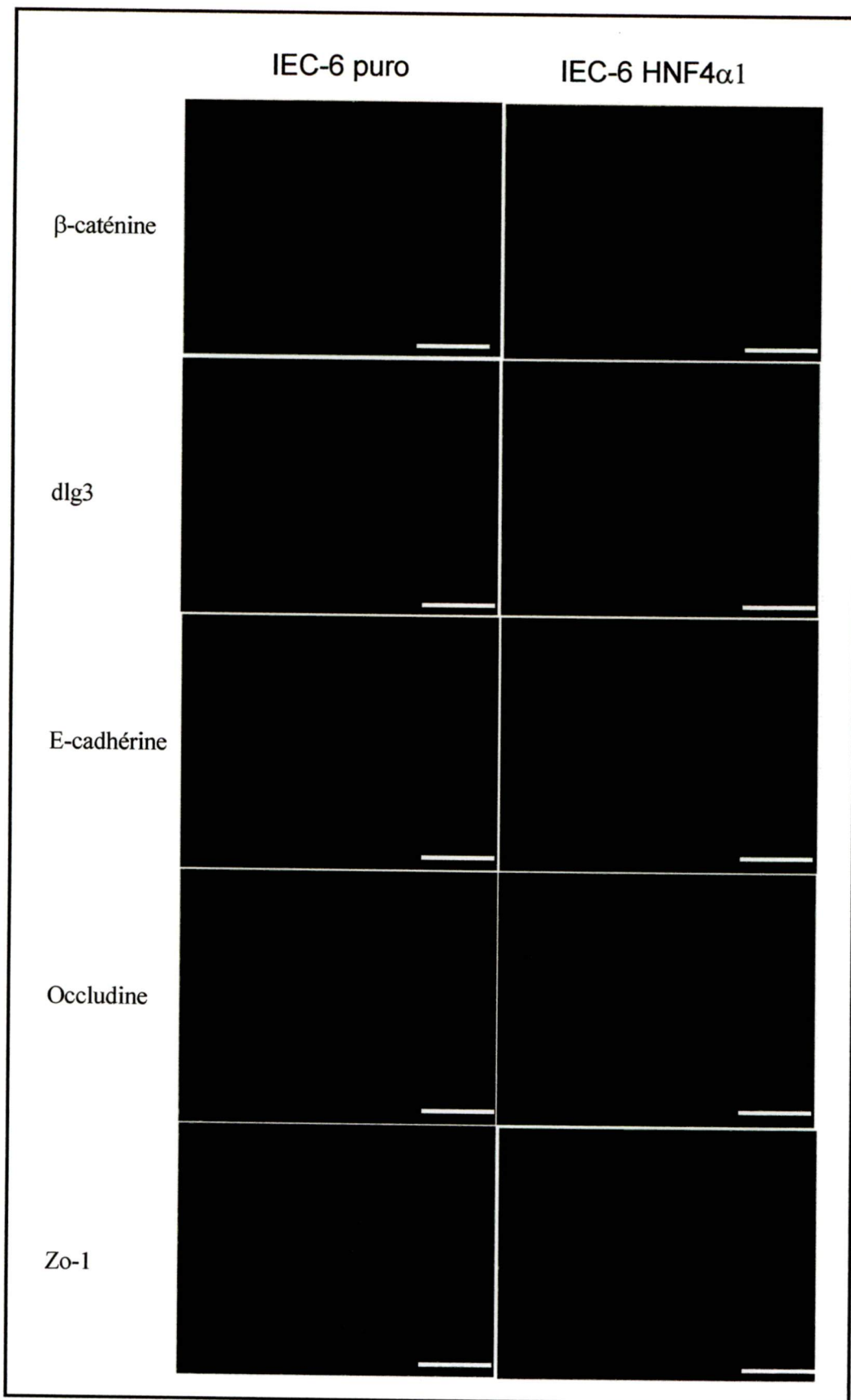
#### 3.1. Localisation de différentes protéines des jonctions cellulaires

Les observations par MET nous ont permis d'observer que les jonctions cellulaires des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 semblaient mieux établies que dans les cellules contrôles. Nous avons donc vérifié la localisation intracellulaire de plusieurs protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité des jonctions cellulaires (figure 15). A l'aide d'observations par microscopie à fluorescence, nous avons pu observer que la localisation intracellulaire des protéines  $\beta$ -caténine, occludine, E-cadhérine et Zo-1 dans des cellules à confluence au niveau des jonctions cellulaires est identique entre les deux lignées (figure 15). Il est toutefois possible de noter que l'occludine semble mieux localisée dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 que dans les cellules contrôles, celles-ci présentant un marquage diffus dans le cytoplasme. De plus, l'expression de la protéine dlg3 semble augmenter et dlg3 semble surtout localisée dans le cytoplasme (figure 15).

**Figure 15 : Localisation par immunofluorescence des protéines  $\beta$ -caténine, dlg3, E-cadhérine, Zo-1 et de l'occludine dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1**

Afin de mieux connaître l'état d'organisation des jonctions cellulaires, la localisation des protéines  $\beta$ -caténine, dlg3, E-cadhérine, Zo-1 et de l'occludine dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 a été observée par microscopie à fluorescence sur des cellules nouvellement confluentes. Les observations ont été effectuées à un grossissement de 40x. Barre d'échelle : 100 $\mu$ m

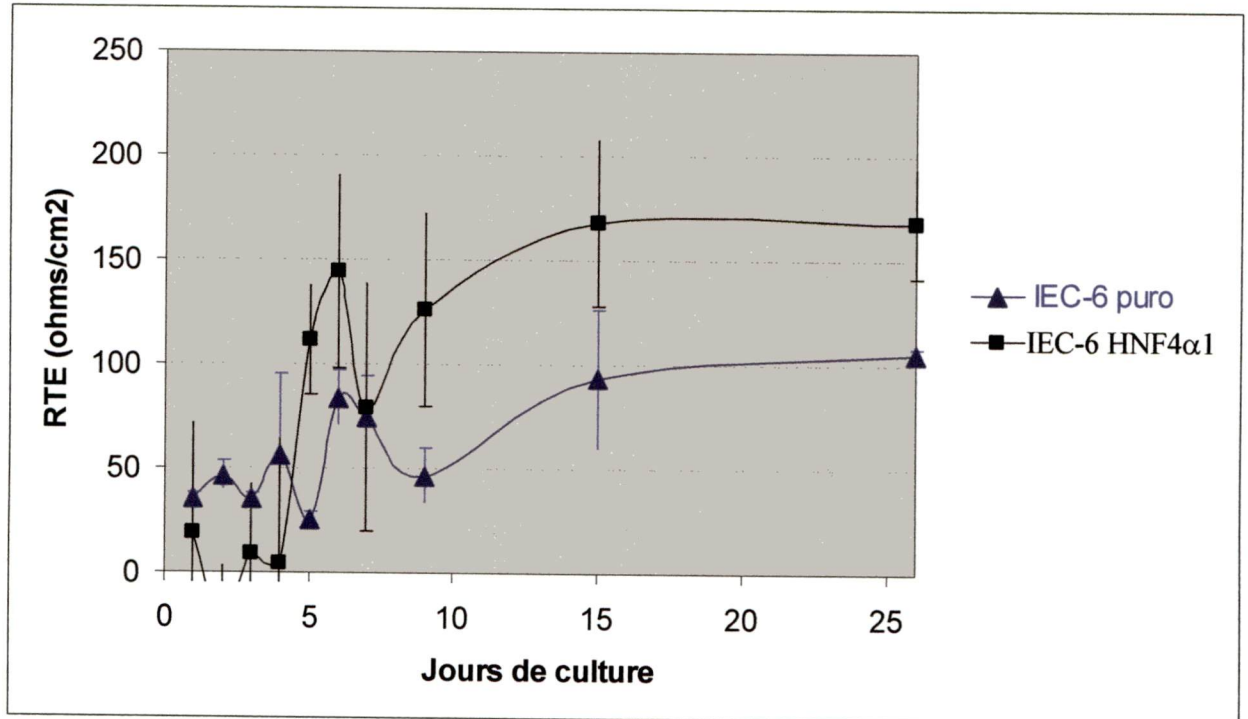




### 3.2. Mesure de la résistance trans-épithéliale

Afin d'étudier de façon quantitative le niveau d'établissement des jonctions cellulaires, des mesures de la résistance trans-épithéliale (RTE) sur des cellules IEC-6 puro et HNF4 $\alpha$ 1 cultivées sur des filtres ont été effectuées à différents temps de confluence. La RTE d'une couche cellulaire est proportionnelle au degré d'établissement des jonctions cellulaires, particulièrement des jonctions serrées. Ainsi, plus les jonctions cellulaires sont développées et stables, plus la RTE est élevée. Il est impossible d'observer une réelle différence de RTE dans les premiers jours de culture (figure 16). Toutefois, les mesures effectuées permettent d'observer une augmentation de la RTE des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 comparativement aux cellules contrôles mais uniquement à partir du dixième jour jusqu'au vingt-sixième jour. La différence est notable puisque l'on peut observer une différence moyenne de plus de 160 ohms entre les deux types cellulaires. Les valeurs observées pour les IEC-6 puro et IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 sont toutefois nettement inférieures à celles relevées pour les cellules Caco-2/15 aux mêmes temps de culture qui sont de 1400 à 1600 ohms après 21 jours de confluence. Un test de student a toutefois permis de constater que les différences étaient non significatives, peut-être à cause du faible échantillonnage.

### 4. Détermination de nouvelles cibles de HNF4 $\alpha$ 1 dans les cellules intestinales



**Figure 16 : Résistance trans-épithéliale dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 à différents temps de confluence :**

La résistance trans-épithéliale (RTE) des cellules IEC-6 puro et IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 a été mesurée à différents temps de confluence afin de comparer de façon quantitative le degré d'établissement des jonctions cellulaires. La RTE dépend principalement du degré d'établissement des jonctions serrées. Chaque jour, deux échantillons différents ont été comptés pour chaque type cellulaire. Les écarts-types ont été indiqués sur la figure. Le calcul de la significativité des résultats par un test de Student montre toutefois que les différences ne sont pas significatives.

#### 4.1. Détermination de nouvelles cibles de HNF4 $\alpha$ 1 par l'utilisation de micropuces à ADN

La majorité des cibles de HNF4 $\alpha$  ayant été déterminées dans le foie et le pancréas, il nous est apparu intéressant d'étudier de façon plus spécifique l'expression des gènes contrôlés par HNF4 $\alpha$  dans un contexte intestinal. A cet effet, des extraits d'ARN de cellules nouvellement confluentes ont été utilisés afin de déterminer le profil d'expression de gènes grâce à des micropuces à ADN. Ces observations ont été effectuées sur des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1, comparativement à des cellules IEC-6 infectées avec un vecteur vide, et répétées trois fois de façon indépendante. Les premiers résultats obtenus ont permis d'observer que la protéine HNF4 $\alpha$  contrôle, directement ou non, l'expression de très nombreux gènes. En résumé, l'analyse des puces à ADN montre une variation d'expression de deux fois ou plus de 1569 sondes au total (annexe 2). Il est à noter que nous n'avons retenu que les gènes dont les différences d'expression étaient significatives dans cet essai et qu'il est possible que le nombre de gènes dont l'expression est altérée par HNF4 $\alpha$ 1 soit supérieur. Dans un souci de clarté, nous nous sommes concentrés pour la suite de l'analyse de résultats sur les gènes clairement identifiés, après élimination des gènes identifiés par similarité, homologie ou les séquences transcrites ou inconnues. Après le tri, il ressort que 327 gènes ont vu leur expression augmentée plus de deux fois tandis que 200 ont une baisse d'expression de plus de deux fois. La plus forte augmentation d'expression a été de 1138 fois pour le gène de l'apolipoprotéine AI tandis que la plus forte diminution a été de 96 fois pour le

gène ionotropique du glutamate 2. Afin de pouvoir les comparer plus facilement, les gènes dont l'expression est augmentée ou diminuée plus de quatre fois ont été regroupés dans différentes catégories telles que celles utilisées par Naiki *et al.* (2002) (tableau 6).

#### 4.2. Caractéristiques des gènes induits par HNF4 $\alpha$ 1

Les premières observations mettent en évidence une surreprésentation de gènes dans les catégories métabolisme, défense de la cellule ou de l'organisme et signalisation/communication cellulaire, particulièrement au niveau des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides ou l'adhésion cellulaire (**tableau 7**). Parallèlement, on peut noter que certaines familles de gènes sont particulièrement régulées par HNF4 $\alpha$  dans l'intestin, telle que la famille des protéines possédant un domaine de liaison à l'ATP (ATP-binding cassette proteins) avec une augmentation de l'expression de cinq membres, la famille des aldéhydes déshydrogénases (cinq membres) ou la famille des protéines canaux transporteurs de solutions (solute carrier proteins) avec l'augmentation d'expression de neuf membres. Au total, dix cibles de HNF4 $\alpha$  déjà identifiées dans d'autres organes semblent aussi des cibles dans l'intestin, telles la protéine HNF1 $\alpha$  et les apolipoprotéines AI, B et C-III. De façon plus significative, plusieurs gènes observés uniquement au niveau des villosités intestinales ou dans des cellules intestinales différenciées, sont surexprimés de façon plus ou moins importante dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1. On peut ainsi observer la surexpression des

**Tableau 6 : Classification des gènes modulés par HNF4 $\alpha$ 1**

Les gènes dont l'expression est augmentée ou diminuée plus de quatre fois lors de la sur-expression de HNF4 $\alpha$ 1 ont été classés tel que décrit par Naïki *et al* (2002).

Catégorie	Sous-catégorie	Sur-exprimé(s)	Sous-exprimé(s)
<b>Division cellulaire</b>	Générale	5	3
	Synthèse/réplication ADN	-	-
	Apoptose	1	1
	Cycle cellulaire	3	-
	Structure chromosomique	-	-
	total	<b>9</b>	<b>4</b>
<b>Signalisation/communication cellulaire</b>	Adhésion cellulaire	13	2
	Protéines de transport/canaux	5	6
	Modulateurs d'effecteurs	5	3
	Hormones/facteurs de croissance	1	6
	Médiateurs intracellulaires	3	8
	Métabolisme	-	-
	Modifications protéiques	-	1
	Récepteurs	1	6
	total	<b>28</b>	<b>32</b>
<b>Structure/motilité cellulaire</b>	Générale	1	6
	Cytosquelette	5	3
	Matrice extracellulaire	1	9
	Protéines associées aux microtubules/moteurs	2	3
	total	<b>9</b>	<b>21</b>
<b>Défense cellulaire, de l'organisme</b>	Générale	-	2
	Homéostasie	7	6
	Immunologie	9	6
	total	<b>16</b>	<b>14</b>
<b>Expression de gènes/protéines</b>	Synthèse ARN	7	2
	Synthèse protéique	-	-
	total	<b>7</b>	<b>2</b>
<b>Métabolisme</b>	Général	8	4
	Acides aminés	5	3
	Cofacteurs	-	-
	Energie/cycle du citrate	-	1
	Lipides	11	2
	Nucléotides	2	-
	Modifications protéiques	2	4
	Sucre/glycolyse	2	-
	Transport	7	2
	total	<b>37</b>	<b>16</b>
<b>Non classé/identifié</b>		14	8
	<b>Total</b>	<b>120</b>	<b>92</b>

### **Tableau 7 : Sélection de gènes induits par HNF4 $\alpha$ 1**

Liste récapitulative des gènes les plus augmentés lors de la surexpression de HNF4 $\alpha$ 1 dans les cellules IEC-6, après les avoir classés tel que décrit dans le tableau 6. Seule les catégories les plus importantes ont été présentées ici. Chaque condition a été testé en triplicata et seuls les gènes induits dans chaque triplicata en été pris en compte.

Augm<sup>o</sup> moy. : augmentation moyenne. Défense Cell./organisme : défense de la cellule ou de l'organisme. Signalisation/com. Cellulaire : signalisation ou communication cellulaire.



Nom du gène	Syn.	Augm° moy.	Catégorie	Sous-catégorie
afiatoxin B1 aldehyde reductase	Afar/akr1a1	407,7	Défense Cell./organisme	Homéostasie
aldehyde dehydrogenase family 1 member A1	Aldh1a1	9,4	Défense Cell./organisme	Homéostasie
dopa/tyrosine sulfotransferase	sult1b1	289,3	Défense Cell./organisme	Homéostasie
glutathione synthetase	Gss/6.3.2.3	4,4	Défense Cell./organisme	Homéostasie
Proteinase-activated receptor-2 G protein-coupled receptor 11	F2r11	4,5	Défense Cell./organisme	Homéostasie
solute carrier family 22 member 1	Slc22a1	6,4	Défense Cell./organisme	Homéostasie
zinc finger protein 36	Zfp36/TTP	4,4	Défense Cell./organisme	Homéostasie
alpha-2-macroglobulin	A2m	11,0	Défense Cell./organisme	Immunologie
c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	Mertk, c-mer	10,9	Défense Cell./organisme	Immunologie
complement component factor h	Cfh	4,9	Défense Cell./organisme	Immunologie
inter alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4	Itih4	6,0	Défense Cell./organisme	Immunologie
interleukin 15	Il15	4,2	Défense Cell./organisme	Immunologie
interleukin 4 receptor	Il4r	10,8	Défense Cell./organisme	Immunologie
Serine protease inhibitor	Spin2c	234,6	Défense Cell./organisme	Immunologie
thymic stromal-derived lymphopoietin receptor	Tslpr	4,2	Défense Cell./organisme	Immunologie
T-kininogen	Kng	142,4	Défense Cell./organisme	Immunologie
4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase./1.13.11.27	Hpd	34,4	Métabolisme	Acides aminés
gamma-glutamyl hydrolase/3.4.19.9	Ggh	18,0	Métabolisme	Acides aminés
GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein	Gchfr/GFRP	11,5	Métabolisme	Acides aminés
kynurenine 3-hydroxylase/ 1.14.13.9	Kmo	7,1	Métabolisme	Acides aminés
X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2 membrane-bound	Xpnpep2	8,2	Métabolisme	Acides aminés
3(2)5-bisphosphate nucleotidase	Bpnt1	5,2	Métabolisme	Générale
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	Hmgcs2	136,5	Métabolisme	Générale
alanyl (membrane) aminopeptidase/3.14.11.2	Anpep	22,5	Métabolisme	Générale
carbonic anhydrase 2	Ca2	5,9	Métabolisme	Générale
flavin containing monooxygenase 1	Fmo1	10,6	Métabolisme	Générale
flavin containing monooxygenase 4	Fmo4	30,9	Métabolisme	Générale
glutaredoxin 1 (thioltransferase)	Glrx1	4,1	Métabolisme	Générale
selenoprotein P plasma 1	Sepp1/sep	377,0	Métabolisme	Générale
3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	LOC191574	10,1	Métabolisme	Lipides
AMP-activated protein kinase (sous unité AMPK)	Prkaa2	72,3	Métabolisme	Lipides
apolipoprotein A-I	ApoA1	1138,1	Métabolisme	Lipides
apolipoprotein C-III	Apoc3	14,4	Métabolisme	Lipides

<b>Nom du gène</b>	<b>Syn.</b>	<b>Augm° moy.</b>	<b>Catégorie</b>	<b>Sous-catégorie</b>
arachidonic acid epoxigenase	Cyp2c23	10,2	Métabolisme	Lipides
carboxylesterase 2 (intestine liver)	Ces2	13,9	Métabolisme	Lipides
cytochrome P450 1a1	Cyp1a1	24,5	Métabolisme	Lipides
cytochrome P450 3A9	CYP3A9	204,4	Métabolisme	Lipides
fatty acid amide hydrolase	Faah	8,1	Métabolisme	Lipides
lipase A lysosomal acid	Lipa	4,1	Métabolisme	Lipides
stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1	7,0	Métabolisme	Lipides
mannoside acetyl glucosaminyltransferase 3	Mgat3	6,0	Métabolisme	Modifications de protéines
palmitoyl-protein thioesterase 2	Ppt2	4,1	Métabolisme	Modifications de protéines
alkaline phosphodiesterase	enpp3	49,3	Métabolisme	Nucléotides
ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	Entpd5	7,0	Métabolisme	Nucléotides
galactose-4-epimerase UDP	Gale	4,0	Métabolisme	Sucre/glycolyse
ketohexokinase	Khk	5,1	Métabolisme	Sucre/glycolyse
apolipoprotein B	Apob	49,0	Métabolisme	Transport
ATP-binding cassette sub-family G (WHITE) member 1	Abcg1	11,3	Métabolisme	Transport
fatty acid binding protein 1	Fabp2	12,2	Métabolisme	Transport
plasmolipin	Im4sf11	14,4	Métabolisme	Transport
progressive ankylosis	Ank	7,3	Métabolisme	Transport
scavenger receptor class B member 1	Scarb1	5,6	Métabolisme	Transport
transporter	LOC314323	12,5	Métabolisme	Transport
agrln	Agm	6,2	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
alpha-2 antiplasmin/ serpinf1	Dmrs91	6,4	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
cadherin 2, Ncadherin	Cdh2, Ncad,	6,1	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2	Celsr2	4,6	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	Ceacam1	23,9	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
CD36 antigen (collagen type I receptor thrombospondin receptor)-like 2	Cd36l2	4,2	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
CEA-related cell adhesion molecule 10	Ceacam10	5,5	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
G protein-coupled receptor 56	Gpr56	6,2	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
lectin galactose binding soluble 4	Lgals4	235,7	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
lectin galactoside-binding soluble 2 (galectin 2)	Lgals2	7,2	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
mucin and cadherin-like	Mucdhl	21,2	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
nonvegicous myosin binding protein H	Mybph	9,8	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
occludin	Ocln	5,2	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire

<b>Nom du gène</b>	<b>Syn.</b>	<b>Augm° moy.</b>	<b>Categorie</b>	<b>Sous-catégorie</b>
growth differentiation factor 15	Gdf15	4,6	Signalisation/com. cellulaire	Hormones/facteurs de croissance
ADP-ribosylation-like 4	Arl4	4,4	Signalisation/com. cellulaire	Médiateurs intracellulaires
protein kinase C-eta	Prkch/PKCL	10,1	Signalisation/com. cellulaire	Médiateurs intracellulaires
runt related transcription factor 1	Runx1/AML1	4,1	Signalisation/com. cellulaire	Médiateurs intracellulaires
avian erythroblastosis oncogene B 3	ErbB3	8,7	Signalisation/com. cellulaire	Modulateurs d'effecteurs
G protein-coupled receptor kinase 5	Gprk5	6,9	Signalisation/com. cellulaire	Modulateurs d'effecteurs
protein kinase (cAMP dependent catalytic) inhibitor beta	Pkib	169,4	Signalisation/com. cellulaire	Modulateurs d'effecteurs
protein kinase lysine deficient 4	Prkwk4/wnk4	6,4	Signalisation/com. cellulaire	Modulateurs d'effecteurs
vasoactive intestinal peptide receptor 1	Vipr1	36,4	Signalisation/com. cellulaire	Modulateurs d'effecteurs
aquaporin 11	Aqp11	11,3	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux
ATPase Na+/K+ transporting beta 1 polypeptide/3.6.1.37	Atp1b1	11,3	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux
importin 13	Imp13	4,3	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter y+ system) member 8	Sic7a8	9,3	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux
transient receptor potential cation channel subfamily V member 4	Trpv4	24,4	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux
adenosine A1 receptor	Adora1	11,0	Signalisation/com. cellulaire	Récepteur

gènes codant pour la calbindin 3 (Freeman, 1995), le récepteur Scavenger BI (Cai *et al.*, 2001), la protéine Dual Oxydase 2 (El Hassani *et al.*, 2005), Lgals 4 (Wooters *et al.*, 2005) et la protéine HMGCS2 (Camarero *et al.*, 2006).

