

Université de Sherbrooke

Rôles de la cathepsine L et des facteurs de transcription Hnf4 $\alpha$  et Hnf1 $\alpha$  dans  
la différenciation fonctionnelle de l'épithélium de l'intestin grêle.

Par Carine Lussier

Département de biologie et d'anatomie cellulaire

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

Janvier 2009

Pr. François Boudreau, programme de biologie cellulaire

Pre. Nathalie Rivard, programme de biologie cellulaire

Pr. Benoît Chabot, programme de microbiologie et d'infectiologie

Pre. Nicole Beauchemin, département de biochimie, Université McGill



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
ISBN: 978-0-494-62814-0  
*Our file* *Notre référence*  
ISBN: 978-0-494-62814-0

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**



## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....</b>	<b>VII</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. L'épithélium de l'intestin grêle.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Morphologie et structure.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2. L'unité fonctionnelle.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.3. Les principaux types cellulaires.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.4. La barrière épithéliale intestinale.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.5. La morphogenèse et la cytodifférenciation.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Régulation du développement et de l'homéostasie épithéliale intestinale.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1. Le mésenchyme est permissif à la différenciation intrinsèque de l'endoderme..</b>	<b>8</b>
<b>1.2.2. Les interactions épithéliales.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2.1. Les interactions via des molécules transmembranaires.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2.2. La voie de signalisation des Wnts.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.3. Les interactions épithélio-mésenchymateuses.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2.3.1. Les interactions via l'entremise de facteurs solubles.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2.3.2. Les interactions via l'entremise de la matrice extracellulaire.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3. Les facteurs de transcription d'origine endodermique.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.1. Caudal-related homeobox 2.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.2. Hepatocyte nuclear factor-1<math>\alpha</math> (Hnf1<math>\alpha</math>).....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.3. Hepatocyte nuclear factor-4<math>\alpha</math> (Hnf4<math>\alpha</math>).....</b>	<b>22</b>
<b>1.4. Hypothèses et objectifs.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4.1. Manuscrit 1.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4.2. Manuscrit 2.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4.3. Manuscrit 3.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4.4. La double invalidation de Hnf1<math>\alpha</math> et Hnf4<math>\alpha</math>.....</b>	<b>28</b>

<b>2. RÉSULTATS</b> .....	29
<b>2.1. Manuscrit 1</b> .....	29
<b>2.2. Manuscrit 2</b> .....	70
<b>2.3. Manuscrit 3</b> .....	110
<b>2.4. La double invalidation de Hnf-1<math>\alpha</math> et Hnf-4<math>\alpha</math></b> .....	151
<b>2.4.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	151
<b>2.4.2. RÉSULTATS</b> .....	154
<b>2.4.2.1. Les souris doublement invalidées dès la période embryonnaire</b> .....	154
<b>2.4.2.2. Les souris doublement invalidées à l'âge adulte</b> .....	160
<b>3. DISCUSSION</b> .....	166
<b>3.1. La cathepsine L dans le maintien de l'homéostasie épithéliale intestinale</b> .....	166
<b>3.1.1. La cathepsine L serait induite au cours de la détermination cellulaire</b> .....	166
<b>3.1.2. La cathepsine L et l'intégrité de l'épithélium intestinal</b> .....	167
<b>3.1.2.1. Une fonction endosomale</b> .....	167
<b>3.1.2.2. Une fonction nucléaire</b> .....	168
<b>3.1.2.3. Les souris furless vs les souris invalidées pour la cathepsine L</b> .....	170
<b>3.2. La co-culture des cellules IEC-6/L1 avec des cellules mésenchymateuses</b> .....	171
<b>3.2.1. Notre modèle de co-culture dans le contexte actuel</b> .....	171
<b>3.2.2. Cdx2 : antagoniste d'un facteur endodermique proximal</b> .....	172
<b>3.2.3. Hnf4<math>\alpha</math> et la différenciation épithéliale intestinale</b> .....	174
<b>3.3. Invalidation de Hnf1<math>\alpha</math> : Impact au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle</b> .....	176
<b>3.3.1. L'intestinalomégalie des souris Hnf1<math>\alpha</math> KO</b> .....	176
<b>3.3.1.1. La dérégulation de mTOR via une perte de l'activité de l'AMPK</b> .....	176
<b>3.3.1.2. L'AMPK et la voie de signalisation des Wnts</b> .....	180
<b>3.3.1.3. REDD2 et la régulation de mTOR</b> .....	181
<b>3.3.2. Hnf1<math>\alpha</math> et le devenir des cellules entéroendocrines dans l'intestin grêle</b> .....	183
<b>3.3.2.1. L'épithélium intestinal et le diabète de type MODY-3</b> .....	183
<b>3.3.2.2. Hnf1<math>\alpha</math> et la régulation de l'expression de la ghréline</b> .....	186
<b>3.4. Hnf4<math>\alpha</math> et Hnf1<math>\alpha</math> dans la muqueuse de l'intestin grêle</b> .....	190
<b>3.4.1. Hnf4<math>\alpha</math>, Hnf1<math>\alpha</math> et la barrière épithéliale</b> .....	190
<b>3.4.2. Mortalité des souris double KO : quelques hypothèses</b> .....	193

3.4.2.1. <i>Les souris double KO-villine</i> .....	193
3.4.2.2. <i>Les souris double KO-CYP1A1</i> .....	194
<b>4. CONCLUSIONS</b> .....	197
4.1. <i>La cathepsine L participe au maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal</i> .....	197
4.2. <i>Hnf4<math>\alpha</math> promeut la différenciation des CEI dans un modèle de co-culture</i> .....	198
4.3. <i>L'invalidation de Hnf1<math>\alpha</math> chez la souris cause une intestinalomégalie, ainsi que des irrégularités dans la cytodifférenciation</i> .....	198
4.4. <i>La double invalidation de Hnf1<math>\alpha</math> et de Hnf4<math>\alpha</math> est néfaste pour la survie des animaux</i> .....	199
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	201
<b>LISTE DES RÉFÉRENCES</b> .....	203

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

### Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Suivi des naissances – Génotypes obtenus en comparaison aux prévisions de Mendel.....	154
<b>Tableau 2.</b> Récolte à P1 - Génotypes détaillés des souris obtenus en comparaison aux prédictions de la loi de Mendel .....	157
<b>Tableau 3.</b> Récolte à P1 – Génotypes obtenus en comparaison aux prévisions de Mendel.	157
<b>Tableau 4.</b> Nombre de souris traitées à la $\beta$ NF pour chaque génotype.....	162
<b>Tableau 5.</b> Observations détaillées - Double KO et <i>Hnfl</i> $\alpha$ KO hétérozygotes pour <i>Hnf4</i> $\alpha$	163
<b>Tableau 6.</b> Modulation de l'expression des hormones et facteurs de transcription impliqués dans le devenir des cellules entéroendocrines dans différents modèles de souris knockout.....	187

### Figures

<b>Figure 1.</b> Morphologie et cytologie de l'intestin grêle.....	5
<b>Figure 2.</b> Les jonctions de l'épithélium intestinal. ....	6
<b>Figure 3.</b> La morphogenèse épithéliale intestinal.....	7
<b>Figure 4.</b> Expériences de recombinaisons tissulaires qui ont démontré l'existence d'interactions épithélio-mésenchymateuses permissives et instructives.....	10
<b>Figure 5.</b> La voie de signalisation de Notch.....	12
<b>Figure 6.</b> La voie de signalisation canonique des Wnts. ....	15
<b>Figure 7.</b> La signalisation des BMPs.....	16
<b>Figure 8.</b> Stratégie de croisements pour obtenir les souris doubles KO. ....	156
<b>Figure 9.</b> Confirmation de la double invalidation dans l'intestin grêle des souris récoltées. ....	158
<b>Figure 10.</b> Les souris double KO-Villine présentent sensiblement le même phénotype que les souris <i>Hnfl</i> $\alpha$ KO .....	160
<b>Figure 11.</b> Le promoteur inductible CYP1A1 .....	161
<b>Figure 12.</b> Validation de l'induction du promoteur CYP1A via la voie orale .....	163
<b>Figure 13.</b> Les souris double KO et <i>Hnfl</i> $\alpha$ KO hétérozygotes pour <i>Hnf4</i> $\alpha$ survivent difficilement au traitement à la $\beta$ NF. ....	164

<b>Figure 14.</b> <i>Hnf4</i> $\alpha$ est invalidé suite aux traitements à la $\beta$ NF.....	164
<b>Figure 15.</b> La morphologie épithéliale semble affectée dans les double KO-CYP1A1.....	165
<b>Figure 16.</b> Induction de mTOR par les Wnts .....	180
<b>Figure 17.</b> Inactivation de l'AMPK dans les souris <i>Hnf1</i> $\alpha$ KO.....	182
<b>Figure 18.</b> Régulation de l'expression de la ghréline par <i>Hnf1</i> $\alpha$ .....	189

## LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

$\beta$ NF	$\beta$ -naphtoflavone
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPK	AMP-activated protein kinase
APC	Adenomatous polyposis coli
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BMP	Bone morphogenetic proteins
CCK	Cholécystokinine
Cdx2	Caudal-related homeobox 2
CEI	Cellules épithéliales intestinales
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
FABP	Fatty acid binding protein
FEP	Facteur endodermique proximal
G6P	Glucose-6-phosphate
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
G6PT	Glucose-6-phosphate transporteur
GIP	Polypeptide insulino-tropique glucose-dépendant
GLP-1	Peptide glucagon-like 1
HIF-1	Hypoxia-induced-factor-1
Hnf1 $\alpha$	Hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$
Hnf4 $\alpha$	Hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$
HPRT	Hypoxanthine-Guanine-Phospho-Ribosyl-Transférase
HRE	Hypoxia-responsive-element
HSPG	Protéoglycans à héparane sulfate
JA	Jonctions adhérentes
Jour E X	X <sup>e</sup> jour embryonnaire; X <sup>e</sup> post-coïtum
Jour P X	X <sup>e</sup> jour suivant la naissance
KO	Knockout; Invalidée
MODY	Maturity onset diabetes of the young
PBS	Tampon phosphate salin

PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
SI	Sucrase-isomaltase
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
RT-PCRq	RT-PCR quantitatif
TBP	TATA box binding protein
TCF	T cell factor
TSC1/TSC2	Tuberous sclerosis 1/ Tuberous sclerosis 2
TJ	Jonctions serrées
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

## RÉSUMÉ

L'épithélium de l'intestin grêle est en constant renouvellement. L'équilibre entre la prolifération et la différenciation cellulaire y est finement régulé par de nombreuses interactions entre l'épithélium et son environnement. Les interactions épithélio-mésenchymateuses engendrent une signalisation qui affecte l'expression génique essentielle au développement et au maintien d'une muqueuse fonctionnelle. Plusieurs facteurs de transcription endodermiques ont été identifiés comme régulateurs de l'épithélium intestinal. *Cdx2* en est un exemple, son expression dans les cellules épithéliales intestinales indifférenciées est suffisante à l'induction de leur différenciation en culture.

**Manuscrit 1 :** Afin de mieux comprendre les voies moléculaires impliquées dans la différenciation de l'épithélium intestinal, les gènes dont l'expression est modulée suite à l'induction de *Cdx2* dans les cellules épithéliales intestinales ont été analysés. La cathepsine L est induite avec la polarisation et la différenciation des cellules épithéliales intestinales et l'inhibition de son activité interfère avec ces processus. De plus, la perte de l'activité de cette protéase conduit à une augmentation de la multiplicité tumorale dans l'intestin des souris *APC<sup>Min</sup>*. Ces résultats montrent une fonction intracellulaire non suspectée pour la cathepsine L dans l'épithélium intestinal au cours de la polarisation et de l'initiation tumorale.