L'utilisation du logiciel genmapp2 a permis de mettre en évidence l'impact majeur de la surexpression de HNF4 $\alpha$ 1 sur la régulation de certaines voies intracellulaires intestinales, telles que le métabolisme des lipides (figure 17).

#### 4.3. Caractéristiques des gènes réprimés par HNF4 $\alpha$ 1

Les gènes réprimés par la surexpression de HNF4 $\alpha$ 1 sont des gènes impliqués principalement dans la signalisation, la structure ou la motilité cellulaire ainsi que le métabolisme (tableau 8). HNF4 $\alpha$ 1 module particulièrement l'expression de gènes impliqués dans la communication cellulaire, notamment des récepteurs, des médiateurs intracellulaires et des hormones de croissance, et très peu de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire. Au niveau métabolique, HNF4 $\alpha$ 1 ne semble pas inhiber de voie particulière et il ne semble pas y avoir de regroupement particulier parmi les gènes sous-exprimés.

#### 4.4. Confirmation de la surexpression de différents gènes dans les cellules

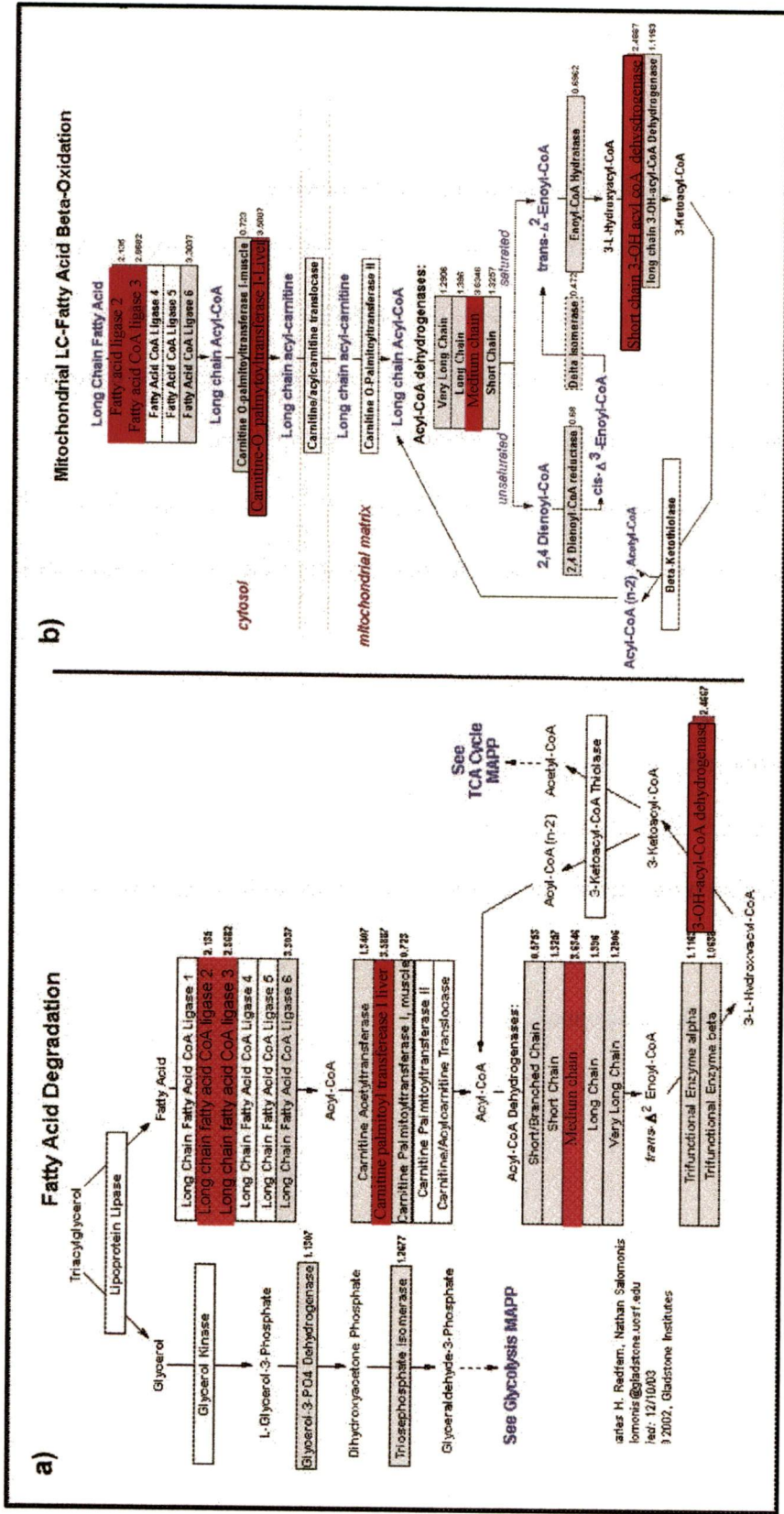
IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1

**Figure 17: Analyse des micropuces à ADN par le logiciel Genmapp2**

Les résultats obtenus avec les micropuces à ADN ont été analysés à l'aide du logiciel Genmapp2 (<http://www.genmapp.org>) qui permet de représenter sous forme de voies schématiques les résultats obtenus. Nos observations ont notamment permis d'observer l'augmentation de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique.

**a)** Voie de dégradation des acides gras. Auteurs : N. Reyez, New York Medical College. **b)** Voie de la  $\beta$ -oxydation dans les mitochondries. Auteurs : C.H. Redfem et N.Salomonis, Gladstone Institute.

- Augmentation de plus de 2 fois de l'expression
- Diminution de plus de 5 fois de l'expression
- Gène dont l'expression n'augmente pas plus de 2 fois ou ne diminue pas plus de 5 fois.
- Gène non représenté sur les micropuces étudiées.



**Tableau 8 : Sélection de gènes sous-exprimés lors de la surexpression de HNF4 $\alpha$ 1**

Liste récapitulative des gènes les plus réprimés lors de la surexpression de HNF4 $\alpha$ 1 dans les cellules IEC-6, après les avoir classés tel que décrit dans le tableau 6. Seules les catégories les plus importantes ont été présentées ici. Chaque condition a été testé en triplicata et seuls les gènes reprimés dans chaque triplicata ont été pris en compte.

Dim° moy.: diminution moyenne. Défense Cell./organisme : défense de la cellule ou de l'organisme. Signalisation/com. Cellulaire : signalisation ou communication cellulaire.

<b>Nom du gène</b>	<b>Syn.</b>	<b>dim° moy.</b>	<b>Catégorie</b>	<b>Sous-catégorie</b>
stathmin-like 2	Stmn2	21,8	Structure/motilité cellulaire	Protéines associées aux microtubules/moteurs
microtubule-associated protein 1b	Map1b	9,4	Structure/motilité cellulaire	Protéines associées aux microtubules/moteurs
midline 1	Mid1	5,2	Structure/motilité cellulaire	Protéines associées aux microtubules/moteurs
procollagen type I alpha 2	Col1a2	27,4	Structure/motilité cellulaire	Matrice extracellulaire
fibulin 5	Fbln5	18,5	Structure/motilité cellulaire	Matrice extracellulaire
NOV protein	Nov	14,9	Structure/motilité cellulaire	Matrice extracellulaire
matrix Gla protein	Mgp	14,8	Structure/motilité cellulaire	Matrice extracellulaire
collagen type III alpha 1	Col3a1	9,7	Structure/motilité cellulaire	Matrice extracellulaire
decorin	dcn	9,2	Structure/motilité cellulaire	Matrice extracellulaire
fibulin 2	Fbln2	5,3	Structure/motilité cellulaire	Matrice extracellulaire
fibrillin-1	Fbn1	5,1	Structure/motilité cellulaire	Matrice extracellulaire
cartilage oligomeric matrix protein	Comp	4,82	Structure/motilité cellulaire	Matrice extracellulaire
angiopoietin-2	Angpt2	51,6	Structure/motilité cellulaire	Générale
Semaphorin 3a	Sema3a	44,7	Structure/motilité cellulaire	Générale
slit homolog 3 (Drosophila)	Slit3	11,3	Structure/motilité cellulaire	Générale
transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	Tgfb11	6,0	Structure/motilité cellulaire	Générale
cadherin-11	Cdh11	5,9	Structure/motilité cellulaire	Générale
protocadherin 3	Pcdh3	5,5	Structure/motilité cellulaire	Générale
transgelin	Tagln	69,8	Structure/motilité cellulaire	Cytosquelette
reversion induced LIM gene	Rli	7,9	Structure/motilité cellulaire	Cytosquelette
adducin 3 gamma	Add3	5,4	Structure/motilité cellulaire	Cytosquelette
angiotensin II receptor type 1 (AT1A)	Agtr1a	49,9	Signalisation/com. cellulaire	Récepteurs
platelet derived growth factor receptor beta polypeptide	Pdgfrb	7,3	Signalisation/com. cellulaire	Récepteurs
oxidised low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	Olr1	6,4	Signalisation/com. cellulaire	Récepteurs
natruretic peptide receptor 3	Npr3	6,4	Signalisation/com. cellulaire	Récepteurs
natruretic peptide receptor 2	Npr2	4,90	Signalisation/com. cellulaire	Récepteurs
endothelial differentiation lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor 2	Edg2	4,66	Signalisation/com. cellulaire	Récepteurs
glutamate receptor ionotropic 2	Gria2	14,9	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux
solute carrier family 29 member 1	Slc29a1	7,5	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux
ATPase Ca++ transporting plasma membrane 4	Atp2b4	7,2	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux
potassium channel subfamily K member 2	Kcnk2	5,9	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux
receptor (calcitonin) activity modifying protein 2	Ramp2	5,4	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux



<b>Nom du gène</b>	<b>Syn.</b>	<b>dIm° moy.</b>	<b>Catégorie</b>	<b>Sous-catégorie</b>
solute carrier family 24 member 3	Slc24a3	4,87	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux
dipeptidylpeptidase 6	Dpp6	15,8	Signalisation/com. cellulaire	Modulateurs d'effecteurs
noggin	Nog	10,4	Signalisation/com. cellulaire	Modulateurs d'effecteurs
dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	DKK3	9,2	Signalisation/com. cellulaire	Modulateurs d'effecteurs
receptor (calcitonin) activity modifying protein 3	Ramp3	10,6	Signalisation/com. cellulaire	Modifications protéiques
WNT1 inducible signaling pathway protein 2	Wisp2	64,4	Signalisation/com. cellulaire	Médiateurs intracellulaires
phospholipase C-like 1	Plcl1	23,8	Signalisation/com. cellulaire	Médiateurs intracellulaires
fyn proto-oncogene	Fyn	10,1	Signalisation/com. cellulaire	Médiateurs intracellulaires
Deleted in liver cancer 1	Dlc1	7,0	Signalisation/com. cellulaire	Médiateurs intracellulaires
adaptor protein with pleckstrin homology and src homology 2 domains	Aps	4,92	Signalisation/com. cellulaire	Médiateurs intracellulaires
serine threonine kinase 39 (STE20/SPS1 homolog yeast)	Stk39	4,70	Signalisation/com. cellulaire	Médiateurs intracellulaires
G-protein gamma 8 subunit	Gng8	4,44	Signalisation/com. cellulaire	Médiateurs intracellulaires
POU domain class 3 transcription factor 3	Pou3f3	4,01	Signalisation/com. cellulaire	Médiateurs intracellulaires
fibroblast growth factor receptor 2	Fgfr2	12,8	Signalisation/com. cellulaire	Hormones/facteurs de croissance
bone morphogenetic protein 6	Bmp6	11,4	Signalisation/com. cellulaire	Hormones/facteurs de croissance
pleiotrophin	Ptn	8,8	Signalisation/com. cellulaire	Hormones/facteurs de croissance
growth differentiation factor 6	Gdf6	7,4	Signalisation/com. cellulaire	Hormones/facteurs de croissance
insulin-like growth factor binding protein 2	Igfbp2	5,4	Signalisation/com. cellulaire	Hormones/facteurs de croissance
fibroblast growth factor 18	Fgf18	4,84	Signalisation/com. cellulaire	Hormones/facteurs de croissance
cadherin 13	Cdh13	28,0	Signalisation/com. cellulaire	Hormones/facteurs de croissance
f-spondin	Sponf	6,1	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
leucine zipper transcription regulator 2	Lztr2	9,3	NI	Adhésion cellulaire
chromosome condensation 1-like	Chc1l	7,1	NI	NI
seminal vesicle antigen-like 1	Sval1	7,0	NI	NI
NEFA precursor	Nucb2	6,2	NI	NI
ischemia related factor vof-16	Vof16	5,2	NI	NI
ankyrin-like repeat protein	Alrp	5,0	NI	NI
RT1 class Ib gene locus M3	RT1-M3	4,63	NI	NI
melanoma antigen family D 2	Maged2	4,23	NI	NI
low density lipoprotein receptor-related protein 2	Lrp2	7,3	Métabolisme	Transport
fatty acid binding protein 5 epidermal	Fabp5	4,53	Métabolisme	Transport
sulfatase FP	LOC171396	25,2	Métabolisme	Modifications protéiques
ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	Uchl1	21,2	Métabolisme	Modifications protéiques

<b>Nom du gène</b>	<b>Syn.</b>	<b>dim° moy.</b>	<b>Categorie</b>	<b>Sous-catégorie</b>
Subtilisin - like endoprotease	Pace4	6,8	Métabolisme	Modifications protéiques
carboxypeptidase E	Cpe	5,9	Métabolisme	Modifications protéiques
hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	Hsd11b1	33,8	Métabolisme	Lipides
stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	Scd2	12,4	Métabolisme	Lipides
alcohol dehydrogenase 1	Adh1	7,6	Métabolisme	Générale
diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase type II	Nudt4	5,7	Métabolisme	Générale
carbonic anhydrase 3	Ca3	5,7	Métabolisme	Générale
cytochrome P450 subfamily 1B polypeptide 1	Cyp1b1	4,46	Métabolisme	Générale
branched chain aminotransferase 1 cytosolic	Bcat1	8,4	Métabolisme	Acides aminés
arginase 1	Arg1	7,2	Métabolisme	Acides aminés
monoamine oxidase A	Maoa	5,1	Métabolisme	Acides aminés

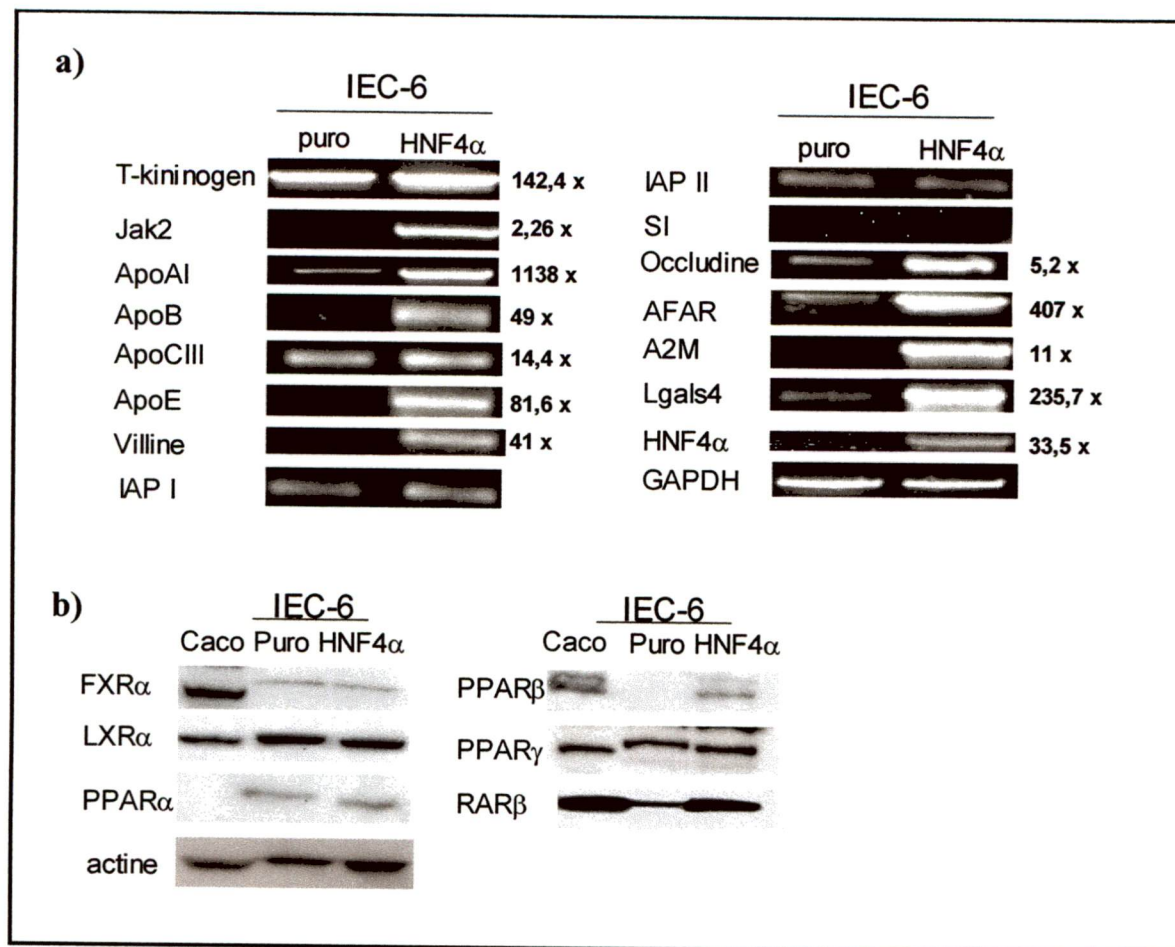
Afin de valider la surexpression de gènes dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1, des analyses par RT-PCR ont été effectuées sur des extraits d'ARN de cellules à confluence (figure 18a). L'expression de gènes codant pour des protéines de différentes catégories telles les apolipoprotéines, l'aflatoxine réductase, Jak2, l'occludine ou la sous unité prkaa2 de l'AMPK entre autres a ainsi été observée. De plus, l'expression des phosphatases alcalines I et II de rat et de la sucrase isomaltase a été vérifiée, ainsi que celle de la villine, l'homologue de la villine étant surexprimé 41 fois dans les micropuces à ADN. Les résultats obtenus confirment les augmentations observées lors de l'analyse par micropuces à ADN même si les augmentations observées par RT-PCR ne coïncident pas toujours avec les niveaux d'induction décelés par micropuces. L'expression de la sucrase isomaltase et des phosphatases alcalines, généralement utilisées comme marqueur de la différenciation intestinale, ne varient pas. Bien que la sucrase isomaltase ne soit pas une cible de HNF4 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  régule directement l'activité de la phosphatase alcaline (Olsen *et al.*, 2005). Toutefois, on observe l'augmentation de l'expression de la villine, augmentation confirmée par immunobuvardage. La villine est considérée comme un marqueur de la différenciation épithéliale intestinale (Soubeyran *et al.*, 1999). L'augmentation d'expression de la protéine prkaa2, sous-unité catalytique de la protéine AMPK, est aussi très remarquable puisque cette protéine est considérée comme une protéine clé dans la régulation du métabolisme cellulaire tout en régulant l'activité de HNF4 $\alpha$  (Hong *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 2006).