**Manuscrit 2 :** Pour identifier de nouveaux régulateurs de la différenciation épithéliale intestinale, un modèle de co-culture cellulaire permettant de récapituler la différenciation de cet épithélium a été établi et caractérisé génétiquement. *Hnf-4 $\alpha$*  et *Hnf-1 $\alpha$*  sont fortement induits au cours de cette différenciation. L'expression forcée de *Hnf-4 $\alpha$*  dans les cellules indifférenciées entraîne l'activation de *Hnf-1 $\alpha$*  et de plusieurs marqueurs des fonctions digestives, ainsi que l'établissement d'une barrière fonctionnelle en co-culture. Ces observations suggèrent que *Hnf-4 $\alpha$*  est un joueur important dans la régulation de la différenciation des cellules épithéliales intestinales.

**Manuscrit 3 :** Afin de démontrer les fonctions de *Hnf-1 $\alpha$*  dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal *in vivo*, le phénotype intestinal des souris invalidées pour *Hnf-1 $\alpha$*  a été analysé. Ces souris présentent une intestinalomégalie caractérisée par une augmentation de la prolifération



cellulaire et cryptale. Ces phénomènes étant associés à une augmentation de l'activité de mTOR. De plus, les souris invalidées pour *Hnf1α* présentent une modulation de l'expression de plusieurs marqueurs de cellules entéroendocrines. Ces observations suggèrent un rôle insoupçonné pour Hnf-1α dans le maintien de la croissance et le devenir des cellules entéroendocrines de l'intestin grêle.

**Section 4 :** Afin de confirmer la collaboration entre les facteurs Hnf-4α et Hnf-1α dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal *in vivo*, des souris invalidées pour *Hnf-1α* de façon classique et pour *Hnf-4α* uniquement dans l'épithélium intestinal (doublement invalidées), au cours du développement embryonnaire (*villine-Cre*) ainsi que chez l'adulte (*CYP1A1-Cre*), ont été produites. Les souris doublement invalidées au cours du développement meurent dans les premières 36 heures suivant leur naissance et les souris doublement invalidées à l'âge adulte meurent au cours du traitement qui permet l'invalidation de *Hnf-4α*. Ces résultats indiquent que la double invalidation de Hnf-1α et de Hnf-4α au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle est incompatible avec la survie des souris.

### **MOTS CLÉS**

Intestin grêle, épithélium, facteurs de transcription, prolifération, différenciation, cathepsin L, Hepatocyte nuclear factor-1α, Hepatocyte nuclear factor-4α

## **1. INTRODUCTION**

« Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme. » Antoine Lavoisier, 1777

Tout être actif doit récupérer l'énergie dépensée via l'assimilation des nutriments indispensables au maintien de son organisme. Cet équilibre est assuré par le système digestif, au cœur duquel se situe l'intestin grêle.

### ***1.1. L'épithélium de l'intestin grêle***

#### ***1.1.1. Morphologie et structure***

L'intestin grêle est un long tube, relié en sa partie proximale à l'estomac et en sa portion distale au côlon (Figure 1). Il est constitué de trois segments distincts, soit le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum, au niveau duquel sont délivrées la bile et les enzymes pancréatiques, constitue le lieu principal de la décomposition du bol alimentaire, alors que l'absorption se fait au niveau du jéjunum (majoritairement) et de l'iléon. La muqueuse intestinale est constituée d'un épithélium simple cylindrique faisant face à la lumière, sous lequel se retrouve la lamina propria, un stroma riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques, puis la musculaire muqueuse. La paroi intestinale est complétée par la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. La morphologie de l'intestin grêle, axée sur une maximisation de la surface de contact entre le bol alimentaire et la surface épithéliale, reflète directement ses fonctions de digestion et d'absorption des nutriments. Effectivement, cet organe, mesurant en moyenne 6 mètres chez l'humain, présente trois différents types de replis lui permettant d'élargir sa surface luminale. Tout d'abord, la muqueuse et la sous-muqueuse forment les valvules conniventes, replis transversaux donnant un aspect houleux à la surface intestinale. La muqueuse est également constituée d'un ensemble de projections ressemblant à des doigts et faisant face à la lumière, appelées villosités. Finalement, la

membrane apicale de chaque cellule épithéliale forme des structures surélevées nommées microvillosités, dont le regroupement constitue la bordure en brosse (HAUCK *et al.*, 2005; WALTHALL *et al.*, 2005).

### ***1.1.2. L'unité fonctionnelle***

L'épithélium de l'intestin grêle est un tissu dynamique, remplacé à tous les 3 à 5 jours chez l'adulte. Ce renouvellement s'effectue de façon coordonnée le long de l'axe crypte-villosité (Figure 1). Les cellules souches sont confinées au fond des cryptes, où elles se divisent, donnant naissance à une population de cellules progénitrices hautement prolifératives. Ces dernières migrent le long de la crypte, où elles subissent une succession de changements moléculaires, qui les amène progressivement à arrêter de proliférer et à entamer un processus de différenciation spécifique. Lorsqu'elles atteignent la jonction de la crypte et de la villosité, les cellules sont pleinement différenciées. Ainsi, la villosité est recouverte de cellules fonctionnelles, qui continuent leur migration jusqu'à l'apex, où elles meurent par apoptose (CROSNIER *et al.*, 2006; WALTHALL *et al.*, 2005).

### ***1.1.3. Les principaux types cellulaires***

Les cellules épithéliales intestinales (CEI) souches donnent naissance à deux grandes catégories de cellules matures: les cellules absorbantes et les cellules sécrétrices (CROSNIER *et al.*, 2006; HAUCK *et al.*, 2005). Les cellules absorbantes, nommées entérocytes, représentent environ 90% des CEI. L'entérocyte mature est une cellule cylindrique dont la membrane apicale, repliée en un riche réseau de microvillosités, constitue le lieu de fragmentation terminale des di-peptides et di-saccharides en unités simples. On y retrouve une multitude d'enzymes, telles la sucrase-isomaltase (SI), la lactase-phlorizine hydrolase et la dipeptidyl-peptidase IV. L'entérocyte exprime également les molécules

responsables de l'absorption, du transport et du largage des nutriments du côté baso-latéral, permettant ainsi leur assimilation aux liquides corporels (sang et lymphé).

Les cellules caliciformes (*Goblet cells*, en anglais) constituent le plus abondant des trois types de cellules sécrétrices. Ces cellules sécrètent le mucus et, à maturité, sont caractérisées par un cytoplasme apical distendu par l'accumulation des granules de sécrétion. La seconde catégorie est formée par les cellules entéroendocrines, qui constituent le premier niveau d'intégration de l'information provenant de la lumière intestinale. Ces cellules sont spécialisées dans la sécrétion d'une panoplie de peptides gastro-intestinaux essentiels à la régulation de la satiété, de la motilité du tube digestif, de la digestion et de l'absorption des nutriments, ainsi que de l'homéostasie énergétique (CUMMINGS et OVERDUIN, 2007; DRUCKER, 2007). Finalement, les cellules de Paneth participent à la protection de l'épithélium intestinal via la synthèse et la sécrétion de peptides antibactériens. Elles diffèrent des autres cellules matures de part leur localisation dans le fond des cryptes et leur durée de vie d'environ 20 jours (PORTER *et al.*, 2002).

#### ***1.1.4. La barrière épithéliale intestinale***

L'épithélium intestinal constitue la plus étendue de nos surfaces de contact avec le monde extérieur. Il est ainsi très cohésif afin d'assurer une importante fonction de barrière. Chaque CEI est reliée à sa voisine via 3 types de jonctions : les jonctions serrées (TJ), les jonctions adhérentes (JA) et les desmosomes (Figure 2). Ces complexes jonctionnels sont formés par des protéines transmembranaires dont les domaines extracellulaires interagissent de façon homotypique afin de relier des cellules adjacentes, alors que leurs domaines intracellulaires s'ancrent au cytosquelette, via des effecteurs cytoplasmiques. Les JA et les desmosomes sont importants pour maintenir le lien mécanique entre deux cellules. Alors que

les TJ forment une structure continue autour de la cellule, qui scelle l'espace intercellulaire et régule le transport paracellulaire des solutés ioniques (GROSCWITZ et HOGAN, 2009).

### ***1.1.5. La morphogenèse et la cytodifférenciation***

Chez les vertébrés, l'épithélium digestif origine de l'endoderme ventral. Au cours du développement embryonnaire, ce tissu sera soumis à de multiples changements morphogénétiques qui permettront l'établissement d'une muqueuse fonctionnelle. Certaines différences temporelles existent entre le développement de la muqueuse intestinale humaine et murine. Pour éviter la confusion, seul le processus murin est détaillé (Figure 3). À partir du jour 14,5 post-coïtum (E14,5), l'épithélium pluristratifié et indifférencié qui recouvre la paroi intestinale est progressivement converti en un épithélium simple cylindrique. Cette conversion est accompagnée de l'apparition graduelle de multiples évaginations mésenchymateuses résultant en la formation des villosités. Ces modifications se déroulent selon une vague antéropostérieure et sont complétées vers jour E18,5. À ce moment, l'épithélium est constitué d'entérocytes, de cellules caliciformes et de cellules entéroendocrines. Dans les premières semaines suivant la naissance, les cryptes prennent formes et se multiplient (fission cryptale), les villosités s'allongent et les cellules de Paneth apparaissent, ce qui permet la mise en place d'une muqueuse fonctionnelle (HAUCK *et al.*, 2005; SANCHO *et al.*, 2004; PORTER *et al.*, 2002). Une dernière période de transition a lieu lors de la période du sevrage, où des changements surviennent au niveau de l'expression génique et des fonctions cellulaires (ex : ↓ lactase; ↑ sucrase-isomaltase), ce qui permet l'obtention d'un épithélium adulte fonctionnel (TRABER et WU, 1995).