#### 4.5. Surexpression de HNF4 $\alpha$ 1 et régulation des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires forment un réseau complexe d'interrelations, que ce soit en régulant mutuellement leur expression ou en agissant de façon complémentaire ou opposée sur l'expression de gènes cibles. Parallèlement, plusieurs récepteurs nucléaires possèdent des rôles importants dans le contrôle de la différenciation cellulaire ou dans le contrôle de voies métaboliques. Nous avons donc vérifié l'expression des protéines LXR $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$ , FXR $\alpha$  et RAR $\beta$ . Des analyses par immunobuvardage nous ont permis d'observer une expression plus importante des protéines PPAR $\beta$  et RAR $\beta$ , tandis que l'expression de FXR $\alpha$ , LXR $\alpha$ , PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  ne varient pas (figure 18b). Les analyses de liaison permettent toutefois d'observer un déplacement du complexe de liaison pour les protéines FXR $\alpha$ , LXR $\alpha$  et un isoforme indéterminé de PPAR, ce qui traduit probablement une modification dans la composition des complexes liés.

#### 5. HNF4 $\alpha$ 1 et le métabolisme lipidique

Les résultats obtenus lors des analyses par les micropuces à ADN ont mis en évidence une expression accrue de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. Dans le but de déterminer l'impact de ces modifications sur le métabolisme lipidique, nous avons procédé, en collaboration avec le Dr Emile Levy de l'hôpital Sainte-Justine de Montréal, aux dosages de divers marqueurs.



**Figure 18 : Analyse par RT-PCR et immunobuvardage de l'expression de divers gènes et protéines dans les cellules exprimant HNF4 $\alpha$ 1**

L'effet de la surexpression de la protéine HNF4 $\alpha$ 1 sur l'expression de différents gènes ou protéines a été examiné par RT-PCR ou immunobuvardage sur des extraits de cellules nouvellement confluentes.

**a)** Analyse par RT-PCR de gènes choisis parmi les gènes augmentés dans les micropuces à ADN. L'augmentation observée sur les micropuces à ADN a été notée quand disponible. IAP I : Phosphatase alcaline I de rat ; IAP II : phosphatase alcaline II de rat ; SI : sucrase isomaltase, AFAR : aflatoxine reductase ; Lgals4 : galectine 4 ; A2M : macroglobuline  $\alpha$ 2. **b)** Analyse par immunobuvardage de l'expression de plusieurs récepteurs nucléaires impliqués au niveau du métabolisme ou de la différenciation cellulaire.

Les niveaux d'expression des apolipoprotéines AI, B-100 et B-48 augmentent dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 bien qu'il y ait une baisse de sécrétion de celles-ci dans le milieu (tableau 9a). Il y a parallèlement diminution à la fois de la synthèse et de la sécrétion des triglycérides tandis que les taux de diglycérides augmentent sans augmentation significative de leur sécrétion (tableau 9b). On peut aussi observer une diminution de synthèse des esters de cholestérol (tableau 9b). Finalement, on peut observer une baisse de sécrétion de tous les types de lipoprotéines étudiées, chylomicrons, VLDL, HDL et LDL (tableau 9c). Ces résultats montrent que bien que l'expression de HNF4 $\alpha$ 1 entraîne une augmentation de la synthèse de certains lipides ou de protéines impliquées dans le métabolisme lipidique, la sécrétion de ces lipides est généralement inchangée ou diminuée.

## **6. HNF4 $\alpha$ 1 et régulation de prkaa2 (AMPK)**

La protéine AMPK est une protéine hétérotrimérique composée de trois sous-unités, dont deux régulatrices ( $\beta$  et  $\gamma$ ) et une catalytique ( $\alpha$ ; prkaa2) (Long et Zierath, 2006). Cette protéine est, tout comme HNF4 $\alpha$ , impliquée dans la régulation du métabolisme cellulaire et contrôle l'activité de HNF4 $\alpha$  par le biais de la phosphorylation de la sérine 304 (Imai *et al.*, 2006). Les analyses effectuées à l'aide des micropuces à ADN montrent une surexpression de 72 fois de la sous-unité prkaa2 dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1.

### **Tableau 9 : Métabolisme lipidique lors de la surexpression de HNF4 $\alpha$ 1**

Le niveau d'expression des apolipoprotéines dans les cellules IEC-6 puro et HNF4 $\alpha$ 1 a été mesuré grâce à l'incorporation de [<sup>35</sup>S]-méthionine dans des cellules nouvellement confluentes puis par immunoprécipitation des apolipoprotéines. Les mesures de la synthèse et de la sécrétion lipidique ont été effectuées grâce à un marquage avec du [<sup>14</sup>C]-acide oléique dans des cellules confluentes puis par chromatographie tandis que les lipoprotéines ont été dosées suite à un marquage avec de l'acide oléique marqué au [<sup>14</sup>C]. PL : phospholipides ; MG : monoglycérides ; DG : diglycérides ; TG : triglycérides, CE : esters de cholestérol ; CM : chylomicron ; VLDL : very low density lipoproteins ; LDL : low density lipoprotein; HDL: high density lipoprotein. Les dosages sont exprimés en désintégration par minute par milligramme de protéines cellulaires (dpm).

**a) Synthèse et sécrétion des apolipoprotéines**

<b>sécrétion</b>	<b>IEC-6</b>	<b>IEC-6 HNF4<math>\alpha</math>1</b>	
B-100	23 723 $\pm$ 775	9998 $\pm$ 362	p < 0.0001
B-48	44 024 $\pm$ 1547	22 070 $\pm$ 640	p < 0.0001
A-I	35 712 $\pm$ 4473	22 891 $\pm$ 2372	p < 0.0370

<b>synthèse</b>	<b>IEC-6</b>	<b>IEC-6 HNF4<math>\alpha</math>1</b>	
B-100	54 067 $\pm$ 3933	88 041 $\pm$ 5228	p < 0.001
B-48	528 247 $\pm$ 21 445	694 213 $\pm$ 19 908	p < 0.001
A-I	43 153 $\pm$ 3040	51 723 $\pm$ 1663	p < 0.039

**b) Synthèse et sécrétion de lipides**

<b>synthèse</b>	<b>IEC-6</b>	<b>IEC-6 HNF4<math>\alpha</math>1</b>	
PL+MG	144 210 $\pm$ 6061	165 378 $\pm$ 12 164	NS
DG	3621 $\pm$ 325	6393 $\pm$ 646	p < 0.015
TG	145 445 $\pm$ 3382	130 048 $\pm$ 2428	p < 0.012
CE	6089 $\pm$ 402	3996 $\pm$ 459	p < 0.014

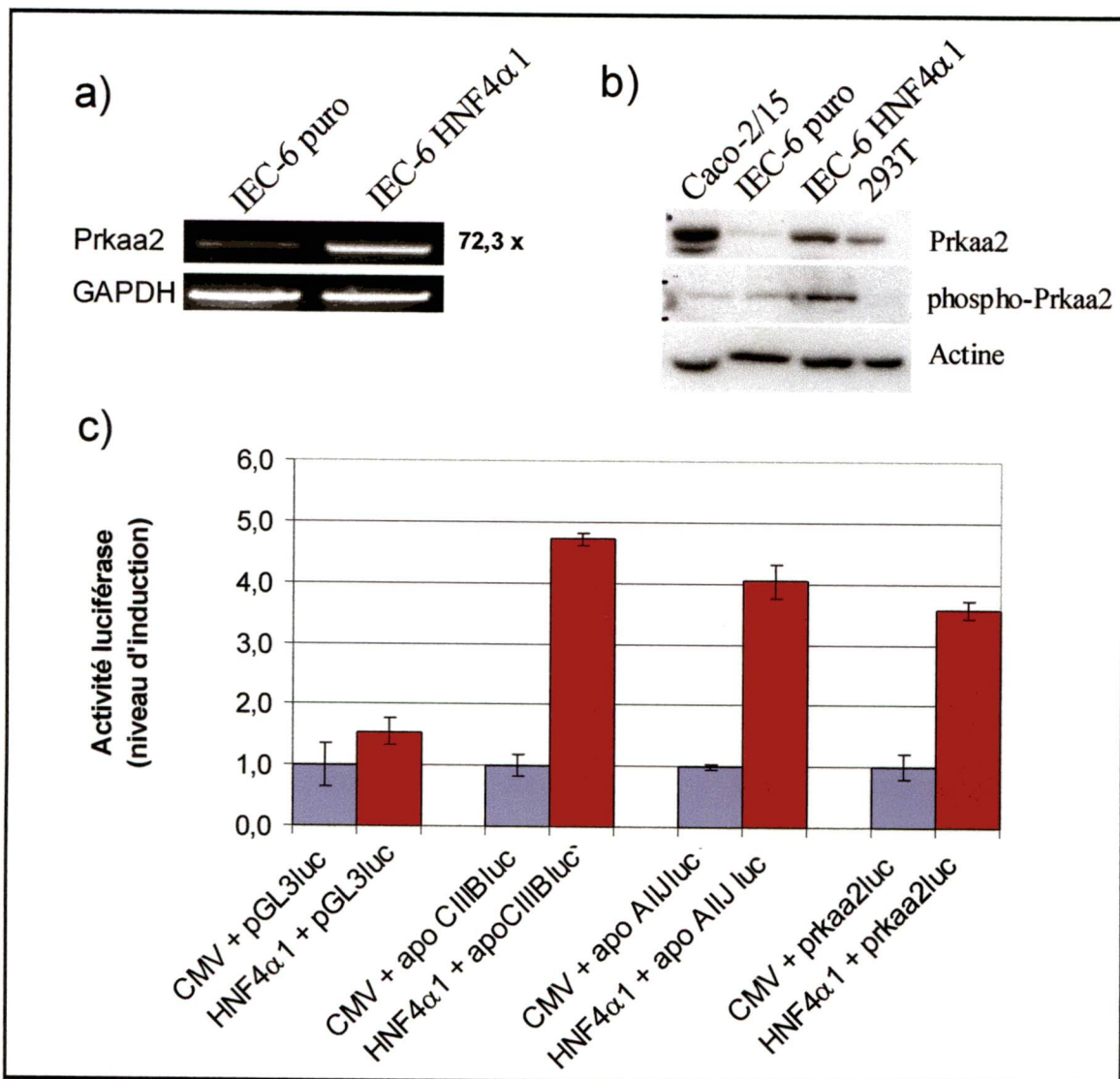
<b>sécrétion</b>	<b>IEC-6</b>	<b>IEC-6 HNF4<math>\alpha</math>1</b>	
PL+MG	12 619 $\pm$ 304	10 205 $\pm$ 517	p < 0.011
DG	853 $\pm$ 114	2261 $\pm$ 748	NS
TG	3294 $\pm$ 481	1663 $\pm$ 242	p < 0.034
CE	377 $\pm$ 32	743 $\pm$ 228	NS

**c) Sécrétion de lipoprotéines**

<b>sécrétion</b>	<b>IEC-6</b>	<b>IEC-6 HNF4<math>\alpha</math>1</b>	
CM	82 818 $\pm$ 3620	63 721 $\pm$ 1657	p < 0.020
VLDL	4945 $\pm$ 242	4523 $\pm$ 276	p < 0.017
LDL	7734 $\pm$ 454	6483 $\pm$ 267	p < 0.065
HDL	118 063 $\pm$ 6416	98723 $\pm$ 3651	p < 0.011

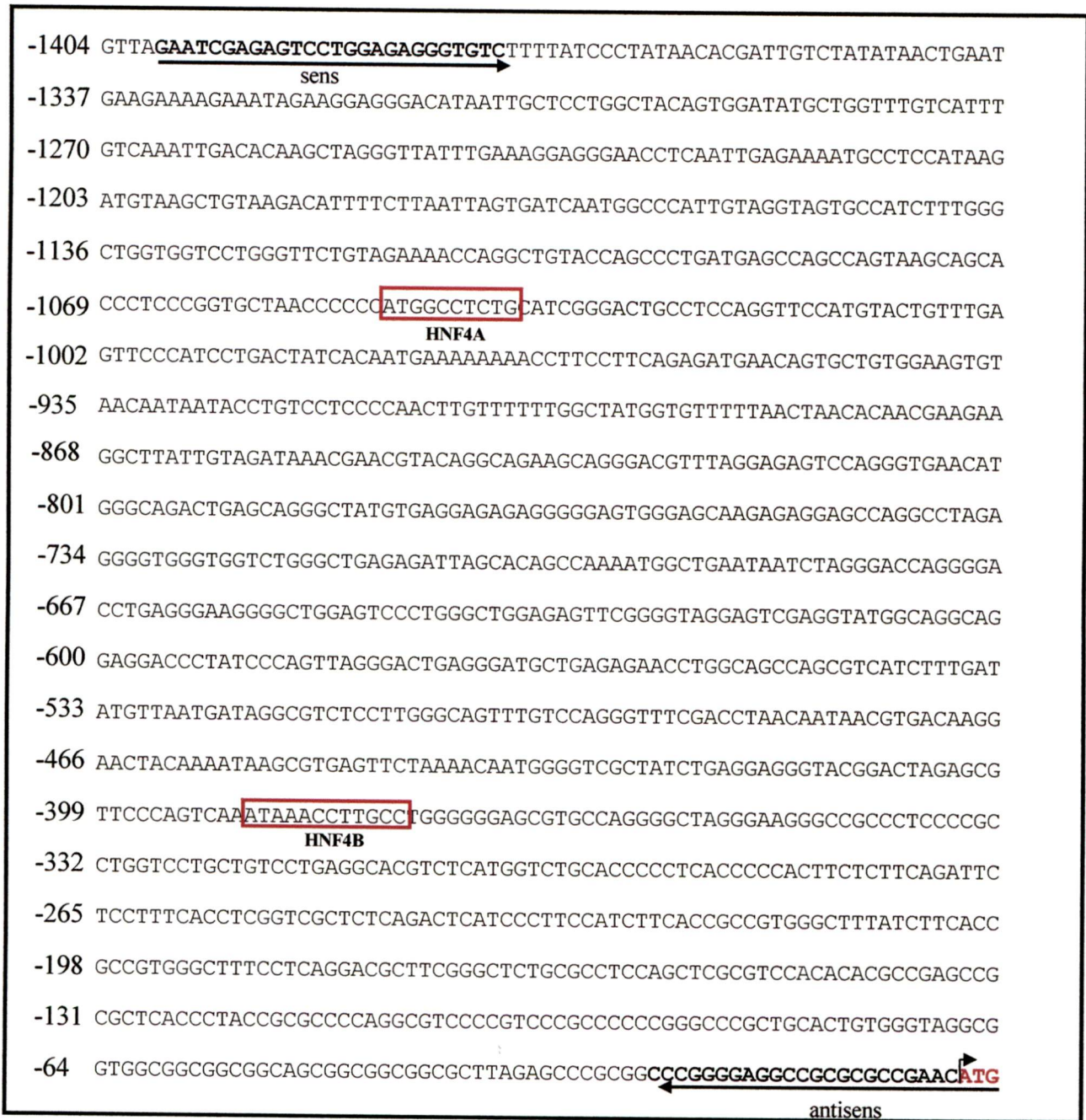


Des analyses effectuées par RT-PCR ont permis de confirmer la surexpression du gène codant pour *prkaa2* dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1, tandis que les immunobuvardages ont confirmé une surexpression de la protéine *prkaa2* (figures 19a et 19b). Toutefois, un immunobuvardage spécifique de la forme phosphorylée active de *prkaa2*, dirigé contre la thréonine 172, n'a permis d'observer qu'une très faible augmentation de la forme activée de *prkaa2* (Woods *et al.*, 2003) (figure 19b). Plusieurs traitements des cellules IEC-6 puro et HNF4 $\alpha$ 1 avec de l'AICAR, un inducteur spécifique de l'AMPK, ou avec différentes concentrations de glucose dans le milieu, n'ont toutefois pas permis d'induire une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK sur la thréonine 172 (non montré). Afin de déterminer si l'activation du gène codant pour *prkaa2* était bien directement dépendante de HNF4 $\alpha$ 1, le promoteur de *prkaa2* a été cloné puis inséré dans un vecteur pGL3 contenant le gène rapporteur de la luciférase. Des essais luciférase effectués dans des cellules 293T ont permis d'observer une augmentation spécifique de l'expression du gène codant pour la luciférase lorsque la protéine HNF4 $\alpha$  était exprimée en présence du promoteur de *prkaa2* (figure 19c). Cette induction est environ égale à celle observée lorsque les promoteurs des apolipoprotéines AII et CIII, cibles connues de HNF4 $\alpha$ , ont été utilisés comme témoins positifs. Une analyse du promoteur de *prkaa2* effectué grâce au logiciel TESS a permis d'identifier deux sites putatifs de liaison de HNF4 $\alpha$  (figure 20).



**Figure 19 : Modulation de l'expression de *prkaa2* dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1**

**a)** Analyse par RT-PCR de l'expression du gène codant pour *prkaa2*, sous unité active de la protéine AMPK, dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 nouvellement confluentes. **b)** Détermination du niveau d'expression de la protéine *prkaa2* et de sa forme phosphorylée sur la thréonine 172 dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 nouvellement confluentes. **c)** Détermination par transfection transitoire et essais luciférase de la capacité d'induction du gène *prkaa2* par HNF4 $\alpha$ 1 dans des cellules 293T, 36 heures après l'infection. Les promoteurs de l'apoCIIIb et de l'apoAIIJ clonés dans le plasmide pGL3 contenant le gène rapporteur luciférase servent de contrôle. Une séquence de 1500 nucléotides de la région 5' du gène *prkaa2* a été amplifiée à partir d'ADN génomique de rat puis clonée dans le plasmide pGL3.



**Figure 20 : Structure du promoteur de prkaa2**

La séquence du promoteur de prkaa2 a été obtenue à partir de la référence ENSRNOG0000007706 sur ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) puis analysée par le logiciel TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>). Les oligonucléotides utilisés pour le clonage du promoteur ont été représentés ainsi que la position des sites de liaison putatifs par HNF4 $\alpha$  (HNF4A et HNF4B) et le site d'initiation de la transcription.

## 7. Régulation de l'expression de HNF4 $\alpha$ par la protéine Cdx2

Bien que les protéines HNF4 $\alpha$  et Cdx2 soient toutes deux impliquées dans des mécanismes de régulation de la différenciation intestinale, aucun lien entre ces deux protéines n'a encore pu être mis en évidence. Nous avons donc voulu déterminer si les protéines HNF4 $\alpha$  et Cdx2 pouvaient être impliquées dans des mécanismes communs. Pour ce faire, nous avons comparé l'expression de plusieurs gènes dans les cellules exprimant HNF4 $\alpha$ . La comparaison de l'effet de Cdx2 et HNF4 $\alpha$ 1 dans les IEC-6 a été effectuée sur des micropuces à ADN obtenues après surexpression de Cdx2 ou HNF4 $\alpha$ 1 dans les cellules IEC-6. De façon intéressante, nos résultats ont montré que Cdx2 et HNF4 $\alpha$ 1 possédaient de nombreuses cibles communes dans les cellules IEC-6 (tableau 10). Notamment, nous avons pu identifier les gènes codant pour la villine, l'AFAR, l'A2M et l'apolipoprotéine AI comme étant surexprimés par HNF4 $\alpha$ 1 et Cdx2 dans les cellules intestinales. Des analyses effectuées par RT-PCR ont mis en évidence une sur-expression de ces gènes dans les deux types cellulaires, ainsi qu'une surexpression de HNF4 $\alpha$  par Cdx2 (figure 21a). La surexpression de HNF4 $\alpha$  dans les cellules Cdx2 a de plus été confirmée par immunobuvardage (figure 21b). Afin de déterminer si la régulation de HNF4 $\alpha$  par Cdx2 pouvait se faire de façon directe, les deux régions promotrices de HNF4 $\alpha$  (P1 et P2) ont été clonées dans le vecteur d'expression pCMVscript avant que des essais luciférases ne soient

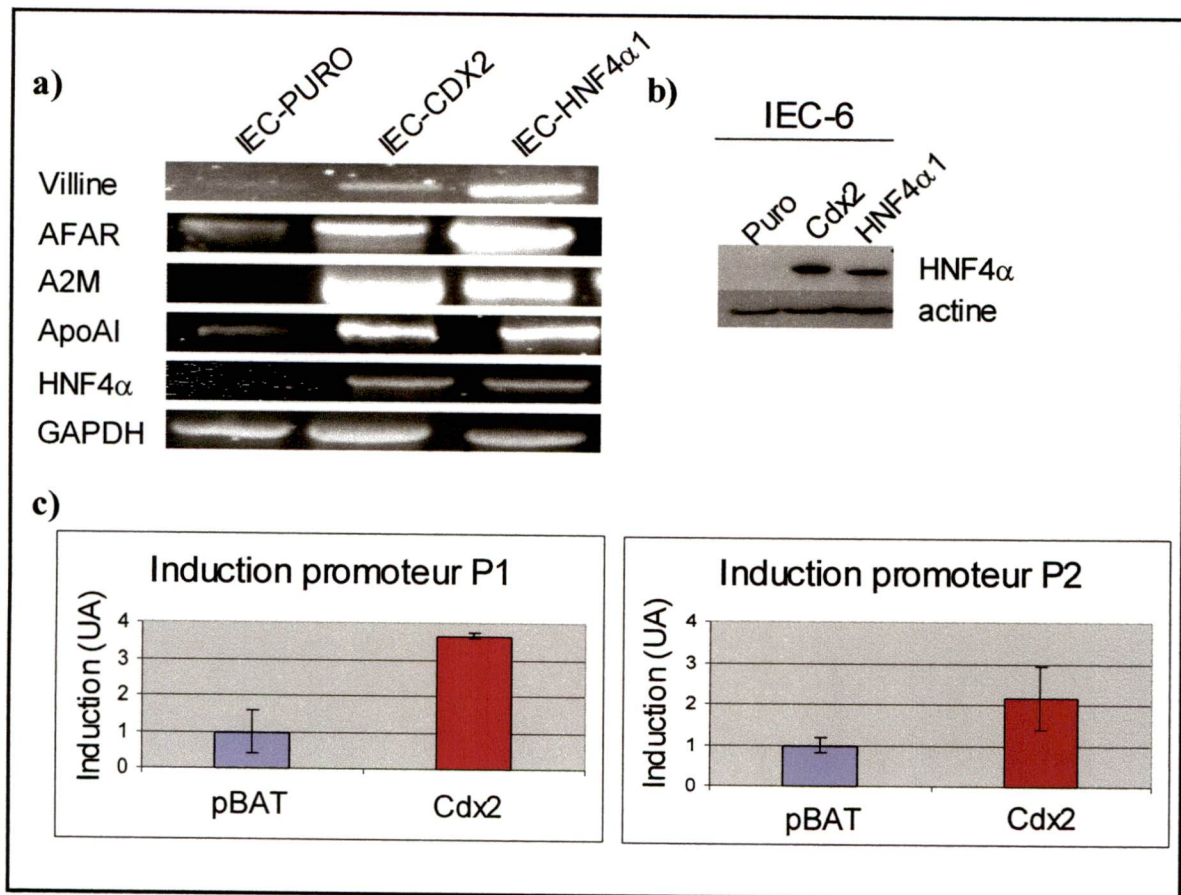
**Tableau 10 : Comparaison de l'effet de la surexpression de Cdx2 ou HNF4 $\alpha$ 1 dans les cellules IEC-6**

Suite à une étude par micropuces à ADN effectuées à partir de cellules surexprimant HNF4 $\alpha$ 1 ou Cdx2, nous avons comparé l'expression de différents gènes dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 et IEC-6 Cdx2. Chaque condition a été testée en triplicata et chaque gène a été retenu lorsque leur augmentation a été observée dans les trois conditions. Augm° : augmentation. Signalisation/comm. cellulaire : signalisation et communication cellulaire. Défense cell./organisme : défense de la cellule ou de l'organisme.