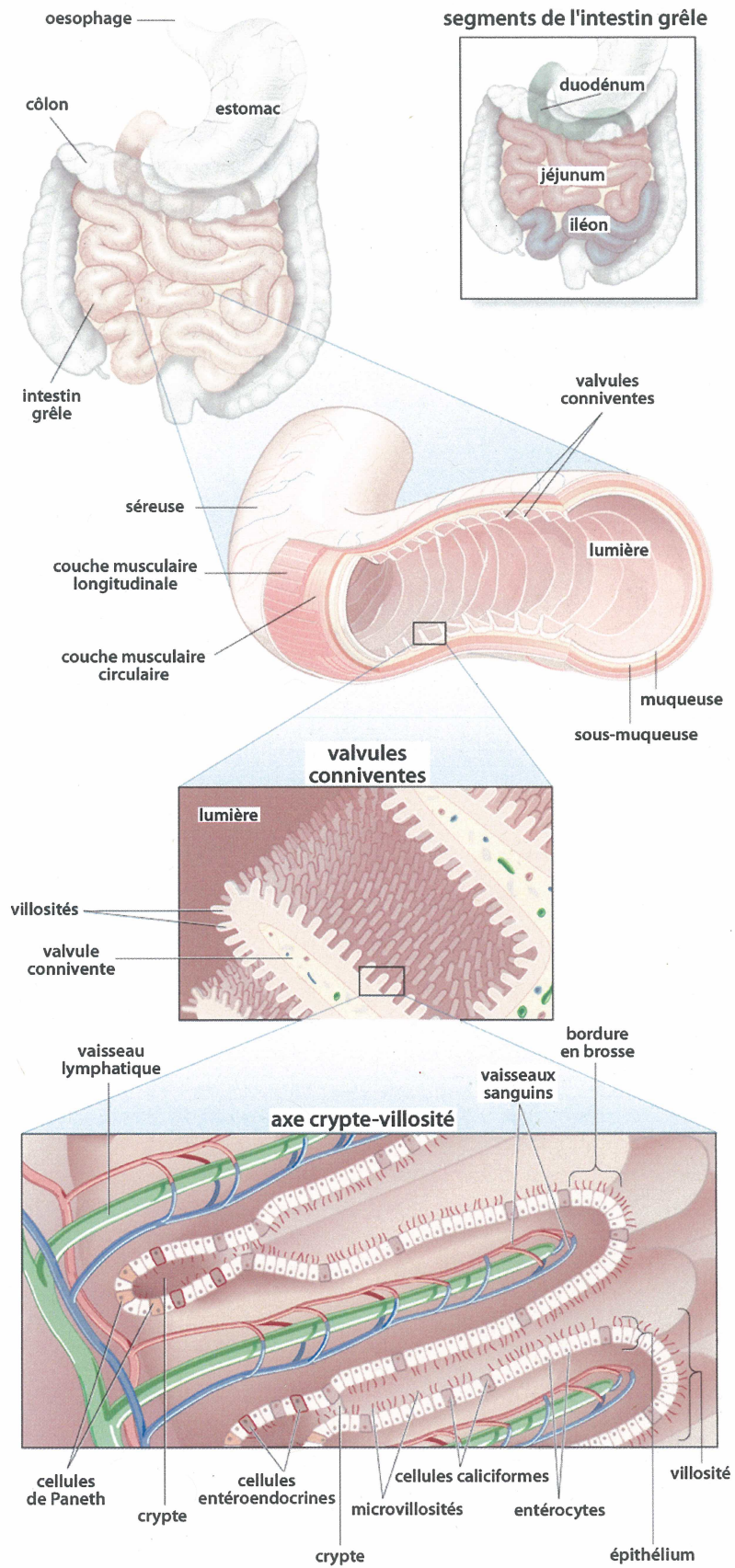
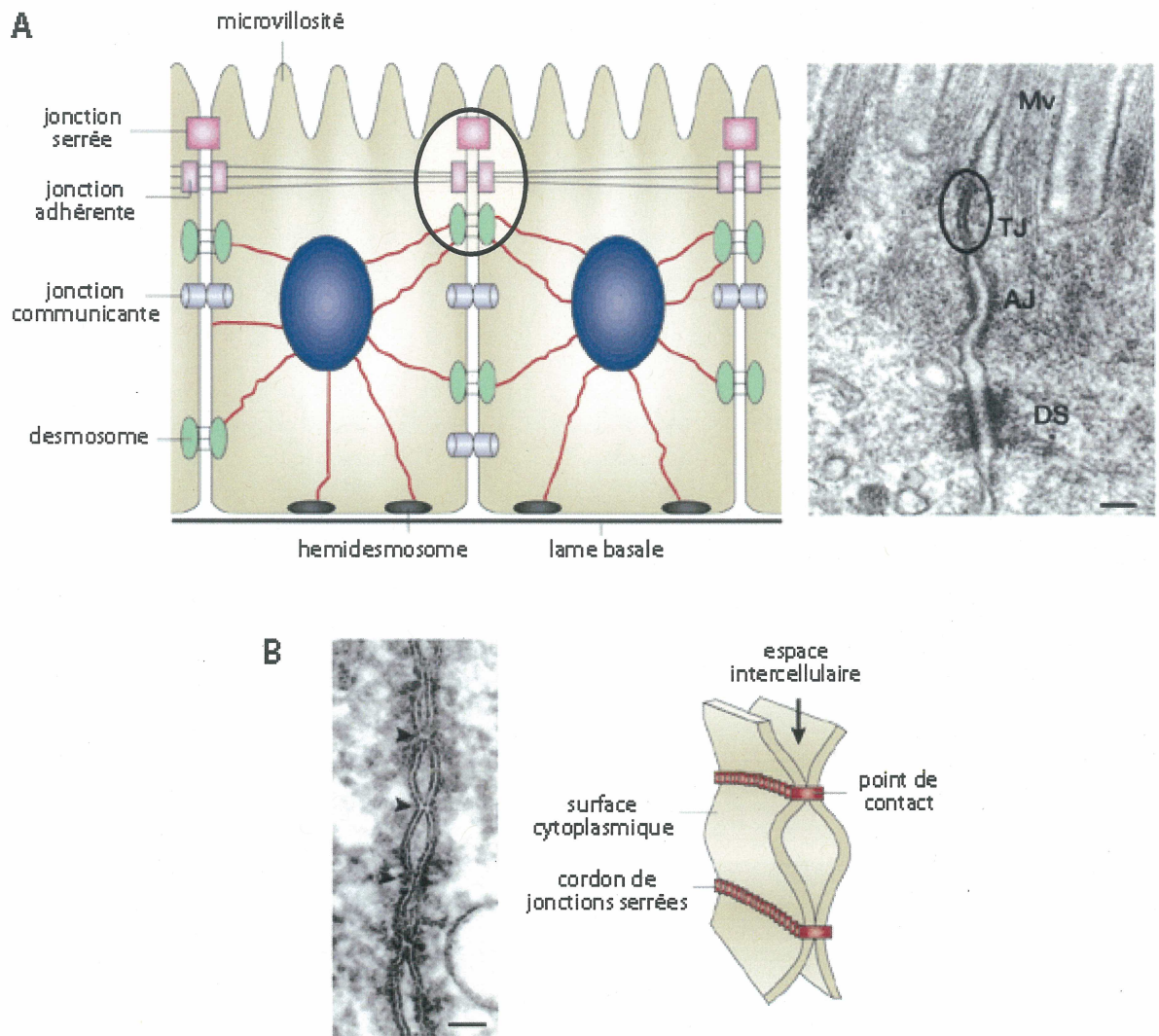
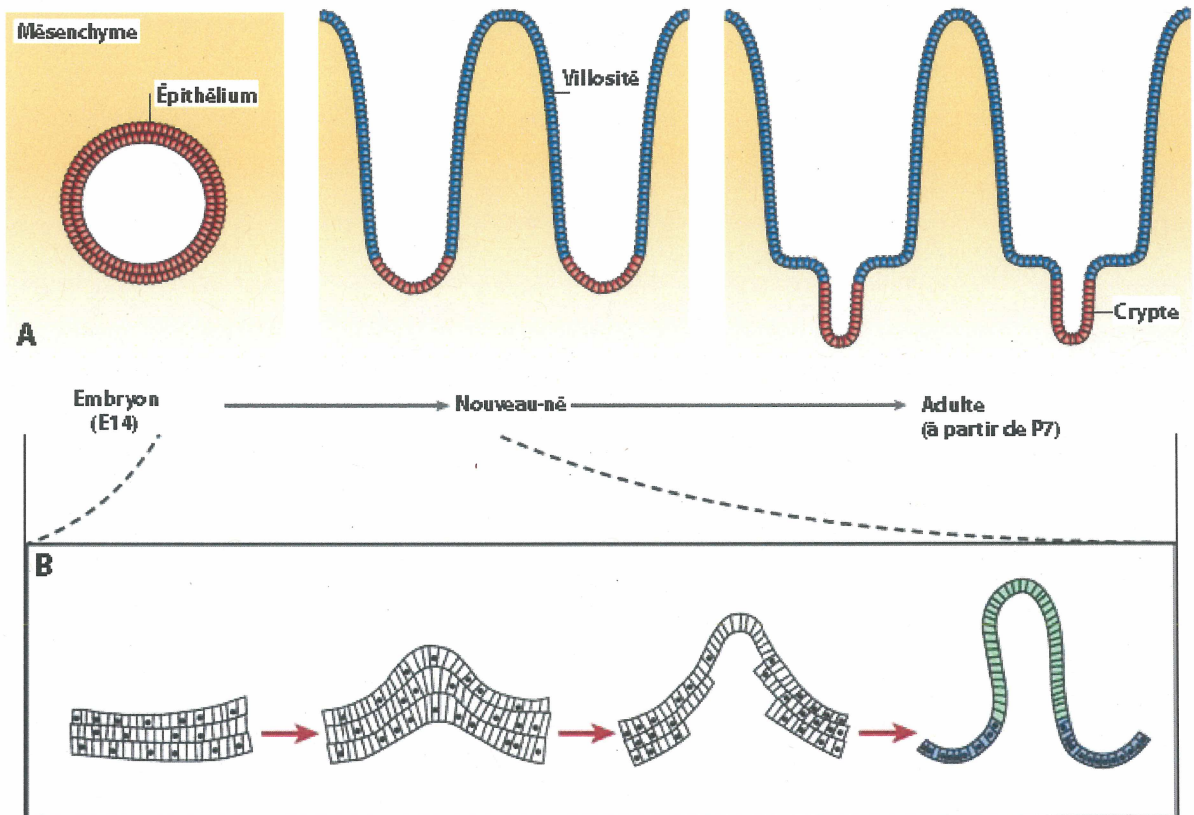


Figure 1. Morphologie et cytologie de l'intestin grêle. Adapté de [www.britannica.com](http://www.britannica.com)



**Figure 2. Les jonctions de l'épithélium intestinal.** A. Représentation schématique de deux entérocytes. Le complexe de jonction, localisé dans la partie la plus apicale de la membrane latérale, est entouré d'un cercle noir. La micrographie (à droite) présente un complexe jonctionnel typiquement retrouvé dans les CEI de souris. La jonction serrée est encerclée. Mv: microvillosité; TJ: jonction serrée; AJ: jonction adhérente; DS: desmosome. Barre = 200 nm. B. Micrographie d'une jonction serrée. Les points de contacts des jonctions serrées sont soulignés par des flèches. Barre = 50 nm. Représentation schématique d'une jonction serrée (à droite). Chaque cordon de jonctions serrées sur une membrane plasmique est associé à un second cordon sur la membrane de la cellule voisine, ce qui permet de sceller l'espace intercellulaire (point de contact). Adaptée de TSUKITA *et al.*, 2001.





**Figure 3. La morphogénèse épithéliale intestinale.** Représentations schématiques de la morphogénèse de l'épithélium intestinal. **A.** Les changements morphogénétiques liés à la cytodifférenciation des CEI débutent vers le jour E14,5. À la naissance, l'épithélium embryonnaire pluristratifié et indifférencié est complètement transformé en un épithélium simple cylindrique recouvrant la surface de petites villosités. Les cryptes se développent et se multiplient au cours des premières semaines suivant la naissance. **B.** Représentation détaillée de la transition d'un épithélium pluristratifié à un épithélium simple cylindrique dans lequel les cellules prolifératives (points noirs) sont confinées aux zones intervillositaires. Adaptée de SANCHO *et al.*, 2004 et de CROSNIER *et al.*, 2006.



## **1.2. Régulation du développement et de l'homéostasie épithéliale intestinale**

L'homéostasie de l'épithélium intestinal consiste en sa capacité à conserver son équilibre fonctionnel en dépit de ses contraintes environnementales. Pour que cet équilibre soit maintenu, une fine régulation des processus cellulaires doit être continuellement entretenue. Il a été démontré que de nombreuses interactions des CEI, entre-elles, ainsi qu'avec leur environnement, permettent d'engendrer et de moduler les différentes voies de signalisation qui maintiennent la nature des cellules souches et contrôlent la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire le long de l'axe crypte-villosité. Cette communication implique des facteurs solubles, des molécules de la surface et de la matrice extracellulaire, des protéines et récepteurs transmembranaires, ainsi qu'une panoplie d'effecteurs cytoplasmiques (SCOVILLE *et al.*, 2008; CROSNIER *et al.*, 2006; POWELL *et al.*, 2005).