Les gènes surexprimés ont été classés en catégorie tel que décrit par Naïki et al (2002).

Augm° dans les cellules IEC-6						
Nom	Gène	HNF4α	Cdx2	Unigene	Catégorie	Sous-catégorie
Aflatoxin B1 aldehyde reductase	Afar	407,7	4,7	Rn.6043	Métabolisme	Homéostasie
Selenoprotein P plasma 1	Sepp1	377,0	7,0	Rn.1451	Métabolisme	Général
Cytochrome P450 3A9	CYP3A9	204,4	10,8	Rn.10489	Métabolisme	Lipide
Calbindin 3	Calb3	157,6	3,4	Rn.9974	Métabolisme	Transport
Apolipoprotein E	ApoE	81,6	11,9	Rn.32351	Métabolisme	Lipide
Apolipoprotein B	ApoB	49,0	5,1	Rn.33815	Métabolisme	Transport
4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase	Hpd	34,4	16,8	Rn.3664	Métabolisme	Acides Aminés
Plasmalipin	Z49858	14,4	3,7	Rn.1721	Métabolisme	Transport
GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein	Gchfr	11,5	3,2	Rn.11137	Métabolisme	Acides Aminés
ATP-binding cassette sub-family G (WHITE) member 1	Abcg1	11,3	15,2	Rn.8398	Métabolisme	Transport
Cytochrome P450 subfamily 4B polypeptide 1	Cyp4b1	10,7	6,4	Rn.86651	Métabolisme	Général
Dual oxidase 2	Duox2	9,2	3,0	Rn.55542	Métabolisme	Lipide
Carbonic anhydrase 2	Ca2	5,8	7,6	Rn.26083	Métabolisme	Général
Lipase A lysosomal acid	Lipa	4,1	2,0	Rn.48656	Métabolisme	Lipide
Protein kinase (cAMP dependent catalytic) inhibitor beta	Pkib	304,9	6,1	Rn.9748	Métabolisme	Général
Lectin galactose binding soluble 4	Lgals4	235,7	34,5	Rn.9656	Signalisation/comm. cellulaire	Modulateurs/effecteurs
Mucin and cadherin-like	Mucdhl	21,2	3,5	Rn.18860	Signalisation/comm. cellulaire	Adhésion cellulaire
ATPase Na+/K+ transporting beta 1 polypeptide	Atp1b1	11,3	2,9	Rn.8925	Signalisation/comm. cellulaire	Adhésion cellulaire
Protein tyrosine phosphatase receptor type R	Ptpr	8,9	6,6	Rn.6277	Signalisation/comm. cellulaire	Protéines de transport/canaux
S6 protein kinase (Rsk-1)	Rps6ka1	8,7	2,7	Rn.34915	Signalisation/comm. cellulaire	Modulateurs/effecteurs
Progressive ankylosis	Ank	7,3	5,4	Rn.81030	Signalisation/comm. cellulaire	Protéines de transport/canaux
Lectin galactoside-binding soluble 2 (galectin 2)	Lgals2	7,2	4,6	Rn.2982	Signalisation/comm. cellulaire	Adhésion cellulaire
G protein-coupled receptor kinase 5	Gprk5	6,9	4,1	Rn.6500	Signalisation/comm. cellulaire	Modulateurs/effecteurs
Protein kinase lysine deficient 4	Prkwnk4	6,4	38,5	Rn.6985	Signalisation/comm. cellulaire	Modulateurs/effecteurs
Cadherin 2	Cdh2	6,1	7,6	Rn.23200	Signalisation/comm. cellulaire	Adhésion cellulaire
Endothelial PAS domain protein 1	Epas1	5,3	9,4	Rn.55138	Signalisation/comm. cellulaire	Modulateurs/effecteurs
Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2	Celstr2	4,6	2,3	Rn.48666	Signalisation/comm. cellulaire	Adhésion cellulaire
Glutathione synthetase	Gss	4,4	2,6	Rn.1692	Signalisation/comm. cellulaire	Protéines de transport/canaux
Occludin	Ocln	4,2	7,2	Rn.31429	Signalisation/comm. cellulaire	Adhésion cellulaire
Dopa/tyrosine sulfotransferase	LOC64305	289,3	29,4	Rn.1183	Défense cell./organisme	Homéostasie
T-kininogen	Kng	84,8	7,2	Rn.54394	Défense cell./organisme	Immunologie

Nom	Augm° dans les cellules IEC-6				Unigene	Catégorie	Sous-catégorie
	Gène	HNF4 $\alpha$	Cdx2				
ATP-binding cassette protein G2	Abcg2	15,5	2,9	Rn.13131	Défense cell./organisme	Général	
Alpha-2-macroglobulin	A2m	11,0	9,9	Rn.780	Défense cell./organisme	Immunologie	
Interleukin 4 receptor	Il4r	10,8	4,8	Rn.10471	Défense cell./organisme	Immunologie	
Lipopolysaccharide binding protein	Lbp	3,7	5,5	Rn.48863	Défense cell./organisme	Immunologie	



**Figure 21 : Impact de la surexpression de Cdx2 sur l'expression de HNF4α**

**a)** Analyse comparative par RT-PCR de l'expression de différentes cibles de HNF4α1 et Cdx2 comparativement à des cellules non différenciées (IEC-6 puro) dans des cellules nouvellement confluentes. **b)** Analyse par immunobuvardage de l'expression de HNF4α dans les cellules IEC-6 HNF4α1 et IEC-6 Cdx2 nouvellement confluentes. **c)** Analyse par essais luciférase dans des cellules Caco-2/15 de l'impact de Cdx2 sur l'induction des promoteurs codant pour les différentes isoformes de HNF4α, 36 heures après la transfection. Les inductions sont représentés par rapport au vecteur vide.



dans des cellules Caco-2/15 en présence ou non de Cdx2. Ces tests ont montré que Cdx2 était suffisant pour induire la surexpression des isoformes issues du promoteur P1 qui code pour les isoformes HNF4 $\alpha$ 1 à HNF4 $\alpha$ 6. En revanche l'effet de Cdx2 sur les isoformes issues du promoteur P2 semble modéré ou nul (figure 21c).

## **Discussion**

L'épithélium intestinal tient une place majeure dans l'organisme de par son rôle dans la digestion et l'absorption des nutriments. Sa structure hautement différenciée est caractérisée par une polarisation suivant des axes antéro-postérieur et apico-basal tandis que les cellules intestinales, notamment les entérocytes, sont caractérisées par une grande spécificité de fonction, que ce soit pour leur activité métabolique ou leur fort potentiel d'absorption et de sécrétion. Dans l'intestin grêle, les cellules épithéliales intestinales non différenciées situées au niveau de la crypte vont se différencier au cours de leur migration vers les villosités où elles vont devenir pleinement actives. Malgré l'existence de nombreuses études portant sur la différenciation et le métabolisme intestinal, les mécanismes impliqués dans ces phénomènes sont encore incomplètement connus.

La protéine HNF4 $\alpha$  est un récepteur nucléaire principalement exprimé dans le foie, le pancréas et les organes du tractus digestif. A l'heure actuelle, neuf isoformes différentes de la protéine HNF4 $\alpha$  sont connues, la répartition et l'expression de ces isoformes variant suivant chaque organe. Les études menées sur HNF4 $\alpha$  dans le foie et le pancréas ont montré le rôle prépondérant de cette protéine dans les mécanismes de différenciation ainsi que, d'un point de vue plus cellulaire, dans le métabolisme et l'induction des jonctions cellulaires (Hayhurst *et al.*, 2001; Chiba *et al.*, 2003; Satohisa *et al.*, 2005). Tanaka *et al.* (2006) ont pu observer que les cellules intestinales exprimaient des isoformes issues des deux

promoteurs P1 et P2 du gène HNF4 $\alpha$  tandis que Stegman *et al.* (2006) ont pu mettre en évidence que l'expression des protéines HNF4 $\alpha$  était localisée aux deux tiers supérieurs de la crypte et dans la villosité. L'importance des protéines HNF4 $\alpha$  dans l'intestin a été mise en évidence par Garrison *et al.* (2006) qui ont pu observer une disparition des cryptes coloniques ainsi qu'une diminution des cellules à mucus après une inactivation spécifique du gène HNF4 $\alpha$  dans le colon foetal. Parallèlement, l'inactivation de HNF4 $\alpha$  chez la souris provoque la mort *in utero*. Les rôles de la protéine HNF4 $\alpha$  dans l'intestin sont encore obscurs et peu de ses cibles ont été identifiées. Nous avons donc voulu mieux connaître les rôles et les fonctions de cette protéine en surexprimant HNF4 $\alpha$ 1 dans des cellules épithéliales intestinales non différenciées de type IEC-6.

## **1 – Identification de nouvelles cibles de HNF4 $\alpha$ 1**

L'utilisation de micropuces à ADN a permis de constater qu'un nombre très important de gènes voyait leur expression modifiée par HNF4 $\alpha$ 1. Les études menées précédemment dans le foie et le pancréas ont déjà mis en évidence que la protéine HNF4 $\alpha$  est un transactivateur très puissant. A titre de comparaison, plusieurs études ont permis d'observer la modification d'expression de 65, 62 et 278 gènes lors de la surexpression de HNF4 $\alpha$ 2 dans des cellules de carcinome rénal HEK293, de foie HepG2 ou de pancréas INS-1 respectivement (Thomas *et al.*, 2001; Naiki *et al.*, 2002; Lucas *et al.*, 2005). Parallèlement, Odom *et al.* (2004) ont mis en évidence que la protéine HNF4 $\alpha$  pouvait lier les promoteurs de 910

gènes dans les hépatocytes et de 758 gènes dans des cellules de pancréas, soit beaucoup plus que ce qui est généralement observé pour d'autres facteurs de transcription, tout en formant un réseau d'activation transcriptionnel avec les protéines HNF1 et HNF6. L'induction par HNF4 $\alpha$ 1 d'un nombre important de gènes dans les cellules intestinales est donc tout à fait représentatif de ce qui a pu être observé précédemment. Il est toutefois possible que certaines inductions soient effectuées indirectement.

De façon plus particulière, toutes les études ont rapporté une augmentation plus importante de gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire, comme nous avons pu le constater dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 (Thomas *et al.*, 2001; Naiki *et al.*, 2002; Lucas *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter dans nos résultats que plusieurs familles de protéines sont largement régulées par HNF4 $\alpha$ 1, telles les protéines de transport de soluté (SLC), les cytochromes, les apolipoprotéines ainsi que les protéines possédant une cassette de liaison de l'ATP (ABC). Ces protéines sont généralement impliquées dans le transport cellulaire ou des phénomènes de détoxification. L'induction de ces protéines par HNF4 $\alpha$ 1, comme cela a déjà été observé dans d'autres organes (Popowski *et al.*, 2005; Abrahamsson *et al.*, 2005; Sumi *et al.*, 2007) laisse supposer que HNF4 $\alpha$ 1 peut réguler de façon universelle des gènes de ces familles, indépendamment de l'organe étudié, avec toutefois des variations locales dans les membres induits.

Nos résultats obtenus par l'utilisation de micropuces à ADN montrent une augmentation d'expression de nombreux gènes impliqués dans le contrôle du métabolisme, particulièrement lipidique. Récemment, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle clé de l'intestin dans le métabolisme lipidique puisqu'il permet l'absorption des lipides ingérés avant la sécrétion dans la circulation générale (Kruit *et al.*, 2006). En effet, les mécanismes intestinaux impliqués dans le transport, l'absorption ou la sécrétion de lipides sont différents du côté apical et du côté baso-latéral des cellules intestinales. Les résultats obtenus par RT-PCR et dans les analyses de micropuces à ADN nous ont permis d'observer une augmentation d'expression des gènes codant pour ABCA1 et pour les apolipoprotéines A1 et B qui sont impliquées dans la sécrétion et le transport des triglycérides, esters de cholestérol et des HDL du côté baso-latéral des cellules intestinales (Hui et Howles, 2005). De plus, on peut noter dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 une augmentation d'expression de la protéine « Scavenger Receptor BI » (SRBI) qui est particulièrement exprimée au niveau de la bordure en brosse des cellules villositaires et est impliquée dans la capture et le transport intracellulaire de lipides (Cai *et al.*, 2001). A l'opposé, l'expression des protéines ABCG5 et ABCG8, impliquées dans l'efflux de cholestérol dans la lumière intestinale, ne varient pas, ce qui laisse supposer que HNF4 $\alpha$ 1 régule principalement l'expression de gènes impliqués dans la sécrétion et le transport de lipides vers la circulation sanguine générale. Bien que les gènes codant pour NPC1L1, ACAT2, SARA2 et MTP ne soient pas présents sur les micropuces à ADN, Sheena *et al.* (2005) ont montré que HNF4 $\alpha$  contrôle directement l'expression de la MTP, ce qui pourrait

conforter l'hypothèse que HNF4 $\alpha$ 1 interviendrait principalement au niveau de la préparation des triglycérides, esters de cholesteryl et les HDL pour la sécrétion du côté baso-latéral des entérocytes. Pascussi *et al.* (2007) ont montré que HNF4 $\alpha$  régulait l'expression du récepteur constitutif aux androstanes (CAR), qui est important pour le contrôle du métabolisme lipidique et la détoxification cellulaire. Pourtant, les micropuces à ADN ne nous permettent pas d'observer une variation de l'expression de CAR. La régulation de CAR par HNF4 $\alpha$ 1 semble donc restreinte au foie.

L'activité intestinale est caractérisée par un flux constant de molécules de la lumière intestinale vers la circulation générale. La surexpression de HNF4 $\alpha$ 1 induit une variation d'expression de nombreux gènes impliqués dans le transport cellulaire, notamment des membres de la famille des protéines transporteuses de soluté (SLC), l'aquaporine 11, ou les apolipoprotéines. En plus de participer à de nombreux mécanismes métaboliques, HNF4 $\alpha$ 1 participerait aussi au transport de molécules à travers les cellules intestinales, et ce pour des molécules qui ne sont pas forcément lipidiques. Plusieurs gènes fortement surexprimés dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 n'ont pas été décrits comme des cibles potentielles de HNF4 $\alpha$ , telles les gènes codants pour les protéines AFAR ou Lgls4 surexprimées 407 fois et 235 fois respectivement.

Finalement, parmi les gènes surexprimés, il est intéressant de noter que le gène codant pour *prkaa2*, une sous-unité catalytique de l'AMPK, est surexprimé 72 fois

dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1. Les études menées par immunobuvardage et essais luciférase mettent en évidence une régulation directe de l'AMPK par HNF4 $\alpha$ 1, ce qui n'avait encore jamais été démontré. Malgré le nombre important d'études portant sur l'activation et les cibles de l'AMPK, aucun inducteur de l'expression d'une sous-unité de l'AMPK n'a été identifié. HNF4 $\alpha$ 1 serait donc le premier régulateur transcriptionnel identifié de l'AMPK, via l'induction de *prkaa2*.

L'utilisation des micropuces à ADN nous a donc permis de confirmer le rôle important joué par HNF4 $\alpha$ 1 dans les cellules intestinales, notamment de par le nombre important de gènes régulés. HNF4 $\alpha$ 1 semble aussi être une protéine clé dans le contrôle du métabolisme lipidique, particulièrement au niveau du contrôle de l'expression de protéines impliquées dans le transport et la sécrétion de lipides. Finalement, ces micropuces nous ont permis d'identifier le premier régulateur transcriptionnel d'une des sous-unités de l'AMPK.

## **2 – HNF4 $\alpha$ 1 et le métabolisme cellulaire**

Malgré l'augmentation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, on constate que bien qu'il y ait augmentation de la synthèse lipidique il n'y a pas de changement dans le niveau de sécrétion. De plus, bien que PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  soient des protéines clé dans le contrôle du métabolisme lipidique, il n'est pas possible d'observer de variation d'expression de ces deux protéines, ce qui laisse supposer que HNF4 $\alpha$ 1 peut influencer le

métabolisme lipidique intestinal de façon indépendante de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ . L'augmentation de la synthèse lipidique est probablement due à l'augmentation d'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et/ou l'import de lipides dans la cellule, comme SRBI par exemple. L'AMPK, régulée notamment par le ratio intracellulaire ADP/ATP et LKB1, est une protéine clé dans le contrôle métabolique cellulaire, notamment le métabolisme lipidique (Hardie, 2005). Il est donc possible qu'une partie de l'activité métabolique induite par HNF4 $\alpha$ 1 soit partiellement relayée par l'AMPK. De façon intéressante, l'AMPK a un impact négatif sur la synthèse lipidique et sur l'activité de HNF4 $\alpha$ , via la phosphorylation de la sérine 304, tandis que HNF4 $\alpha$ 1 induit la synthèse lipidique et l'expression de l'AMPK. Ces mécanismes laissent supposer une régulation très fine du métabolisme, notamment lipidique, ainsi qu'une boucle de contrôle activation/expression entre HNF4 $\alpha$ 1 et l'AMPK. L'absence de sécrétion lipidique peut possiblement s'expliquer par le système de culture utilisé. La sécrétion de lipides repose sur un système intestinal polarisé avec une circulation des lipides du lumen intestinal vers la circulation générale. La culture cellulaire sur plastique ou matrice ne permet pas une polarisation cellulaire comparable à celle observée dans l'intestin. L'absence de sécrétion de lipides est peut être due à ce défaut de polarisation ou à une différenciation incomplète, même si HNF4 $\alpha$ 1 augmente la résistance transépithéliale et induit une modification de la morphologie cellulaire. Carrière *et al.* (2005) ont mis en évidence un contrôle de l'apolipoprotéine A-IV par les lipides dans des cellules intestinales lors de l'ajout de micelles du côté apical. Ces expériences menées dans des puits de culture



contenant des filtres ont montré que la protéine ApoAIV pouvait être sécrétée dans ces conditions. La culture de nos cellules sur des puits de culture de type Transwell® ou sur des matrices aurait peut-être permis d'obtenir un effet beaucoup plus représentatif d'un intestin normal. Il est intéressant de noter que la culture de nos cellules sur matrigel a permis un renforcement du phénotype différencié avec notamment une présence accrue de microvillosités. De même que des cultures sur Transwell®, la culture des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 sur du matrigel permettrait d'avoir une représentation plus adéquate de l'état de la régulation par HNF4 $\alpha$ 1 de la synthèse et sécrétion lipidique intestinale. Il est donc possible qu'une différenciation accrue aurait menée à une augmentation de la sécrétion des lipides.

Parallèlement à l'augmentation de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme, nos observations ont montré que le milieu de culture des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 devenait plus rapidement acide, ce qui montre que ces cellules sont métaboliquement plus actives. Plusieurs études ont montré que HNF4 $\alpha$ 1 contrôlait plusieurs protéines impliquées dans le contrôle du métabolisme glucidique, tel que le récepteur à l'insuline dans le pancréas, et que son absence était suffisante pour induire une forme de diabète (Bartoov-Shifman *et al.*, 2002). Les études menées par micropuces à ADN permettent d'observer une augmentation de l'expression du récepteur à l'insuline (2,3x) dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1, ce qui laisse supposer que HNF4 $\alpha$ 1 possède un rôle dans le métabolisme des sucres dans les cellules intestinales comme dans les cellules

pancréatiques. L'augmentation d'expression du métabolisme du glucose via l'induction du récepteur à l'insuline, ainsi que l'augmentation du métabolisme cellulaire en général, peut probablement expliquer l'acidification du milieu.

L'augmentation par HNF4 $\alpha$ 1 de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique n'est pas suffisante pour induire une sécrétion accrue de lipides, ce qui laisse supposer que HNF4 $\alpha$ 1 ne peut induire seule la sécrétion lipidique et nécessite la collaboration d'autres protéines. On peut toutefois noter que HNF4 $\alpha$ 1 peut influencer sur le métabolisme glucidique tout comme dans le pancréas.

### **3 - HNF4 $\alpha$ 1 et la différenciation intestinale**

Suite à l'expression de HNF4 $\alpha$ 1 dans des cellules IEC-6, de nombreuses observations confortent l'hypothèse d'un rôle important de HNF4 $\alpha$  dans la différenciation intestinale. Les effets les plus facilement observables de la surexpression de HNF4 $\alpha$ 1 dans les cellules IEC-6 sont la modification de la forme cellulaire et l'apparition de microvillosités qui sont caractéristiques de cellules différenciées. Nos résultats rejoignent les observations faites lors de précédentes études qui montrent le rôle clé de HNF4 $\alpha$  dans la différenciation et le métabolisme hépatique (Li *et al.*, 2000; Chiba *et al.*, 2003; Battle *et al.*, 2006). Récemment, Chiba *et al.* (2006) ont observé que HNF4 $\alpha$  influençait la formation de microvillosités dans des cellules de carcinome embryonnaire de souris F9, tout en

prouvant que HNF4 $\alpha$  induisait une réorganisation du réseau d'actine en induisant l'expression de la protéine EBP50 (SCL9A3R1). Les protéines de la famille des Ezrine/radixine/moesine, dont fait partie EBP50 et E3KARP, sont des composants des microvillosités et se lient aux filaments d'actine. Bien qu'EBP50 ne soit pas présente dans nos micropuces à ADN, les résultats obtenus permettent d'observer que plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans l'organisation des faisceaux d'actine ont leur expression modifiée dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1. On pourra particulièrement noter la surexpression de la protéine E3KARP (SLC9A3R2 ; augmentée 2,2x) qui possède des fonctions similaires à EBP50 (SLC9A3R1). EBP50 et E3KARP sont toutes les deux exprimées dans l'intestin, avec une forte prédominance de EBP50 au niveau de la bordure en brosse (Ingraffea *et al.*, 2002). Les protéines Stmn2 (diminuée 28,1x) et midline1 (diminuée 5,2x) interviennent au niveau de la régulation de la formation des structures d'actine tandis que la protéine Map1b (diminuée 9,4x) joue un rôle important dans la stabilisation des microtubules. On peut aussi observer une surexpression de la villine, confirmée par RT-PCR, qui est habituellement localisée dans la bordure en brosse des microvillosités intestinales et rénales et qui est utilisée comme un marqueur de différenciation épithéliale intestinale (Athman *et al.*, 2002). On peut de plus observer une augmentation d'expression de la tropomoduline I (augmentée 15x). La tropomoduline I intervient principalement au niveau de la stabilisation de l'extrémité des filaments d'actine mais est généralement exprimée au niveau des cellules musculaires (Fischer et Fowler, 2003). Nos résultats, joints à ceux de Chiba *et al.* (2006), laissent supposer que

HNF4 $\alpha$ 1 peut réguler, directement ou non, l'expression d'une gamme de protéines impliquées dans la réorganisation des faisceaux d'actine au niveau des microvillosités ainsi que dans la modification de la forme des cellules, notamment via la régulation de l'expression de la villine, de EBP50 ou de protéines liées aux filaments d'actines.

Chiba *et al.* (2003), Satohisa *et al.* (2005) ainsi que Battle *et al.* (2006) ont déjà observé que la surexpression de HNF4 $\alpha$  pouvait induire la formation de jonctions en induisant l'expression de nombreuses protéines telles les claudines 6 et 7, l'occludine ou la protéine Jam A. Malgré l'absence d'augmentation de la résistance trans-épithéliale, nos résultats obtenus par l'utilisation de micropuces à ADN montrent que HNF4 $\alpha$ 1 induit une augmentation d'expression de nombreux gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire, tels l'occludine (augmentée 5,2x) ou la protéine Ccacam1 (augmentée 23,9x). Il est intéressant de noter que, d'après les analyses par micropuces à ADN, HNF4 $\alpha$ 1 semble n'affecter que l'expression de la claudine 18, contrairement à ce qui a été démontré précédemment (Satohisa *et al.*, 2005; Battle *et al.*, 2006). Forcet *et al.* (2005) ont suggéré que l'AMPK pouvait avoir un rôle dans la polarisation cellulaire suite à une induction par LKB1 tandis que Zheng *et al.* (2007) et Zhang *et al.* (2006) ont mis en évidence un rôle de l'AMPK dans la régulation des jonctions cellulaire et de la morphologie cellulaire. HNF4 $\alpha$ 1 pourrait donc induire une meilleure organisation des jonctions cellulaire soit directement, soit par le biais de la protéine AMPK.

Les récepteurs nucléaires sont généralement caractérisés par un réseau d'activation très complexe. De la même façon, HNF4 $\alpha$  interagit ou entre en compétition avec plusieurs récepteurs de type stéroïdien, telles que les protéines PPAR. L'augmentation d'expression de PPAR $\beta$  dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 est intéressante car PPAR $\beta$  joue notamment un rôle dans la différenciation intestinale, particulièrement au niveau du mécanisme de différenciation des cellules de Paneth, tandis que son expression suit un gradient d'expression croissant de la crypte vers la villosité (Varnat *et al.*, 2006). Finalement, RAR $\beta$ , dont l'expression est augmentée dans nos cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1, possède un rôle encore mal défini dans l'intestin. RAR $\beta$  interviendrait dans la stimulation de la différenciation de cellules Caco-2/15 induite par des traitements à l'acide rétinoïque (McCormack *et al.*, 1996). Comme dans les hépatocytes, HNF4 $\alpha$ 1 pourrait directement ou indirectement contrôler un réseau de régulateurs transcriptionnels, tels que PPAR $\beta$  et RAR $\beta$ , qui menèraient à un phénotype intestinal épithélial.

Toutefois, malgré l'apparition de microvillosités et la surexpression de protéines exprimées dans des cellules différenciées, il n'y a pas de modification d'expression des gènes codants pour la lactase, la sucrase-isomaltase ou la phosphatase alcaline, qui sont des enzymes normalement actives sur la bordure en brosse et caractéristiques de cellules intestinales pleinement différenciées. Les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 semblent donc caractérisées par l'apparition d'une bordure en brosse, une augmentation des jonctions serrées ainsi que la surexpression de nombreux gènes impliqués au niveau du métabolisme lipidique,

mais une différenciation incomplète malgré l'induction de plusieurs protéines impliquées dans des mécanismes de différenciation cellulaire. D'autres facteurs de transcription, tel que Cdx2 pourraient être responsables de parachever la différenciation intestinale.

HNF4 $\alpha$ 1 induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans la différenciation cellulaire tout en induisant une activité métabolique dans les cellules IEC-6 non différenciées. Toutefois, cela n'est pas suffisant pour induire une différenciation complète des cellules intestinales, malgré la surexpression des protéines AMPK, RAR $\beta$  ou PPAR $\beta$  ou l'augmentation de l'activité métabolique. On peut toutefois observer l'apparition de microvillosités et la formation de jonctions cellulaires plus denses, ce qui laisse supposer que HNF4 $\alpha$ 1 peut induire un début de différenciation intestinale, sans toutefois être suffisante pour que les cellules soient pleinement différenciées.

#### **4 – Activation de HNF4 $\alpha$ 1 par Cdx2**

Dans l'objectif de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la différenciation et le métabolisme intestinal, nous avons eu l'occasion d'effectuer des micropuces à ADN basées sur des cellules IEC-6 infectées avec les protéines HNF4 $\alpha$ 1 ou Cdx2. La protéine Cdx2 induit l'expression de gènes, tels la sucrase isomaltase, lors de la différenciation des cellules intestinales (Mutoh *et al.*, 2005). Toutefois, des études menées par Escaffit *et al.* (2006) ont montré que Cdx2 ne

parvenait à induire qu'une différenciation partielle dans des cellules HIEC, ce qui suggère que Cdx2 nécessite d'autres facteurs de transcription pour induire une différenciation terminale. La comparaison des gènes induits par Cdx2 et HNF4 $\alpha$ 1 nous a permis de constater une quantité importante de cibles communes. On notera, là aussi, une augmentation d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (apolipoprotéines), dans l'adhésion cellulaire (occludine, Lgal2, Cadhérine 2) et les mécanismes de transports de molécules. Le nombre relativement important de cibles communes peut s'expliquer par l'expression de HNF4 $\alpha$ 1 dans les cellules IEC-6 Cdx2. Les promoteurs de HNF4 $\alpha$ 1 sont induits par Cdx2 ce qui indique que HNF4 $\alpha$ 1 et Cdx2 font partie d'un réseau régulateur de la différenciation intestinale. Cdx2 et HNF4 $\alpha$ 1 étant impliquées toutes les deux dans des mécanismes de différenciation cellulaire, ainsi que dans plusieurs voies métaboliques, il est possible de conclure que ces protéines participent à des mécanismes similaires ou complémentaires et que HNF4 $\alpha$ 1 est une protéine probablement subordonnée à Cdx2. Au cours du développement, Garrison *et al.* (2006) et Silberg *et al.* (2000) ont montré que ces deux protéines étaient exprimées à peu près au même moment, au jour 9,5 *post-coïtum*. La régulation de HNF4 $\alpha$ 1 par Cdx2 peut permettre d'expliquer pourquoi HNF4 $\alpha$ 1 est incapable d'induire à elle seule une différenciation complète des cellules intestinales, plusieurs facteurs complémentaires tels que Cdx2 étant absent dans nos cellules. L'absence de différenciation complète dans les cellules intestinales exprimant HNF4 $\alpha$ 1 s'explique par le besoin de plusieurs facteurs dans les processus de différenciation intestinale, par exemple HNF4 $\alpha$ 1 et Cdx2. On peut aussi penser aux facteurs

HNF1, HNF3 et les protéines BMP ou les protéines GATA qui sont potentiellement impliqués dans des mécanismes de différenciation intestinale (Bossard et Zaret, 1998; Gao *et al.*, 1998). Les cellules intestinales expriment particulièrement les protéines GATA4, 5 et 6, avec GATA4 exprimé dans les entérocytes de la villosité, GATA5 dans les cellules de Paneth notamment et GATA 6 dans les cellules entéroendocrines (Dusing et Wiginton, 2005). Ces protéines semblent donc impliquées dans la spécification terminale des cellules intestinales, aussi peut-on supposer que GATA4, 5 et 6 sont les facteurs nécessaires pour une différenciation complète des cellules intestinales. .

L'apparition de cryptes déformées et réduites lors de l'inhibition de la voie des BMP par surexpression de la protéine Noggin (Haramis *et al.*, 2004) montre clairement que ces facteurs tiennent une place importante dans le déroulement des mécanismes de différenciation. Kosinski *et al.* (2007) ont aussi récemment démontré que les protéines BMP possédaient une répartition spécifique dans les cryptes intestinales tandis que Auclair *et al.* (2007) ont mis en évidence l'importance du récepteur BMPRIa dans la morphogenèse des cryptes, notamment dans le contrôle de la prolifération cryptale, ainsi que leur implication dans la différenciation des cellules sécrétrices. Ces résultats prouvent que la voie des BMP/Smads joue aussi un rôle important dans le contrôle de la morphogenèse intestinale.

En bref, les résultats obtenus semblent mettre en évidence une différenciation incomplète des cellules, avec l'apparition de microvillosités et un renforcement des jonctions cellulaires sans qu'il y ait établissement d'une polarisation et d'une



différenciation complète. La régulation par Cdx2 de l'expression de HNF4 $\alpha$ 1 laisse supposer que ces deux protéines peuvent être impliquées dans des mécanismes communs, plus particulièrement au niveau de la différenciation cellulaire. Toutefois, la protéine Cdx2 n'est pas suffisante pour induire une différenciation complète des cellules épithéliales intestinales, bien que nos observations montrent que les cellules IEC-6 Cdx2 présentent des modifications plus importantes que les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1. Ces observations laissent suggérer que d'autres protéines, telles GATA ou BMP par exemple, peuvent être impliqués dans la différenciation intestinale

## Conclusions générales et perspectives

HNF4 $\alpha$  est un récepteur nucléaire orphelin exprimé principalement dans le foie, le pancréas, et l'intestin. De nombreuses études ont mis en évidence son implication dans les mécanismes glucidiques et particulièrement son importance pour la prévention de l'apparition de certaines formes de diabète. Parallèlement, de nombreuses études basées sur des observations effectuées dans le foie ou sur des cultures cellulaires ont mis en évidence l'implication de HNF4 $\alpha$ 1 dans la régulation de nombreuses voies métaboliques, dont le métabolisme lipidique, ainsi que dans les phénomènes de différenciation cellulaire. Peu d'observations ont porté sur le rôle de HNF4 $\alpha$  dans l'intestin malgré l'expression de plusieurs isoformes de HNF4 $\alpha$ . Le but de cette étude a été d'identifier les rôles potentiels ainsi que de nouvelles cibles de HNF4 $\alpha$  dans un contexte intestinal. Nous avons utilisé pour cela des cellules épithéliales intestinales non différenciées IEC-6 dans lesquelles nous avons exprimé HNF4 $\alpha$ 1.

L'utilisation de micropuces à ADN nous a permis de constater que HNF4 $\alpha$ 1 était un transactivateur très puissant dans les cellules épithéliales intestinales et que de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme, l'adhésion cellulaire et le transport étaient surexprimés. En plus de l'augmentation de plusieurs gènes cibles de HNF4 $\alpha$  déjà identifiés (plusieurs apolipoprotéines notamment), on notera l'augmentation d'expression des gènes AFAR, impliqué dans la détoxification cellulaire, ou Lgals4 qui est impliqué dans l'adhésion cellulaire. Ces gènes n'ont

jamais été identifiés comme étant des cibles de HNF4 $\alpha$ . Plus particulièrement, la protéine *prkaa2*, sous-unité catalytique de l'AMPK est surexprimée 72 fois dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1. L'AMPK possède un rôle clé dans le contrôle du métabolisme et participerait à l'établissement des jonctions cellulaires. Elle pourrait de plus induire la différenciation de cellules indifférenciées. Notre étude a permis de confirmer la régulation de la sous-unité  $\alpha$ 2 de l'AMPK, par le biais d'une action sur son promoteur. Il reste toutefois à effectuer des études par mutagenèse dirigée et par gel de retard de migration afin de confirmer le site d'action spécifique de la protéine HNF4 $\alpha$ 1. L'AMPK et HNF4 $\alpha$ 1 sont toutes les deux des protéines impliquées dans des mécanismes cellulaires similaires, métabolisme, contrôle de l'établissement de jonctions cellulaires. De plus leur activation ou leur expression varie suivant la diète. Il semble donc logique de penser que ces deux protéines interviennent dans les mêmes voies cellulaires. Dans le but de mieux définir la relation entre ces deux protéines, il serait intéressant de regarder si cette induction d'expression est spécifique à l'intestin ou si elle peut aussi être observée au niveau du foie. Malgré l'absence de modification de la phosphorylation de thréonine 172 de l'AMPK, nous ne savons pas quelle est l'impact de la surexpression de la sous unité *prkaa2* sur l'activation de cibles de l'AMPK, telle la protéine mTOR. Il serait donc intéressant d'explorer de façon plus approfondie l'impact de la surexpression de l'AMPK dans l'intestin et sa relation avec HNF4 $\alpha$ .

En plus de nous aider à l'identification de nouvelles cibles de HNF4 $\alpha$ 1, les micropuces à ADN nous ont permis de constater que HNF4 $\alpha$ 1 et Cdx2 possédaient de nombreuses cibles communes puisque HNF4 $\alpha$  est induit dans les cellules exprimant Cdx2. Les études menées par essais luciférase nous ont permis de montrer que la protéine Cdx2 induisait l'expression des isoformes issues du promoteur P1 et peut être du promoteur P2 du gène HNF4 $\alpha$ . Cdx2 et HNF4 $\alpha$ 1 étant tous deux impliqués dans des mécanismes de différenciation cellulaire, on peut supposer que ces deux protéines font partie d'un réseau d'activation nécessaire à la différenciation intestinale. Plusieurs isoformes de HNF4 $\alpha$ 1 sont exprimées dans l'intestin, aussi il serait intéressant d'étudier quelles isoformes sont induites par Cdx2 dans les cellules intestinales. Des expériences de mutagenèse nous permettraient aussi d'identifier le site d'action de Cdx2 sur le promoteur P1 de HNF4 $\alpha$ . Finalement, l'utilisation de séquences antisens dirigées contre HNF4 $\alpha$  dans les cellules exprimant Cdx2 nous permettrait d'évaluer de façon plus précise les gènes régulés par Cdx2 et HNF4 $\alpha$ .

Parallèlement à l'identification de nouvelles cibles de HNF4 $\alpha$ 1, nous avons voulu déterminer son action sur les processus de différenciation intestinale. Les études menées par microscopie électronique nous ont permis d'observer des modifications morphologiques importantes chez les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1. Particulièrement, nous avons pu noter l'apparition de microvillosités sur ces cellules, avec parfois des modifications de leur forme et la présence de quelques empilements. L'activation de nombreuses enzymes impliquées dans le

métabolisme, notamment lipidique, ainsi que les modifications morphologiques observées suggèrent que les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 ont entamé un processus de différenciation. De plus, nous avons pu observer que les jonctions cellulaires étaient mieux organisées suite à l'augmentation de HNF4 $\alpha$ 1. Toutefois, malgré ces modifications, les cellules IEC-6 n'ont pu se différencier totalement, les enzymes de la bordure en brosse n'étant par exemple pas exprimées, et nous n'avons pu observer de polarisation complète de ces cellules, malgré une augmentation de la résistance transépithéliale. Ces observations suggèrent que HNF4 $\alpha$ 1 est suffisant pour induire un début de différenciation sans toutefois pouvoir induire une maturation complète des cellules intestinales. Les expériences de culture sur matrice ont permis de constater une différenciation accrue des cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1. Afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes de différenciation, il serait intéressant d'effectuer des cultures de cellules IEC-6 sur des matrices ou des microfiltres afin de pouvoir obtenir une polarisation dans le milieu dans la culture, comme cela est observé *in vivo*. Il serait de plus instructif d'effectuer des expériences de co-infections HNF4 $\alpha$ 1 et Cdx2 ainsi que des protéines déjà connues pour être impliquées dans la différenciation intestinale telles que les protéines GATA ou les protéines BMP et SMADs. L'obtention de cellules plus différenciées permettrait de plus d'avoir une meilleure compréhension du métabolisme lipidique et d'avoir une sécrétion normale. Parallèlement, les protéines impliquées dans les modifications des jonctions cellulaires n'ont pas été identifiées dans notre modèle. Il serait donc nécessaire d'effectuer une étude plus approfondie des protéines impliquées dans la formation

et le maintien des jonctions cellulaires. Il serait intéressant d'observer en premier la localisation et l'expression de protéines déjà régulées par HNF4 $\alpha$ 1, telles certaines protéines JAM et l'occludine. Finalement, nos modèles cellulaires n'expriment que l'isoforme HNF4 $\alpha$ 1, contrairement aux cellules intestinales qui expriment plusieurs isoformes. La coexpression des isoformes HNF4 $\alpha$ 1 et HNF4 $\alpha$ 7 dans les cellules IEC-6 permettrait d'observer si les différentes isoformes de HNF4 $\alpha$  peuvent induire une synergie d'activité et mener à une différenciation plus importante.

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Claude Asselin pour sa patience et son aide dans l'accomplissement de mon doctorat, son soutien financier, ainsi que pour ses nombreux encouragements et conseils. Je remercie aussi les Dr Nathalie Rivard et François Boudreau pour leur aide et leur secours précieux dans des moments difficiles.

Je remercie aussi les membres du Jury pour les temps et leur aide ainsi que pour leurs commentaires constructifs dans la rédaction de ma thèse.

Je tiens aussi à remercier mes parents et ma famille pour les sacrifices consentis, leur aide et leur compréhension, malgré l'éloignement, ainsi que mes amis français qui me seront restés indéfectibles malgré, parfois, le manque de nouvelles.

Il serait ingrat de ma part de ne pas remercier Denis Martel, Léonid Volkov et Anne Vézina pour leur contribution à mes travaux, leurs conseils techniques et le temps passé à répondre à mes innombrables questions.

Un clin d'œil est de mise pour tous mes partenaires de laboratoire, Mylène Blais, Andréane Cartier, Evelyne Roy, Antony Rémillard et Naomie Turgeon notamment, qui m'ont aidé à traverser les heures noires et fait bénéficier de leur aide ainsi que les stagiaires qui m'ont aidé au cours de ce doctorat,

particulièrement Audrey Fortier et Marie-Eve Morin. Tout particulièrement, un chaleureux merci à Hugo Garneau, Christian Bellehumeur et Sébastien Mongrain, merveilleux complices, pour m'avoir permis de m'intégrer aussi bien au Québec et pour leur instruction intensive des sacres québécois.

Merci aussi à Jean-Claude Honoré et Isabelle Renaud, Annie Larouche et Martin Savard, Lettie et Bertrand. Je ne peux pas résumer tout ce que je vous dois dans une thèse, un autre volume serait nécessaire, sachez toutefois que je ne l'oublie pas. Merci encore à Annie de m'avoir prouvé sans ambiguïté que oui le Québec possède sa propre gastronomie et que non elle ne se limite pas à la poutine. Ces heures passées aux fourneaux n'auront pas été inutiles.