### **1.2.1. Le mésenchyme est permissif à la différenciation intrinsèque de l'endoderme**

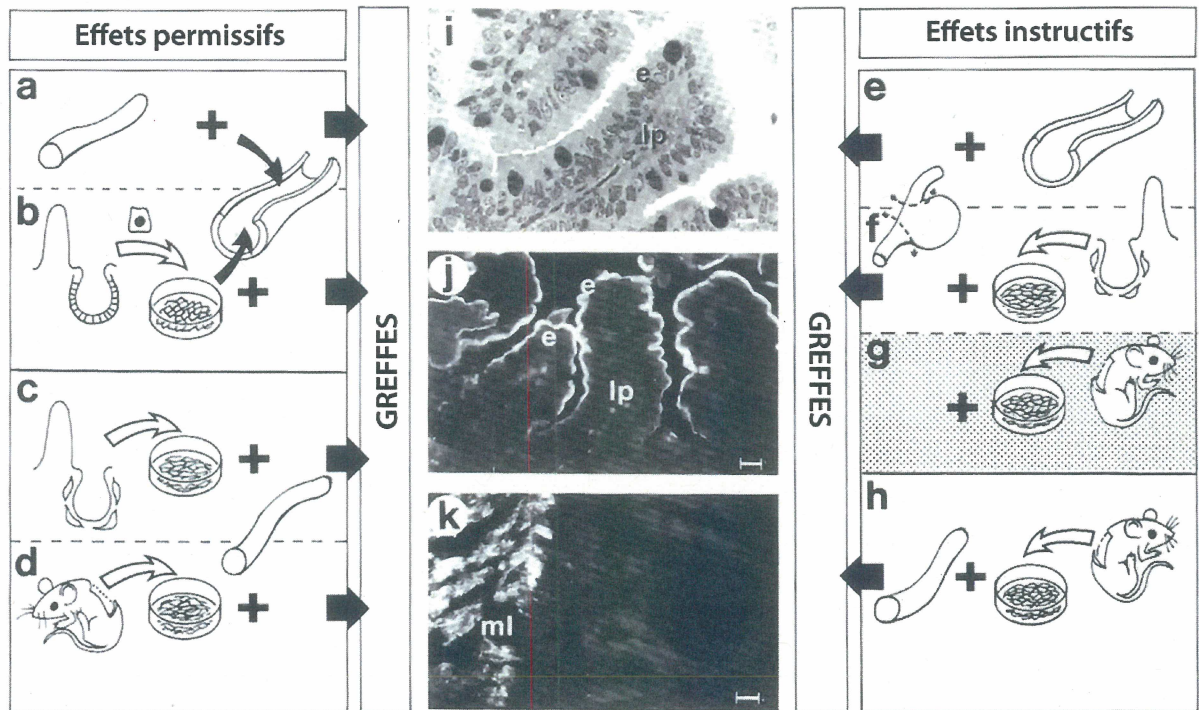
Dans les années 80, de nombreuses expériences de recombinaison tissulaire, associées à des cultures *in vitro* (cultures organotypiques) ou *in vivo* (isogreffes), ont permis de déterminer les fonctions des tissus endodermiques et mésenchymateux au cours de l'organogenèse intestinale (Figure 4). Il a alors été établi que le mésenchyme, peu importe son origine (peau, poumon, intestin), est permissif à la différenciation morphologique et fonctionnelle de l'endoderme de l'intestin grêle. Ce dernier possédant l'inscription génétique essentielle à sa propre différenciation, ainsi qu'à l'induction de la différenciation intestinale du compartiment mésenchymateux sous-jacent (tissu conjonctif et muscle lisse). Il a été démontré que ces principes s'appliquent également lors de recombinaisons interspèces. Ainsi, la recombinaison d'un tissu endodermique intestinal de rat avec des cellules mésenchymateuses foetales humaines, mène à la différenciation d'un épithélium présentant

les propriétés fonctionnelles de l'intestin de rat. Ces expérimentations ont permis d'établir que les cellules mésenchymateuses fœtales humaines constituent un environnement favorable aux capacités intrinsèques de développement de l'endoderme intestinal de multiples espèces animales (HAFFEN *et al.*, 1989; DAUÇA *et al.*, 1990).

Des expériences de recombinaison de cellules épithéliales et fibroblastiques adultes avec du mésenchyme et de l'endoderme embryonnaire, respectivement, ont démontré que les compétences de la communication épithélio-mésenchymateuse sont maintenues suite au développement embryonnaire. Ainsi, une lignée stable de CEI indifférenciées, isolée de cryptes de rats adultes (IEC-17) et qui n'a pas la capacité de se différencier en culture (QUARONI *et al.*, 1979), a régénéré une population épithéliale intestinale complète en isogreffes, lors de sa recombinaison avec du mésenchyme embryonnaire (HAFFEN *et al.*, 1989).

D'autre part, des recombinaisons hétérotypiques, entre des tissus provenant de l'intestin grêle et du tube digestif proximal (œsophage, estomac), ont permis de souligner une divergence le long de l'axe proximo-distal. Ainsi, le mésenchyme intestinal a la capacité d'instruire l'endoderme proximal à un devenir intestinal, alors que l'endoderme intestinal, peu importe l'origine du tissu mésenchymateux qui lui est associé, est confiné à un devenir fonctionnel intestinal (HAFFEN *et al.*, 1989).

Dans l'ensemble, ces expérimentations ont démontré que des interactions réciproques, entre l'endoderme et le mésenchyme, sont à l'origine des modifications morphogénétiques qui ont lieu au cours du développement embryonnaire de la muqueuse intestinale. L'endoderme intestinal étant responsable de son propre devenir ainsi que de celui du mésenchyme sous-jacent. De plus, la communication qui est mise en place lors de l'embryogenèse est maintenue chez l'adulte (HAFFEN *et al.*, 1989; DAUÇA *et al.*, 1990).