Je remercie également Stéphanie Bellefleur, Marie Perrin et Geneviève Coulombe pour leur affection et leur support moral.

Merci aussi aux « matantes » et Emilie d'être ma famille d'adoption et pour les innombrables parties de cartes.

Finalement, je remercie tout le corps professoral et les étudiants du département d'anatomie et biologie cellulaire qui ont su faciliter mon travail au cours de ces années. Merci aussi à Suzanne Topping et Christiane Gauvin-Ducharme pour leur formidable travail au secrétariat. Finalement, merci aussi au Dr Jacques Bérard pour m'avoir offert l'opportunité de commencer mon doctorat et pour son soutien financier.



## Bibliographie

- Abrahamsson A., Gustafsson, U., Ellis, E., Nilsson, L. M., Sahlin, S., Bjorkhem, I. et Einarsson, C. (2005) Feedback regulation of bile acid synthesis in human liver: importance of HNF-4alpha for regulation of CYP7A1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330, 395 - 399.
- Antes T. J. et Levy-Wilson, B. (2001) HNF-3 beta, C/EBP beta, and HNF-4 act in synergy to enhance transcription of the human apolipoprotein B gene in intestinal cells, *DNA Cell Biol.*, 20, 67 - 74.
- Athman R., Louvard, D. et Robine, S. (2002) The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. III. How is villin involved in the actin cytoskeleton dynamics in intestinal cells?, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 283, G496 - G502.
- Auclair B. A., Benoit, Y. D., Rivard, N., Mishina, Y. et Perreault, N. (2007) Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage, *Gastroenterology*, 133, 887 - 896.
- Avraham K. B., Prezioso, V. R., Chen, W. S., Lai, E., Sladek, F. M., Zhong, W., Darnell, J. E., Jr., Jenkins, N. A. et Copeland, N. G. (1992) Murine chromosomal location of four hepatocyte-enriched transcription factors: HNF-3 alpha, HNF-3 beta, HNF-3 gamma, and HNF-4, *Genomics*, 13, 264 - 268.
- Baas A. F., Kuipers, J., van der Wel, N. N., Batlle, E., Koerten, H. K., Peters, P. J. et Clevers, H. C. (2004a) Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD, *Cell*, 116, 457 - 466.
- Baas A. F., Smit, L. et Clevers, H. (2004b) LKB1 tumor suppressor protein: PARTaker in cell polarity, *Trends Cell Biol.*, 14, 312 - 319.
- Bailly A., Torres-Padilla, M. E., Tinel, A. P. et Weiss, M. C. (2001) An enhancer element 6 kb upstream of the mouse HNF4alpha1 promoter is activated by glucocorticoids and liver-enriched transcription factors, *Nucleic Acids Res.*, 29, 3495 - 3505.
- Bartoov-Shifman R., Hertz, R., Wang, H., Wollheim, C. B., Bar-Tana, J. et Walker, M. D. (2002) Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 alpha, *J. Biol. Chem.*, 277, 25914 - 25919.
- Battle M. A., Konopka, G., Parviz, F., Gaggl, A. L., Yang, C., Sladek, F. M. et Duncan, S. A. (2006) Hepatocyte nuclear factor 4alpha orchestrates

- expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103, 8419 - 8424.
- Batts L. E., Polk, D. B., Dubois, R. N. et Kulesa, H. (2006) Bmp signaling is required for intestinal growth and morphogenesis, *Dev. Dyn.*, 235, 1563 - 1570.
- Beck F. (2004) The role of Cdx genes in the mammalian gut, *Gut*, 53, 1394 - 1396.
- Beck F., Erler, T., Russell, A. et 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 G., Malewicz, M. et Perlmann, T. (2004) Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies, *Trends Cell Biol.*, 14, 369 - 376.
- Bogan A. A., Dallas-Yang, Q., Ruse, M. D., Jr., Maeda, Y., Jiang, G., Nepomuceno, L., Scanlan, T. S., Cohen, F. E. et Sladek, F. M. (2000) Analysis of protein dimerization and ligand binding of orphan receptor HNF4alpha, *J. Mol. Biol.*, 302, 831 - 851.
- Boj S. F., Parrizas, M., Maestro, M. A. et Ferrer, J. (2001) A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 14481 - 14486.
- Bossard P. et Zaret, K. S. (1998) GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation, *Development*, 125, 4909 - 4917.
- Boucher M. J., Laprise, P. et Rivard, N. (2005) Cyclic AMP-dependent protein kinase A negatively modulates adherens junction integrity and differentiation of intestinal epithelial cells, *J. Cell. Physiol.*, 202, 178 - 190.
- Boudeau J., Baas, A. F., Deak, M., Morrice, N. A., Kieloch, A., Schutkowski, M., Prescott, A. R., Clevers, H. C. et Alessi, D. R. (2003) MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm, *EMBO J.*, 22, 5102 - 5114.
- Boulanger J., Vezina, A., Mongrain, S., Boudreau, F., Perreault, N., Auclair, B. A., Laine, J., Asselin, C. et Rivard, N. (2005) Cdk2-dependent phosphorylation of homeobox transcription factor CDX2 regulates its nuclear translocation and proteasome-mediated degradation in human intestinal epithelial cells, *J. Biol. Chem.*, 280, 18095 - 18107.
- Briançon N., Bailly, A., Clotman, F., Jacquemin, P., Lemaigre, F. P. et Weiss, M. C. (2004) Expression of the alpha7 isoform of hepatocyte nuclear factor (HNF) 4 is activated by HNF6/OC-2 and HNF1 and repressed by HNF4alpha1 in the liver, *J. Biol. Chem.*, 279, 33398 - 33408.

- Bu H., Kashireddy, P., Chang, J., Zhu, Y. T., Zhang, Z., Zheng, W., Rao, S. M. et Zhu, Y. J. (2004) ERBP, a novel estrogen receptor binding protein enhancing the activity of estrogen receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317, 54 - 59.
- Cai S. F., Kirby, R. J., Howles, P. N. et Hui, D. Y. (2001) Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine, *J. Lipid Res.*, 42, 902 - 909.
- Camarero N., Mascaro, C., Mayordomo, C., Vilardell, F., Haro, D. et Marrero, P. F. (2006) Ketogenic HMGCS2 Is a c-Myc target gene expressed in differentiated cells of human colonic epithelium and down-regulated in colon cancer, *Mol. Cancer Res.*, 4, 645 - 653.
- Carriere V., Vidal, R., Lazou, K., Lacasa, M., Delers, F., Ribeiro, A., Rousset, M., Chambaz, J. et Lacorte, J. M. (2005) HNF-4-dependent induction of apolipoprotein A-IV gene transcription by an apical supply of lipid micelles in intestinal cells, *J. Biol. Chem.*, 280, 5406 - 5413.
- Chawengsaksophak K., James, R., Hammond, V. E., Kontgen, F. et Beck, F. (1997) Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice, *Nature*, 386, 84 - 87.
- Chen W. S., Manova, K., Weinstein, D. C., Duncan, S. A., Plump, A. S., Prezioso, V. R., Bachvarova, R. F. et Darnell, J. E., Jr. (1994) Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos, *Genes Dev.*, 8, 2466 - 2477.
- Cheng H. et 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.
- Chiba H., Gotoh, T., Kojima, T., Satohisa, S., Kikuchi, K., Osanai, M. et Sawada, N. (2003) Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 $\alpha$  triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells, *Exp. Cell Res.*, 286, 288 - 297.
- Chiba H., Itoh, T., Satohisa, S., Sakai, N., Noguchi, H., Osanai, M., Kojima, T. et Sawada, N. (2005) Activation of p21<sup>CIP1</sup>/WAF1 gene expression and inhibition of cell proliferation by overexpression of hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ , *Exp. Cell Res.*, 302, 11 - 21.
- Chiba H., Sakai, N., Murata, M., Osanai, M., Ninomiya, T., Kojima, T. et Sawada, N. (2006) The nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  acts as a morphogen to induce the formation of microvilli, *J. Cell. Biol.*, 175, 971 - 980.

- Chou W. C., Prokova, V., Shiraishi, K., Valcourt, U., Moustakas, A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Zannis, V. I. et Kardassis, D. (2003) Mechanism of a transcriptional cross talk between transforming growth factor-beta-regulated Smad3 and Smad4 proteins and orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor-4, *Mol. Biol. Cell*, 14, 1279 - 1294.
- Coffinier C., Thepot, D., Babinet, C., Yaniv, M. et Barra, J. (1999) Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation, *Development*, 126, 4785 - 4794.
- Costa R. H., Grayson, D. R. et Darnell, J. E., Jr. (1989) Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes, *Mol. Cell. Biol.*, 9, 1415 - 1425.
- Crestani M., De Fabiani, E., Caruso, D., Mitro, N., Gilardi, F., Vigil Chacon, A. B., Patelli, R., Godio, C. et Galli, G. (2004) LXR (liver X receptor) and HNF-4 (hepatocyte nuclear factor-4): key regulators in reverse cholesterol transport, *Biochem. Soc. Trans.*, 32, 92 - 96.
- Desilets A., Gheorghiu, I., Yu, S. J., Seidman, E. G. et Asselin, C. (2000) Inhibition by deacetylase inhibitors of IL-1-dependent induction of haptoglobin involves CCAAT/Enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276, 673 - 679.
- Dowhan D. H. et Muscat, G. E. (1996) Characterization of the AB (AF-1) region in the muscle-specific retinoid X receptor-gamma: evidence that the AF-1 region functions in a cell-specific manner, *Nucleic Acids Res.*, 24, 264 - 271.
- Duncan S. A., Nagy, A. et Chan, W. (1997) Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos, *Development*, 124, 279 - 287.
- Duncan S. A., Navas, M. A., Dufort, D., Rossant, J. et Stoffel, M. (1998) Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism, *Science*, 281, 692 - 695.
- Dusing M. R., Brickner, A. G., Lowe, S. Y., Cohen, M. B. et Wiginton, D. A. (2000) A duodenum-specific enhancer regulates expression along three axes in the small intestine, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 279, G1080 - G1093.
- Dusing M. R. et Wiginton, D. A. (2005) Epithelial lineages of the small intestine have unique patterns of GATA expression, *J. Mol. Histol.*, 36, 15 - 24.
- Eeckhoutte J., Moerman, E., Bouckenooghe, T., Lukoviak, B., Pattou, F., Formstecher, P., Kerr-Conte, J., Vandewalle, B. et Laine, B. (2003a)

Hepatocyte nuclear factor 4 alpha isoforms originated from the P1 promoter are expressed in human pancreatic beta-cells and exhibit stronger transcriptional potentials than P2 promoter-driven isoforms, *Endocrinology*, 144, 1686 - 1694.

- Eeckhoutte J., Oxombre, B., Formstecher, P., Lefebvre, P. et Laine, B. (2003b) Critical role of charged residues in helix 7 of the ligand binding domain in Hepatocyte Nuclear Factor 4alpha dimerisation and transcriptional activity, *Nucleic Acids Res.*, 31, 6640 - 6650.
- El Hassani R. A., Benfares, N., Caillou, B., Talbot, M., Sabourin, J. C., Belotte, V., Morand, S., Gnidehou, S., Agnandji, D., Ohayon, R., Kaniewski, J., Noel-Hudson, M. S., Bidart, J. M., Schlumberger, M., Virion, A. et Dupuy, C. (2005) Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 288, G933 - G942.
- Escaffit F., Pare, F., Gauthier, R., Rivard, N., Boudreau, F. et Beaulieu, J. F. (2006) Cdx2 modulates proliferation in normal human intestinal epithelial crypt cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342, 66 - 72.
- Fang R., Olds, L. C. et Sibley, E. (2006) Spatio-temporal patterns of intestine-specific transcription factor expression during postnatal mouse gut development, *Gene Expr. Patterns*, 6, 426 - 432.
- Fang R., Santiago, N. A., Olds, L. C. et Sibley, E. (2000) The homeodomain protein Cdx2 regulates lactase gene promoter activity during enterocyte differentiation, *Gastroenterology*, 118, 115 - 127.
- Fischer R. S. et Fowler, V. M. (2003) Tropomodulins: life at the slow end, *Trends Cell Biol.*, 13, 593 - 601.
- Forcet C., Etienne-Manneville, S., Gaude, H., Fournier, L., Debilly, S., Salmi, M., Baas, A., Olschwang, S., Clevers, H. et Billaud, M. (2005) Functional analysis of Peutz-Jeghers mutations reveals that the LKB1 C-terminal region exerts a crucial role in regulating both the AMPK pathway and the cell polarity, *Hum. Mol. Genet.*, 14, 1283 - 1292.
- Fre S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D. et Artavanis-Tsakonas, S. (2005) Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine, *Nature*, 435, 964 - 968.
- Freeman T. C. (1995) Parallel patterns of cell-specific gene expression during enterocyte differentiation and maturation in the small intestine of the rabbit, *Differentiation*, 59, 179 - 192.
- Freund J. N., Domon-Dell, C., Kedinger, M. et Duluc, I. (1998) The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine, *Biochem. Cell Biol.*, 76, 957 - 969.

- Fritsch C., Swietlicki, E. A., Lefebvre, O., Kedinger, M., Iordanov, H., Levin, M. S. et Rubin, D. C. (2002) Epimorphin expression in intestinal myofibroblasts induces epithelial morphogenesis, *J. Clin. Invest.*, 110, 1629 - 1641.
- Furuta H., Iwasaki, N., Oda, N., Hinokio, Y., Horikawa, Y., Yamagata, K., Yano, N., Sugahiro, J., Ogata, M., Ohgawara, H., Omori, Y., Iwamoto, Y. et Bell, G. I. (1997) Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha/MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY, *Diabetes*, 46, 1652 - 1657.
- Gao X., Sedgwick, T., Shi, Y. B. et Evans, T. (1998) Distinct functions are implicated for the GATA-4, -5, and -6 transcription factors in the regulation of intestine epithelial cell differentiation, *Mol. Cell. Biol.*, 18, 2901 - 2911.
- Garrison W. D., Battle, M. A., Yang, C., Kaestner, K. H., Sladek, F. M. et Duncan, S. A. (2006) Hepatocyte nuclear factor 4alpha is essential for embryonic development of the mouse colon, *Gastroenterology*, 130, 1207 - 1220.
- Ginsburg G. S., Ozer, J. et Karathanasis, S. K. (1995) Intestinal apolipoprotein AI gene transcription is regulated by multiple distinct DNA elements and is synergistically activated by the orphan nuclear receptor, hepatocyte nuclear factor 4, *J. Clin. Invest.*, 96, 528 - 538.
- Glass C. K. (1994) Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers, *Endocr. Rev.*, 15, 391 - 407.
- Green V. J., Kokkotou, E. et Ladias, J. A. (1998) Critical structural elements and multitarget protein interactions of the transcriptional activator AF-1 of hepatocyte nuclear factor 4, *J. Biol. Chem.*, 273, 29950 - 29957.
- Gregorieff A., Pinto, D., Begthel, H., Destree, O., Kielman, M. et Clevers, H. (2005) Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine, *Gastroenterology*, 129, 626 - 638.
- Guo H., Cai, C. Q. et Kuo, P. C. (2002) Hepatocyte nuclear factor-4alpha mediates redox sensitivity of inducible nitric-oxide synthase gene transcription, *J. Biol. Chem.*, 277, 5054 - 5060.
- Guo H., Gao, C., Mi, Z., Wai, P. Y. et Kuo, P. C. (2006) Phosphorylation of Ser158 regulates inflammatory redox-dependent hepatocyte nuclear factor-4alpha transcriptional activity, *Biochem. J.*, 394, 379 - 387.
- Gupta R. K. et Kaestner, K. H. (2004) HNF-4alpha: from MODY to late-onset type 2 diabetes, *Trends Mol. Med.*, 10, 521 - 524.

- Gupta R. K., Vatamaniuk, M. Z., Lee, C. S., Flaschen, R. C., Fulmer, J. T., Matschinsky, F. M., Duncan, S. A. et Kaestner, K. H. (2005) The MODY1 gene HNF-4alpha regulates selected genes involved in insulin secretion, *J. Clin. Invest.*, 115, 1006 - 1015.
- Hadzopoulou-Cladaras M., Kistanova, E., Evagelopoulou, C., Zeng, S., Cladaras, C. et Ladias, J. A. (1997) Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4, *J. Biol. Chem.*, 272, 539 - 550.
- Hakoda T., Yamamoto, K., Terada, R., Okano, N., Shimada, N., Suzuki, T., Mizuno, M. et Shiratori, Y. (2003) A crucial role of hepatocyte nuclear factor-4 expression in the differentiation of human ductular hepatocytes, *Lab. Invest.*, 83, 1395 - 1402.
- Hall P. A., Coates, P. J., Ansari, B. et Hopwood, D. (1994) Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis, *J. Cell Sci.*, 107, 3569 - 3577.
- Hansen S. K., Parrizas, M., Jensen, M. L., Pruhova, S., Ek, J., Boj, S. F., Johansen, A., Maestro, M. A., Rivera, F., Eiberg, H., Andel, M., Lebl, J., Pedersen, O., Ferrer, J. et Hansen, T. (2002) Genetic evidence that HNF-1alpha-dependent transcriptional control of HNF-4alpha is essential for human pancreatic beta cell function, *J. Clin. Invest.*, 110, 827 - 833.
- Haramis A. P., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G. J. et Clevers, H. (2004) De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine, *Science*, 303, 1684 - 1686.
- Hardie D. G. (2005) New roles for the LKB1-->AMPK pathway, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17, 167 - 173.
- Hardie D. G., Hawley, S. A. et Scott, J. W. (2006) AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept, *J. Physiol.*, 574, 7 - 15.
- Hardwick J. C., van den Brink, G. R., Bleuming, S. A., Ballester, I., Van Den Brande, J. M., Keller, J. J., Offerhaus, G. J., van Deventer, S. J. et Peppelenbosch, M. P. (2004) Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon, *Gastroenterology*, 126, 111 - 121.
- Hatzis P. et Talianidis, I. (2001) Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4alpha gene expression, *Mol. Cell. Biol.*, 21, 7320 - 7330.
- Hayhurst G. P., Lee, Y. H., Lambert, G., Ward, J. M. et Gonzalez, F. J. (2001) Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis, *Mol. Cell. Biol.*, 21, 1393 - 1403.

- He X. C., Zhang, J., Tong, W. G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D. H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L. M., Mishina, Y. et Li, L. (2004) BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling, *Nat. Genet.*, 36, 1117 - 1121.
- Hemminki A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Hoglund, P., Jarvinen, H., Kristo, P., Pelin, K., Ridanpaa, M., Salovaara, R., Toro, T., Bodmer, W., Olschwang, S., Olsen, A. S., Stratton, M. R., de la Chapelle, A. et Aaltonen, L. A. (1998) A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome, *Nature*, 391, 184 - 187.
- Hertz R., Ben Haim, N., Petrescu, A. D., Kalderon, B., Berman, I., Eldad, N., Schroeder, F. et Bar-Tana, J. (2003) Rescue of MODY-1 by agonist ligands of hepatocyte nuclear factor-4alpha, *J. Biol. Chem.*, 278, 22578 - 22585.
- Hertz R., Kalderon, B., Byk, T., Berman, I., Za'tara, G., Mayer, R. et Bar-Tana, J. (2005) Thioesterase activity and acyl-CoA/fatty acid cross-talk of hepatocyte nuclear factor-4{alpha}, *J. Biol. Chem.*, 280, 24451 - 24461.
- Hertz R., Magenheim, J., Berman, I. et Bar-Tana, J. (1998) Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha, *Nature*, 392, 512 - 516.
- Holewa B., Zapp, D., Drewes, T., Senkel, S. et Ryffel, G. U. (1997) HNF4beta, a new gene of the HNF4 family with distinct activation and expression profiles in oogenesis and embryogenesis of *Xenopus laevis*, *Mol. Cell Biol.*, 17, 687 - 694.
- Hong Y. H., Varanasi, U. S., Yang, W. et Leff, T. (2003) AMP-activated protein kinase regulates HNF4alpha transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability, *J. Biol. Chem.*, 278, 27495 - 27501.
- Houde M., Laprise, P., Jean, D., Blais, M., Asselin, C. et Rivard, N. (2001) Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2, *J. Biol. Chem.*, 276, 21885 - 21894.
- Hu C. et Perlmutter, D. H. (1999) Regulation of alpha1-antitrypsin gene expression in human intestinal epithelial cell line caco-2 by HNF-1alpha and HNF-4, *Am. J. Physiol.*, 276, G1181 - G1194.
- Hui D. Y. et Howles, P. N. (2005) Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 16, 183 - 192.



- Imai K., Inukai, K., Ikegami, Y., Awata, T. et Katayama, S. (2006) LKB1, an upstream AMPK kinase, regulates glucose and lipid metabolism in cultured liver and muscle cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351, 595 - 601.
- Ingraffea J., Reczek, D. et Bretscher, A. (2002) Distinct cell type-specific expression of scaffolding proteins EBP50 and E3KARP: EBP50 is generally expressed with ezrin in specific epithelia, whereas E3KARP is not, *Eur. J. Cell Biol.*, 81, 61 - 68.
- Inoue Y., Hayhurst, G. P., Inoue, J., Mori, M. et Gonzalez, F. J. (2002) Defective ureagenesis in mice carrying a liver-specific disruption of hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha). HNF4alpha regulates ornithine transcarbamylase in vivo, *J. Biol. Chem.*, 277, 25257 - 25265.
- Iordanidou P., Aggelidou, E., Demetriades, C. et Hadzopoulou-Cladaras, M. (2005) Distinct amino acid residues may be involved in coactivator and ligand interactions in hepatocyte nuclear factor-4alpha, *J. Biol. Chem.*, 280, 21810 - 21819.
- Iwahashi H., Yamagata, K., Yoshiuchi, I., Terasaki, J., Yang, Q., Fukui, K., Ihara, A., Zhu, Q., Asakura, T., Cao, Y., Imagawa, A., Namba, M., Hanafusa, T., Miyagawa, J. et Matsuzawa, Y. (2002) Thyroid hormone receptor interacting protein 3 (trip3) is a novel coactivator of hepatocyte nuclear factor-4alpha, *Diabetes*, 51, 910 - 914.
- Iyemere V. P., Davies, N. H. et Brownlee, G. G. (1998) The activation function 2 domain of hepatic nuclear factor 4 is regulated by a short C-terminal proline-rich repressor domain, *Nucleic Acids Res.*, 26, 2098 - 2104.
- Jensen J., Pedersen, E. E., Galante, P., Hald, J., Heller, R. S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P. et Madsen, O. D. (2000) Control of endodermal endocrine development by Hes-1, *Nat. Genet.*, 24, 36 - 44.
- Jiang G., Nepomuceno, L., Hopkins, K. et Sladek, F. M. (1995) Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors, *Mol. Cell. Biol.*, 15, 5131 - 5143.
- Jiang S., Tanaka, T., Iwanari, H., Hotta, H., Yamashita, H., Kumakura, J., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Aburatani, H., Hamakubo, T., Kodama, T. et Naito, M. (2003) Expression and localization of P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha (HNF4alpha) isoforms in human and rats, *Nucl. Recept.*, 1, 5 -
- Jorgensen S. B., Viollet, B., Andreelli, F., Frosig, C., Birk, J. B., Schjerling, P., Vaulont, S., Richter, E. A. et Wojtaszewski, J. F. (2004) Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranosidebut not

contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle, *J. Biol. Chem.*, 279, 1070 - 1079.

- Kahn B. B., Alquier, T., Carling, D. et Hardie, D. G. (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism, *Cell Metab.*, 1, 15 - 25.
- Kardassis D., Falvey, E., Tsantili, P., Hadzopoulou-Cladaras, M. et Zannis, V. (2002) Direct physical interactions between HNF-4 and Sp1 mediate synergistic transactivation of the apolipoprotein CIII promoter, *Biochemistry*, 41, 1217 - 1228.
- Kistanova E., Dell, H., Tsantili, P., Falvey, E., Cladaras, C. et Hadzopoulou-Cladaras, M. (2001) The activation function-1 of hepatocyte nuclear factor-4 is an acidic activator that mediates interactions through bulky hydrophobic residues, *Biochem. J.*, 356, 635 - 642.
- Korinek V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J. et 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., Chan, A. S., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W. Y., Chan, T. L., Mifflin, R. C., Powell, D. W., Yuen, S. T., Leung, S. Y. et Chen, X. (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.
- Kruit J. K., Groen, A. K., van Berkel, T. J. et Kuipers, F. (2006) Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism, *World J. Gastroenterol.*, 12, 6429 - 6439.
- Krust A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J. M. et Chambon, P. (1986) The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors, *EMBO J.*, 5, 891 - 897.
- Ktistaki E., Ktistakis, N. T., Papadogeorgaki, E. et Talianidis, I. (1995) Recruitment of hepatocyte nuclear factor 4 into specific intranuclear compartments depends on tyrosine phosphorylation that affects its DNA-binding and transactivation potential, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 9876 - 9880.
- Lausen J., Thomas, H., Lemm, I., Bulman, M., Borgschulze, M., Lingott, A., Hattersley, A. T. et Ryffel, G. U. (2000) Naturally occurring mutations in the human HNF4alpha gene impair the function of the transcription factor to a varying degree, *Nucleic Acids Res.*, 28, 430 - 437.

- Lazarevich N. L., Cheremnova, O. A., Varga, E. V., Ovchinnikov, D. A., Kudrjavitseva, E. I., Morozova, O. V., Fleishman, D. I., Engelhardt, N. V. et Duncan, S. A. (2004) Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors, *Hepatology*, 39, 1038 - 1047.
- Leclerc I., Lenzner, C., Gourdon, L., Vaulont, S., Kahn, A. et Viollet, B. (2001) Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase, *Diabetes*, 50, 1515 - 1521.
- Lee C. S., Perreault, N., Brestelli, J. E. et Kaestner, K. H. (2002) Neurogenin 3 is essential for the proper specification of gastric enteroendocrine cells and the maintenance of gastric epithelial cell identity, *Genes Dev.*, 16, 1488 - 1497.
- Leedham S. J., Brittan, M., McDonald, S. A. et Wright, N. A. (2005) Intestinal stem cells, *J. Cell. Mol. Med.*, 9, 11 - 24.
- Levy E., Thibault, L. et Menard, D. (1992) Intestinal lipids and lipoproteins in the human fetus: modulation by epidermal growth factor, *J. Lipid Res.*, 33, 1607 - 1617.
- Li J., Ning, G. et Duncan, S. A. (2000) Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha, *Genes Dev.*, 14, 464 - 474.
- Li X., Salisbury-Rowswell, J., Murdock, A. D., Forse, R. A. et Burke, P. A. (2002) Hepatocyte nuclear factor 4 response to injury involves a rapid decrease in DNA binding and transactivation via a JAK2 signal transduction pathway, *Biochem. J.*, 368, 203 - 211.
- Long Y. C. et Zierath, J. R. (2006) AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation, *J. Clin. Invest.*, 116, 1776 - 1783.
- Lucas B., Grigo, K., Erdmann, S., Lausen, J., Klein-Hitpass, L. et Ryffel, G. U. (2005) HNF4alpha reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma, *Oncogene*, 24, 6418 - 6431.
- Maeda Y., Seidel, S. D., Wei, G., Liu, X. et Sladek, F. M. (2002) Repression of hepatocyte nuclear factor 4alpha tumor suppressor p53: involvement of the ligand-binding domain and histone deacetylase activity, *Mol. Endocrinol.*, 16, 402 - 410.
- Malerod L., Sporstol, M., Juvet, L. K., Mousavi, A., Gjoen, T. et Berg, T. (2003) Hepatic scavenger receptor class B, type I is stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and hepatocyte nuclear factor 4alpha, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 557 - 565.

- Malik S. (2003) Transcriptional regulation of the apolipoprotein AI gene, *Front. Biosci.*, 8, d360 - d368.
- Massillon D., Arinze, I. J., Xu, C. et Bone, F. (2003) Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in cultured hepatocytes and H4IIE cells by short-chain fatty acids: role of hepatic nuclear factor-4alpha, *J. Biol. Chem.*, 278, 40694 - 40701.
- McCormack S. A., Viar, M. J., Tague, L. et Johnson, L. R. (1996) Altered distribution of the nuclear receptor RAR beta accompanies proliferation and differentiation changes caused by retinoic acid in Caco-2 cells, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 32, 53 - 61.
- Melvin V. S., Harrell, C., Adelman, J. S., Kraus, W. L., Churchill, M. et Edwards, D. P. (2004) The role of the C-terminal extension (CTE) of the estrogen receptor alpha and beta DNA binding domain in DNA binding and interaction with HMGB 1, *J. Biol. Chem.*, 279, 14763 - 14771.
- Michigami T., Suga, A., Yamazaki, M., Shimizu, C., Cai, G., Okada, S. et Ozono, K. (1999) Identification of amino acid sequence in the hinge region of human vitamin D receptor that transfers a cytosolic protein to the nucleus, *J. Biol. Chem.*, 274, 33531 - 33538.
- Miura A., Yamagata, K., Kakei, M., Hatakeyama, H., Takahashi, N., Fukui, K., Nammo, T., Yoneda, K., Inoue, Y., Sladek, F. M., Magnuson, M. A., Kasai, H., Miyagawa, J., Gonzalez, F. J. et Shimomura, I. (2006) Hepatocyte nuclear factor-4alpha is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic beta-cells, *J. Biol. Chem.*, 281, 5246 - 5257.
- Miyamoto T., Kakizawa, T., Ichikawa, K., Nishio, S., Takeda, T., Suzuki, S., Kaneko, A., Kumagai, M., Mori, J., Yamashita, K., Sakuma, T. et Hashizume, K. (2001) The role of hinge domain in heterodimerization and specific DNA recognition by nuclear receptors, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 181, 229 - 238.
- Miyazono K., Maeda, S. et Imamura, T. (2005) BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 16, 251 - 263.
- Montcouquiol M., Crenshaw, E. B., III et Kelley, M. W. (2006) Noncanonical Wnt signaling and neural polarity, *Annu. Rev. Neurosci.*, 29, 363 - 386.
- Montoudis A., Delvin, E., Menard, D., Beaulieu, J. F., Jean, D., Tremblay, E., Bendayan, M. et Levy, E. (2006) Intestinal-fatty acid binding protein and lipid transport in human intestinal epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 339, 248 - 254.

- Morgenstern J. P. et Land, H. (1990) A series of mammalian expression vectors and characterisation of their expression of a reporter gene in stably and transiently transfected cells, *Nucleic Acids Res.*, 18, 1068 -
- Morrisey E. E., Tang, Z., Sigrist, K., Lu, M. M., Jiang, F., Ip, H. S. et Parmacek, M. S. (1998) GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo, *Genes Dev.*, 12, 3579 - 3590.
- Mutoh H., Sakamoto, H., Hayakawa, H., Arao, Y., Satoh, K., Nokubi, M. et Sugano, K. (2006) The intestine-specific homeobox gene *Cdx2* induces expression of the basic helix-loop-helix transcription factor *Math1*, *Differentiation*, 74, 313 - 321.
- Mutoh H., Satoh, K., Kita, H., Sakamoto, H., Hayakawa, H., Yamamoto, H., Isoda, N., Tamada, K., Ido, K. et 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.
- Nagpal S., Friant, S., Nakshatri, H. et Chambon, P. (1993) RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo, *EMBO J.*, 12, 2349 - 2360.
- Naiki T., Nagaki, M., Shidoji, Y., Kojima, H., Imose, M., Kato, T., Ohishi, N., Yagi, K. et Moriwaki, H. (2002) Analysis of gene expression profile induced by hepatocyte nuclear factor 4alpha in hepatoma cells using an oligonucleotide microarray, *J. Biol. Chem.*, 277, 14011 - 14019.
- Odom D. T., Zizlsperger, N., Gordon, D. B., Bell, G. W., Rinaldi, N. J., Murray, H. L., Volkert, T. L., Schreiber, J., Rolfe, P. A., Gifford, D. K., Fraenkel, E., Bell, G. I. et Young, R. A. (2004) Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors, *Science*, 303, 1378 - 1381.
- Olsen L., Bressendorff, S., Troelsen, J. T. et Olsen, J. (2005) Differentiation-dependent activation of the human intestinal alkaline phosphatase promoter by HNF-4 in intestinal cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 289, G220 - G226.
- Oyadomari S., Matsuno, F., Chowdhury, S., Kimura, T., Iwase, K., Araki, E., Shichiri, M., Mori, M. et Takiguchi, M. (2000) The gene for hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha is activated by glucocorticoids and glucagon, and repressed by insulin in rat liver, *FEBS Lett.*, 478, 141 - 146.
- Parviz F., Matullo, C., Garrison, W. D., Savatski, L., Adamson, J. W., Ning, G., Kaestner, K. H., Rossi, J. M., Zaret, K. S. et Duncan, S. A. (2003) Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis, *Nat. Genet.*, 34, 292 - 296.

- Pascussi J. M., Robert, A., Moreau, A., Ramos, J., Bioulac-Sage, P., Navarro, F., Blanc, P., Assenat, E., Maurel, P. et Vilarem, M. J. (2007) Differential regulation of constitutive androstane receptor expression by hepatocyte nuclear factor4alpha isoforms, *Hepatology*, 45, 1146 - 1153.
- Peignon G., Thenet, S., Schreider, C., Fouquet, S., Ribeiro, A., Dussaulx, E., Chambaz, J., Cardot, P., Pincon-Raymond, M. et Le Beyec, J. (2006) E-cadherin-dependent transcriptional control of apolipoprotein A-IV gene expression in intestinal epithelial cells: a role for the hepatic nuclear factor 4, *J. Biol. Chem.*, 281, 3560 - 3568.
- Pinto D., Gregorieff, A., Begthel, H. et Clevers, H. (2003) Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium, *Genes Dev.*, 17, 1709 - 1713.
- Popowski K., Eloranta, J. J., Saborowski, M., Fried, M., Meier, P. J. et Kullak-Ublick, G. A. (2005) The human organic anion transporter 2 gene is transactivated by hepatocyte nuclear factor-4 alpha and suppressed by bile acids, *Mol. Pharmacol.*, 67, 1629 - 1638.
- Prieur X., Schaap, F. G., Coste, H. et Rodriguez, J. C. (2005) Hepatocyte nuclear factor-4alpha regulates the human apolipoprotein AV gene: identification of a novel response element and involvement in the control by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha, AMP-activated protein kinase, and mitogen-activated protein kinase pathway, *Mol. Endocrinol.*, 19, 3107 - 3125.
- Qian A., Cai, Y., Magee, T. R. et Wan, Y. J. (2000) Identification of retinoic acid-responsive elements on the HNF1alpha and HNF4alpha genes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276, 837 - 842.
- Quaroni A., Isselbacher, K. J. et Ruoslahti, E. (1978) Fibronectin synthesis by epithelial crypt cells of rat small intestine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75, 5548 - 5552.
- Radtke F., Wilson, A., Mancini, S. J. et MacDonald, H. R. (2004) Notch regulation of lymphocyte development and function, *Nat. Immunol.*, 5, 247 - 253.
- Reddy S., Yang, W., Taylor, D. G., Shen, X., Oxender, D., Kust, G. et Leff, T. (1999) Mitogen-activated protein kinase regulates transcription of the ApoCIII gene. Involvement of the orphan nuclear receptor HNF4, *J. Biol. Chem.*, 274, 33050 - 33056.
- Reijnen M. J., Peerlinck, K., Maasdam, D., Bertina, R. M. et Reitsma, P. H. (1993) Hemophilia B Leyden: substitution of thymine for guanine at position -21 results in a disruption of a hepatocyte nuclear factor 4 binding site in the factor IX promoter, *Blood*, 82, 151 - 158.

- Reijnen M. J., Sladek, F. M., Bertina, R. M. et Reitsma, P. H. (1992) Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89, 6300 - 6303.
- Rhee J., Ge, H., Yang, W., Fan, M., Handschin, C., Cooper, M., Lin, J., Li, C. et Spiegelman, B. M. (2006) Partnership of PGC-1alpha and HNF4alpha in the regulation of lipoprotein metabolism, J. Biol. Chem., 281, 14683 - 14690.
- Roth U., Curth, K., Unterman, T. G. et Kietzmann, T. (2004) The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway, J. Biol. Chem., 279, 2623 - 2631.
- Ruse Jr M. D., Privalsky, M. L. et Sladek, F. M. (2002) Competitive cofactor recruitment by orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha: modulation by the F domain, Mol. Cell. Biol., 22, 1626 - 1638.
- Sancho E., Batlle, E. et Clevers, H. (2004) Signaling pathways in intestinal development and cancer, Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 20, 695 - 723.
- Satohisa S., Chiba, H., Osanai, M., Ohno, S., Kojima, T., Saito, T. et Sawada, N. (2005) Behavior of tight-junction, adherens-junction and cell polarity proteins during HNF-4alpha-induced epithelial polarization, Exp. Cell Res., 310, 66 - 78.
- Sauvaget D., Chauffeton, V., Citadelle, D., Chatelet, F. P., Cywiner-Golenzer, C., Chambaz, J., Pincon-Raymond, M., Cardot, P., Le Beyec, J. et Ribeiro, A. (2002) Restriction of apolipoprotein A-IV gene expression to the intestine villus depends on a hormone-responsive element and parallels differential expression of the hepatic nuclear factor 4alpha and gamma isoforms, J. Biol. Chem., 277, 34540 - 34548.
- Schonhoff S. E., Giel-Moloney, M. et Leiter, A. B. (2004) Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells, Endocrinology, 145, 2639 - 2644.
- Sheena V., Hertz, R., Nousbeck, J., Berman, I., Magenheim, J. et Bar-Tana, J. (2005) Transcriptional regulation of human microsomal triglyceride transfer protein by hepatocyte nuclear factor-4alpha, J. Lipid Res., 46, 328 - 341.
- Shimamoto Y., Ishida, J., Yamagata, K., Saito, T., Kato, H., Matsuoka, T., Hirota, K., Daitoku, H., Nangaku, M., Yamagata, K., Fujii, H., Takeda, J. et Fukamizu, A. (2004) Inhibitory effect of the small heterodimer partner on hepatocyte nuclear factor-4 mediates bile acid-induced repression of the human angiotensinogen gene, J. Biol. Chem., 279, 7770 - 7776.

- Silberg D. G., Sullivan, J., Kang, E., Swain, G. P., Moffett, J., Sund, N. J., Sackett, S. D. et Kaestner, K. H. (2002) Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice, *Gastroenterology*, 122, 689 - 696.
- Silberg D. G., Swain, G. P., Suh, E. R. et Traber, P. G. (2000) Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development, *Gastroenterology*, 119, 961 - 971.
- Sladek F. (2002) Desperately seeking...something, *Mol. Cell*, 10, 219 - 221.
- Sladek F. M., Ruse, M. D., Jr., Nepomuceno, L., Huang, S. M. et Stallcup, M. R. (1999) Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1, *Mol. Cell. Biol.*, 19, 6509 - 6522.
- Sladek F. M., Zhong, W. M., Lai, E. et Darnell, J. E., Jr. (1990) Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily, *Genes Dev.*, 4, 2353 - 2365.
- Song K. H. et Chiang, J. Y. (2006) Glucagon and cAMP inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) gene expression in human hepatocytes: discordant regulation of bile acid synthesis and gluconeogenesis, *Hepatology*, 43, 117 - 125.
- Song K. H., Li, T. et Chiang, J. Y. (2006) A prospero-related homeodomain protein is a novel co-regulator of hepatocyte nuclear factor 4alpha that regulates the cholesterol 7alpha -hydroxylase gene, *J. Biol. Chem.*, 281, 10081 - 10088.
- Soubeyran P., Andre, F., Lissitzky, J. C., Mallo, G. V., Moucadel, V., Roccabianca, M., Rechreche, H., Marvaldi, J., Dikic, I., Dagorn, J. C. et Iovanna, J. L. (1999) Cdx1 promotes differentiation in a rat intestinal epithelial cell line, *Gastroenterology*, 117, 1326 - 1338.
- Soutoglou E., Katrakili, N. et Talianidis, I. (2000) Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels, *Mol. Cell*, 5, 745 - 751.
- Stanger B. Z., Datar, R., Murtaugh, L. C. et Melton, D. A. (2005) Direct regulation of intestinal fate by Notch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102, 12443 - 12448.
- Stegmann A., Hansen, M., Wang, Y., Larsen, J. B., Lund, L. R., Ritie, L., Nicholson, J. K., Quistorff, B., Simon-Assmann, P., Troelsen, J. T. et Olsen, J. (2006) Metabolome, transcriptome, and bioinformatic cis-element analyses point to HNF-4 as a central regulator of gene expression during enterocyte differentiation, *Physiol. Genomics*, 27, 141 - 155.



- Suaud L., Formstecher, P. et Laine, B. (1999) The activity of the activation function 2 of the human hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4 $\alpha$ ) is differently modulated by F domains from various origins, *Biochem. J.*, 340, 161 - 169.
- Suh E., Chen, L., Taylor, J. et Traber, P. G. (1994) A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription, *Mol. Cell. Biol.*, 14, 7340 - 7351.
- Suh E. et Traber, P. G. (1996) An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation, *Mol. Cell. Biol.*, 16, 619 - 625.
- Sumi K., Tanaka, T., Uchida, A., Magoori, K., Urashima, Y., Ohashi, R., Ohguchi, H., Okamura, M., Kudo, H., Daigo, K., Maejima, T., Kojima, N., Sakakibara, I., Jiang, S., Hasegawa, G., Kim, I., Osborne, T. F., Naito, M., Gonzalez, F. J., Hamakubo, T., Kodama, T. et Sakai, J. (2007) Cooperative interaction between hepatocyte nuclear factor 4  $\alpha$  and GATA transcription factors regulates ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8, *Mol. Cell Biol.*, 27, 4248 - 4260.
- Swenson E. S., Mann, E. A., Jump, M. L. et Giannella, R. A. (1999) Hepatocyte nuclear factor-4 regulates intestinal expression of the guanylin/heat-stable toxin receptor, *Am. J. Physiol.*, 276, G728 - G736.
- Tanaka T., Jiang, S., Hotta, H., Takano, K., Iwanari, H., Sumi, K., Daigo, K., Ohashi, R., Sugai, M., Ikegame, C., Umezu, H., Hirayama, Y., Midorikawa, Y., Hippo, Y., Watanabe, A., Uchiyama, Y., Hasegawa, G., Reid, P., Aburatani, H., Hamakubo, T., Sakai, J., Naito, M. et Kodama, T. (2006) Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  in the pathogenesis of human cancer, *J. Pathol.*, 208, 662 - 672.
- Tarumi T., Kravtsov, D. V., Zhao, M., Williams, S. M. et Gailani, D. (2002) Cloning and characterization of the human factor XI gene promoter: transcription factor hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ ) is required for hepatocyte-specific expression of factor XI, *J. Biol. Chem.*, 277, 18510 - 18516.
- Thomas H., Jaschowitz, K., Bulman, M., Frayling, T. M., Mitchell, S. M., Roosen, S., Lingott-Frieg, A., Tack, C. J., Ellard, S., Ryffel, G. U. et Hattersley, A. T. (2001) A distant upstream promoter of the HNF-4 $\alpha$  gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young, *Hum. Mol. Genet.*, 10, 2089 - 2097.
- Torres-Padilla M. E., Sladek, F. M. et Weiss, M. C. (2002) Developmentally regulated N-terminal variants of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  mediate multiple interactions through coactivator and

- corepressor-histone deacetylase complexes, *J. Biol. Chem.*, 277, 44677 - 44687.
- Torres-Padilla M. E. et Weiss, M. C. (2003) Effects of interactions of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  isoforms with coactivators and corepressors are promoter-specific, *FEBS Lett.*, 539, 19 - 23.
- Tzukerman M. T., Esty, A., Santiso-Mere, D., Danielian, P., Parker, M. G., Stein, R. B., Pike, J. W. et McDonnell, D. P. (1994) Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions, *Mol. Endocrinol.*, 8, 21 - 30.
- Umesono K. et Evans, R. M. (1989) Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors, *Cell*, 57, 1139 - 1146.
- van de Wetering M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R. et Clevers, H. (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells, *Cell*, 111, 241 - 250.
- van Es J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den, B. M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F. et Clevers, H. (2005) Notch/ $\gamma$ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells, *Nature*, 435, 959 - 963.
- van Wering H. M., Moyer, L., Grand, R. J. et Krasinski, S. D. (2002) Novel interaction at the Cdx-2 binding sites of the lactase-phlorizin hydrolase promoter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 299, 587 - 593.
- Varnat F., Heggeler, B. B., Grisel, P., Boucard, N., Corthesy-Theulaz, I., Wahli, W. et Desvergne, B. (2006) PPAR $\beta$ / $\delta$  regulates paneth cell differentiation via controlling the hedgehog signaling pathway, *Gastroenterology*, 131, 538 - 553.
- Viollet B., Kahn, A. et Raymondjean, M. (1997) Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4, *Mol. Cell. Biol.*, 17, 4208 - 4219.
- Wang B., Cai, S. R., Gao, C., Sladek, F. M. et Ponder, K. P. (2001) Lipopolysaccharide results in a marked decrease in hepatocyte nuclear factor 4  $\alpha$  in rat liver, *Hepatology*, 34, 979 - 989.
- Wang J. C., Stafford, J. M. et Granner, D. K. (1998) SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4, *J. Biol. Chem.*, 273, 30847 - 30850.

- Warnmark A., Almlof, T., Leers, J., Gustafsson, J. A. et Treuter, E. (2001) Differential recruitment of the mammalian mediator subunit TRAP220 by estrogen receptors ERalpha and ERbeta, *J. Biol. Chem.*, 276, 23397 - 23404.
- Warnmark A., Treuter, E., Wright, A. P. et Gustafsson, J. A. (2003) Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation, *Mol. Endocrinol.*, 17, 1901 - 1909.
- Watt A. J., Garrison, W. D. et Duncan, S. A. (2003) HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function, *Hepatology*, 37, 1249 - 1253.
- Wilberding J. A. et Castellino, F. J. (2000) Characterization of the murine coagulation factor X promoter, *Thromb. Haemost.*, 84, 1031 - 1038.
- Wilson A. et Radtke, F. (2006) Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and cancer, *FEBS Lett.*, 580, 2860 - 2868.
- Wisely G. B., Miller, A. B., Davis, R. G., Thornquest, A. D., Jr., Johnson, R., Spitzer, T., Sefler, A., Shearer, B., Moore, J. T., Miller, A. B., Willson, T. M. et Williams, S. P. (2002) Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids, *Structure*, 10, 1225 - 1234.
- Woods A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M. et Carling, D. (2003) LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade, *Curr. Biol.*, 13, 2004 - 2008.
- Wooters M. A., Hildreth, M. B., Nelson, E. A. et Erickson, A. K. (2005) Immunohistochemical characterization of the distribution of galectin-4 in porcine small intestine, *J. Histochem. Cytochem.*, 53, 197 - 205.
- Yamagata K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Cox, N. J., Fajans, S. S., Signorini, S., Stoffel, M. et Bell, G. I. (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1), *Nature*, 384, 458 - 460.
- Yamamoto T., Shimano, H., Nakagawa, Y., Ide, T., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Takahashi, A., Suzuki, H., Sone, H., Toyoshima, H., Sato, R. et Yamada, N. (2004) SREBP-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 alpha and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes, *J. Biol. Chem.*, 279, 12027 - 12035.
- Yang Q., Bermingham, N. A., Finegold, M. J. et Zoghbi, H. Y. (2001) Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine, *Science*, 294, 2155 - 2158.

- You M., Fischer, M., Cho, W. K. et Crabb, D. (2002) Transcriptional control of the human aldehyde dehydrogenase 2 promoter by hepatocyte nuclear factor 4: inhibition by cyclic AMP and COUP transcription factors, *Arch. Biochem. Biophys.*, 398, 79 - 86.
- Young B. et Heath J.W. (2000) *Wheater's functional histology*, 4<sup>e</sup> édition, Churchill Livingstone.
- Zelent A., Mendelsohn, C., Kastner, P., Krust, A., Garnier, J. M., Ruffenach, F., Leroy, P. et Chambon, P. (1991) Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta generated by usage of two promoters and alternative splicing, *EMBO J.*, 10, 71 - 81.
- Zhang L., Li, J., Young, L. H. et Caplan, M. J. (2006) AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103, 17272 - 17277.
- Zhao Q., Khorasanizadeh, S., Miyoshi, Y., Lazar, M. A. et Rastinejad, F. (1998) Structural elements of an orphan nuclear receptor-DNA complex, *Mol Cell*, 1, 849 - 861.
- Zheng B. et Cantley, L. C. (2007) Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104, 819 - 822.
- Zhong W., Mirkovitch, J. et Darnell, J. E., Jr. (1994) Tissue-specific regulation of mouse hepatocyte nuclear factor 4 expression, *Mol. Cell Biol.*, 14, 7276 - 7284.

Annexe 1 : liste des gènes cibles déjà identifiés de HNF4 $\alpha$ 1

Gènes cibles	référence
$\alpha$ 1-antitrypsine (serpine A1)	(Hu and Perlmutter, 1999)
Acyl co-A oxydase ?	(Winrow et al., 1994)
Adenosine Deaminase	(Dusing et al., 2000)
Aldéhyde déhydrogénase 2	(You et al., 2002)
Aldolase B	(Gregori et al., 1998)
Angiotensinogène	(Yanai et al., 1999)
Antithrombine	(Fernandez-Rachubinski et al., 1996)
Apolipoprotéine A-I	(Zannis et al., 2003)
Apolipoprotéine A-II	(Ribeiro et al., 1999)
Apolipoprotéine A-IV	(Sauvaget et al., 2002)
Apolipoprotéine B	(Antes et al., 2001)
Apolipoprotéine C-II	(Kardassis et al., 1998)
Apolipoprotéine C-III	(Kardassis et al., 2002)
BGP	(Hauck et al., 1994)
Carnitine palmytoyle transférase I	(Louet et al., 2002)
Cholestérol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1)	(Stroup and Chiang, 2000)
Cluster Serpine 14q32.1	(Rollini and Fournier, 1999)
CRBP11	(Nakshatri and Chambon, 1994)
Cyp2a4	(Yokomori et al., 1997)
Cyp2a5	(Ulvila et al., 2004)
Cyp2c1, Cyp2c2, Cyp2c3	(Chen et al., 1994)
Cyp2c9	(Ibeanu and Goldstein, 1995)
Cyp2c12	(Sasaki et al., 1999)
CYP2C23	(Roussel et al., 1995)
Cyp3a2	(Miyata et al., 1995)

Gènes cibles	Référence
Cytochrome P450	(Jover et al., 2001)
DD-4	(Ozeki et al., 2002)
Erythropoïétine	(Makita et al., 2001)
Facteur VII	(Arbini et al., 1997)
Facteur IX	(Naka and Brownlee, 1996)
Facteur X	(Wilberding and Castellino, 2000)
Facteur XI	(Tarumi et al., 2002)
Facteur XII	(Farsetti et al., 1998)
Glucokinase	(Roth et al., 2002)
Glucose 6 phosphatase	(Massillon et al., 2003)
G3PDH	(Stoffel and Duncan, 1997a)
Guanylate cyclase C	(Roy et al., 2001) (Swenson et al., 1999)
HGFL	(Wetzel et al., 2003)
HNF-1	(Jung and Kullak-Ublick, 2003)
HNF-6	(Lahuna et al., 2000b)
Hydratase deshydrogenase	(Winrow <i>et al.</i> , 1994)
iNOS	(Guo et al., 2002)
Insuline	(Bartoov-Shifman et al., 2002)
MCAD	(Carter et al., 1993)
MSP	(Ueda et al., 1998)
MTP	(Hagan et al., 1994)
Ornithine transcarbamylyase	(Inoue et al., 2002)
PEPCK cytosolique	(Beale et al., 2003)
P3KCTB	(Hansmannel et al., 2003)
PPAR $\alpha$	(Pineda, I et al., 2002)

Gènes cibles	Référence
Prolactine	(Moldrup et al., 1996)
Prothrombine	(Ceelie et al., 2003)
Pyruvate Kinase L	(Yamada et al., 1997)
PXR	(Kamiya et al., 2003)
SHBG	(Janne and Hammond, 1998)
SREBP-1c	(Tarling et al., 2004)
Stérol 12a-hydroxylase	(Castillo-Olivares and Gil, 2001)
Sterol 27-hydroxylase	(Garuti et al., 2002)
Transferrine	(Schaeffer et al., 1993)
Transporteur du glucose-2	(Stoffel and Duncan, 1997b)
VLACSR	(Inoue et al., 2004)

**Annexe 2 : Liste récapitulative des gènes surexprimés plus de quatre fois dans les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1**

Les cellules IEC-6 HNF4 $\alpha$ 1 et IEC-6 puro ont été cultivées pendant 30 jours suite à l'atteinte de la confluence puis leurs ARNs a été extrait pour être traité tel qu'indiqué dans le chapitre matériel et méthodes. Les niveaux d'expression ont été comparés par rapport à des cellules IEC-6 infectées avec un vecteur vide.



<b>Norm du gène</b>	<b>Syn.</b>	<b>Augm° moy.</b>	<b>Categorie</b>	<b>Sous-catégorie</b>
apolipoprotein A-I	ApoA1	1138,1	Métabolisme	Lipides
aflatoxin B1 aldehyde reductase	Afar/akr1a1	407,7	Défense Cell./organisme	Homéostasie
selenoprotein P plasma 1	Sepp1/sep	377,0	Métabolisme	Générale
dopa/tyrosine sulfotransferase	sult1b1	289,3	Défense Cell./organisme	Homéostasie
lectin galactose binding soluble 4	Lgals4	235,7	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
Serine protease inhibitor	Spin2c	234,6	Défense Cell./organisme	Immunologie
cytochrome P450 3A9	CYP3A9	204,4	Métabolisme	Lipides
protein kinase (cAMP dependent catalytic) inhibitor beta	Pkib	169,4	Signalisation/com. cellulaire	Modulateurs d'effecteurs
calbindin 3	Calb3	157,6	Non classée	Non classée
T-kininogen	Knk	142,4	Défense Cell./organisme	Immunologie
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	Hmgcs2	136,5	Métabolisme	Générale
AMP-activated protein kinase (sous unité AMPK)	Prkaa2	72,3	Métabolisme	Lipides
alkaline phosphodiesterase	enpp3	49,3	Métabolisme	Nucléotides
apolipoprotein B	Apob	49,0	Métabolisme	Transport
vasoactive intestinal peptide receptor 1	Vipr1	36,4	Signalisation/com. cellulaire	Modulateurs d'effecteurs
growth differentiation factor 11/BMP11	Gdf11	34,7	Division cellulaire	Générale
4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase./1.13.11.27	Hpd	34,4	Métabolisme	Acides aminés
<b>hepatocyte nuclear factor 4 alpha</b>	<b>HNF4a</b>	<b>33,5</b>		
flavin containing monooxygenase 4	Fmo4	30,9	Métabolisme	Générale
cytochrome P450 1a1	Cyp1a1	24,5	Métabolisme	Lipides
transient receptor potential cation channel subfamily V member 4	Trpv4	24,4	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux
carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	Ceacam1	23,9	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
alanyl (membrane) aminopeptidase/3.14.11.2	Anpep	22,5	Métabolisme	Générale
mucin and cadherin-like	Mucdhl	21,2	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
LXRα	Nr1h3, LXRa	20,1	Expression de gènes/protéines	Synthèse ARN
tropomodulin 1	Tmod1	18,3	Structure/motilité Cellulaire	Cytosquelette
gamma-glutamyl hydrolase/3.4.19.9	Ggh	18,0	Métabolisme	Acides aminés
protein RAKc	LOC361267	16,1	NF	NF
SH3 domain protein 2A	Sh3d2a	15,3	Expression de gènes/protéines	Synthèse ARN
schlafen 4	Slnf4	14,5	NF	NF
plasmolipin	tm4sfl1	14,4	Métabolisme	Transport
apolipoprotein C-III	Apoc3	14,4	Métabolisme	Lipides

Nom du gène	Syn.	Augm° moy.	Categorie	Sous-catégorie
erythrocyte protein band 4.1-like 3	Epb4.1l3	14,2	Structure/motilité Cellulaire	Cytosquelette
carboxylesterase 2 (intestine liver) transporter	Ces2	13,9	Métabolisme	Lipides
fatty acid binding protein 1	LOC314323	12,5	Métabolisme	Transport
GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein	Fabp2	12,2	Métabolisme	Transport
ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting beta 1 polypeptide/3.6.1.37	Gchfr/GFRP	11,5	Métabolisme	Acides aminés
ATP-binding cassette sub-family G (WHITE) member 1	Atp1b1	11,3	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux
aquaporin 11	Abcg1	11,3	Métabolisme	Transport
alpha-2-macroglobulin	Aqp11	11,3	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux
adenosine A1 receptor	A2m	11,0	Défense Cell./organisme	Immunologie
c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	Adora1	11,0	Signalisation/com. cellulaire	Récepteur
interleukin 4 receptor	Mertk, c-mer	10,9	Défense Cell./organisme	Immunologie
flavin containing monooxygenase 1	Il4r	10,8	Défense Cell./organisme	Immunologie
arachidonic acid epoxigenase	Fmo1	10,6	Métabolisme	Générale
3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	Cyp2c23	10,2	Métabolisme	Lipides
protein kinase C-eta	LOC191574	10,1	Métabolisme	Lipides
norvegicus myosin binding protein H	Prkch/PKCL	10,1	Signalisation/com. cellulaire	Médiateurs intracellulaires
reticulum 1	Mybph	9,8	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
SHP	Rtn1	9,7	Structure/motilité Cellulaire	Protéines associées aux microtubules/moteurs
keratin 8	Nr0b2/SHP	9,7	Expression de gènes/protéines	Synthèse ARN
spp-24 precursor	Krt8	9,6	Structure/motilité Cellulaire	Cytosquelette
aldehyde dehydrogenase family 1 member A1	LOC94168	9,5	NF	NF
solute carrier family 7 member 8	Aldh1a1	9,4	Défense Cell./organisme	Homéostasie
avian erythroblastosis oncogene B 3	Slc7a8	9,3	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux
plasminogen activator inhibitor 2 type A	ErbB3	8,7	Signalisation/com. cellulaire	Modulateurs d'effecteurs
G-protein-coupled receptor induced protein GIG2	Pa12a	8,6	Division cellulaire	Générale
X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2 membrane-bound	Gig2	8,5	NF	NF
fatty acid amide hydrolase	Xpnpep2	8,2	Métabolisme	Acides aminés
uterine-specific proline-rich acidic protein	Faah	8,1	Métabolisme	Lipides
progressive ankylosis	Upa	7,4	Non classée	Non classée
lectin galactoside-binding soluble 2 (galectin 2)	Ank	7,3	Métabolisme	Transport
kynurenine 3-hydroxylase/ 1.14.13.9	Lgals2	7,2	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	Kmo	7,1	Métabolisme	Acides aminés
	Entpd5	7,0	Métabolisme	Nucléotides

Nom du gène	Syn.	Augm° moy.	Categorie	Sous-categorie
stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1	7,0	Métabolisme	Lipides
Récepteurs aux minéralocorticoïdes	Nr3c2/MR	6,9	Expression de gènes/protéines	Synthèse ARN
band 83	Band83	6,9	NF	NF
G protein-coupled receptor kinase 5	Gprk5	6,9	Signalisation/com. cellulaire	Modulateurs d'effecteurs
solute carrier family 22 member 1	Slc22a1	6,4	Défense Cell./organisme	Homéostasie
alpha-2 antiplasmin/serpinf1	Dmrs91	6,4	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
protein kinase lysine deficient 4	Prkwnk4	6,4	Signalisation/com. cellulaire	Modulateurs d'effecteurs
pregnancy-induced growth inhibitor	Ok138	6,3	Division cellulaire	Générate
G protein-coupled receptor 56	Gpr56	6,2	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
agrin	Agrn	6,2	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
cadherin 2, Ncadherin	Cdh2, Ncad,	6,1	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
phosphatidylinositol (45) bisphosphate 5-phosphatase A	Pib5pa	6,0	NF	NF
inter alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4	Itih4	6,0	Défense Cell./organisme	Immunologie
mannoside acetyl glucosaminyltransferase 3	Mgat3	6,0	Métabolisme	Modifications de protéines
carbonic anhydrase 2	Ca2	5,9	Métabolisme	Générate
castration induced prostatic apoptosis-related protein 1	CIPAR-1	5,7	NF	NF
syntaxin binding protein 1	Stxbp1	5,7	Structure/motilité Cellulaire	Générate
amphiregulin	Areg	5,7	Division cellulaire	Cycle cellulaire
desmin	Des	5,7	Structure/motilité Cellulaire	Cytosquelette
scavenger receptor class B member 1	Scarb1	5,6	Métabolisme	Transport
cell growth regulatory with EF-hand domain	Cgr11	5,6	Division cellulaire	Générate
CEA-related cell adhesion molecule 10	Ceacam10	5,5	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	Foxe1/TF2	5,4	Expression de gènes/protéines	Synthèse ARN
small cell adhesion glycoprotein	smagp	5,3	NF	NF
occludin	Ocln	5,2	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
3(2)5-bisphosphate nucleotidase	Bpnt1	5,2	Métabolisme	Générate
four and a half LIM domains 2	Fhl2	5,1	Non classée	Non classée
transducer of ERBB2 1	Tob1	5,1	Division cellulaire	Cycle cellulaire
ketoheoxokinase	Khk	5,1	Métabolisme	Sucre/glycolyse
NOSTRIN	LOC311111	4,9	Structure/motilité Cellulaire	Protéines associées aux microtubules/moteurs
complement component factor h	Cfh	4,9	Défense Cell./organisme	Immunologie
tumor suppressor pHyde	LOC170824	4,8	Division cellulaire	Apoptose
MEGF6	Egfl3	4,8	NF	NF

<b>Norm du gène</b>	<b>Syn.</b>	<b>Augm° moy.</b>	<b>Categorie</b>	<b>Sous-categorie</b>
keratin complex 1 acidic gene 19/cytokeratine 19	Krt11-19	4,8	Structure/motilité Cellulaire	Cytosquelette
cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2	Celsr2	4,6	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
growth differentiation factor 15	Gdf15	4,6	Signalisation/com. cellulaire	Hormones/facteurs de croissance
Proteinase-activated receptor-2 G protein-coupled receptor 11	Fzr11	4,5	Défense Cell./organisme	Homéostasie
transcription factor 1	Tcf1/HNF1	4,5	Expression de gènes/protéines	Synthèse ARN
zinc finger protein 36	Zfp36/TFP	4,4	Défense Cell./organisme	Homéostasie
crystallin alpha C	Cryac/HSP22	4,4	NF	NF
ADP-ribosylation-like 4	Arl4	4,4	Signalisation/com. cellulaire	Médiateurs intracellulaires
glutathione synthetase	Gss/6.3.2.3	4,4	Défense Cell./organisme	Homéostasie
importin 13	Imp13	4,3	Signalisation/com. cellulaire	Protéines de transport/canaux
B-cell translocation gene 2 anti-proliferative	Big2	4,3	Division cellulaire	Cycle cellulaire
interleukin 15	Il15	4,2	Défense Cell./organisme	Immunologie
thymic stromal-derived lymphopoietin receptor	Tslpr	4,2	Défense Cell./organisme	Immunologie
CD36 antigen (collagen type I receptor thrombospondin receptor)-like 2	Cd36l2	4,2	Signalisation/com. cellulaire	Adhésion cellulaire
lipase A lysosomal acid	Lipa	4,1	Métabolisme	Lipides
runt related transcription factor 1	Runx1/AML1	4,1	Signalisation/com. cellulaire	Médiateurs intracellulaires
glutaredoxin 1 (thioltransferase)	Glrx1	4,1	Métabolisme	Générale
palmitoyl-protein thioesterase 2	Ppt2	4,1	Métabolisme	Modifications de protéines
dishevelled 1	Dvl1	4,0	Division cellulaire	Générale
procollagen type XII alpha 1	Col12a1	4,0	Structure/motilité Cellulaire	Matrice extracellulaire
galactose-4-epimerase UDP	Gale	4,0	Métabolisme	Sucre/glycolyse
PXR	Nr1i2/PXR	4,0	Expression de gènes/protéines	Synthèse ARN