**Figure 4. Expériences de recombinaisons tissulaires qui ont démontré l'existence d'interactions épithélio-mésenchymateuses permissives et instructives.** Des effets permissifs sont démontrés pour le mésenchyme foetal intestinal sur la différenciation de l'endoderme intestinal (a) et des CEI cryptales (b), ainsi que pour des fibroblastes extraits de la muqueuse intestinale (c) ou de la peau (d) sur l'endoderme intestinal. Des effets instructifs sont démontrés pour le mésenchyme foetal intestinal (e) et des fibroblastes extraits de la muqueuse intestinale (f) sur la différenciation de l'endoderme gastrique, qui présente des caractéristiques de l'épithélium intestinal. Ce qui ne se produit pas lors de l'utilisation de fibroblastes extraits de la peau (g). Un effet instructif est aussi engendré par l'endoderme intestinal, qui induit la différenciation de fibroblastes de la peau en muscle lisse (h). Les micrographies (i-k) représentent les analyses morphologiques et fonctionnelles effectuées suite aux isogreffes. Section colorée au « periodic acid Schiff » (i), immunodétection d'enzymes digestives de la bordure en brosse (j) et de l'actine de muscle lisse (k). e : épithélium; lp : lamina propria; ml : muscle lisse. Barre = 20 µm. Tirée de DAUÇA *et al.*, 1990.

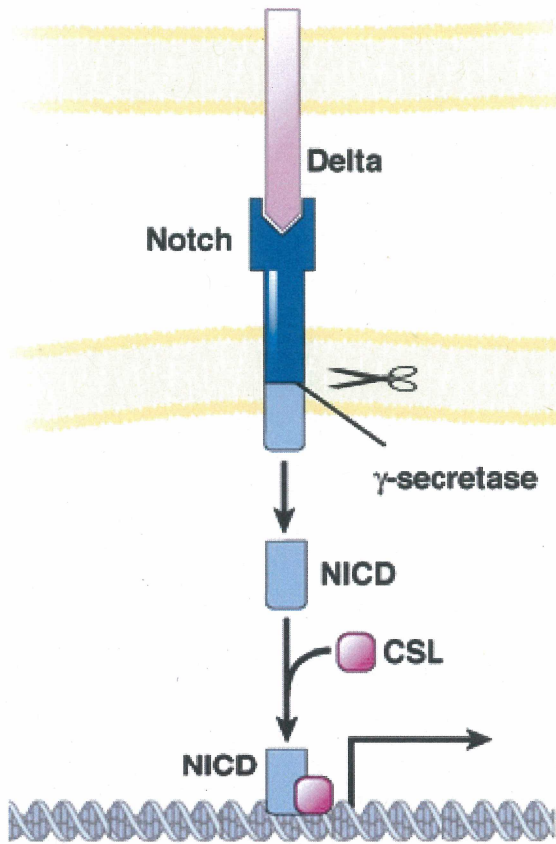
## **1.2.2. Les interactions épithéliales**

### **1.2.2.1. Les interactions via des molécules transmembranaires**

Les protéines transmembranaires qui constituent le lien physique entre deux cellules voisines au niveau des jonctions adhérentes (JA) et serrées (TJ), sont non seulement nécessaires au maintien de l'intégrité architectural et de la perméabilité de l'épithélium intestinal, elles y sont également d'importants régulateurs, directs ou indirects, de plusieurs processus cellulaires. La E-cadhérine, qui se localise dans les JA, en est un bon exemple. Il a été observé que le démantèlement des JA, par l'expression d'un dominant négatif de la N/E-cadhérine, augmente la prolifération et la migration des CEI au détriment de leur différenciation, les phénomènes inverses étant observés lors d'une expression transgénique de la E-cadhérine (GROSCWITZ et HOGAN, 2009; HERMISTON *et al.*, 1996). Il a été démontré que cette dernière participe à la régulation des fonctions cellulaires via le recrutement d'une multitude d'effecteurs cytoplasmiques (JEANES *et al.*, 2008). Ainsi, au cours de la différenciation des CEI, la E-cadhérine recrute et active la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), ce qui permet la formation des jonctions adhérentes, ainsi que la différenciation morphologique et fonctionnelle des CEI (LAPRISE *et al.*, 2002).

L'interaction entre les récepteurs Notch et leurs ligands est aussi une voie de communication dont les premiers intervenants sont des molécules transmembranaires (Figure 5). L'inhibition de la signalisation via Notch chez la souris, par la délétion conditionnelle du co-facteur *Rbpj* (famille CSL), ainsi que par des traitements avec un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase, entraîne la différenciation des CEI progénitrices en cellules sécrétrices, au détriment des entérocytes et de la prolifération cellulaire (VAN ES *et al.*, 2005). Inversement, l'activation constitutive de Notch cause la perte des cellules sécrétrices et l'augmentation de la prolifération (FRE *et al.*, 2005). L'activation de la voie de Notch résulte en la transactivation de gènes cibles, dont le facteur de transcription *Hes1*. La fonction

majeure de Hes1 est de réprimer l'expression d'un autre facteur de transcription, Atoh1. Puisque l'inactivation de *Atoh1* cause la perte des 3 types de cellules sécrétrices (YANG *et al.*, 2001), il est considéré que son expression spécifie la cellule vers un devenir de cellule sécrétrice. La cascade de signalisation qui découle de l'interaction de Notch et de ses ligands permet donc d'établir le premier évènement de la cytodifférenciation épithéliale intestinale, soit la détermination vers un devenir de cellule absorbante.



**Figure 5. La voie de signalisation de Notch.** L'interaction du récepteur Notch avec son ligand (Delta ou Jagged), exprimé à la surface de la cellule voisine, cause une série d'évènements moléculaires qui résulte en une protéolyse du domaine intracellulaire complet de Notch, nommé le NICD. Ce fragment contient une séquence de localisation nucléaire qui induit sa translocation au noyau, où il est impliqué de façon directe dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles via son interaction avec les facteurs de transcriptions de la famille CSL. Adaptée de SCOVILLE *et al.*, 2008

### 1.2.2.2. La voie de signalisation des Wnts

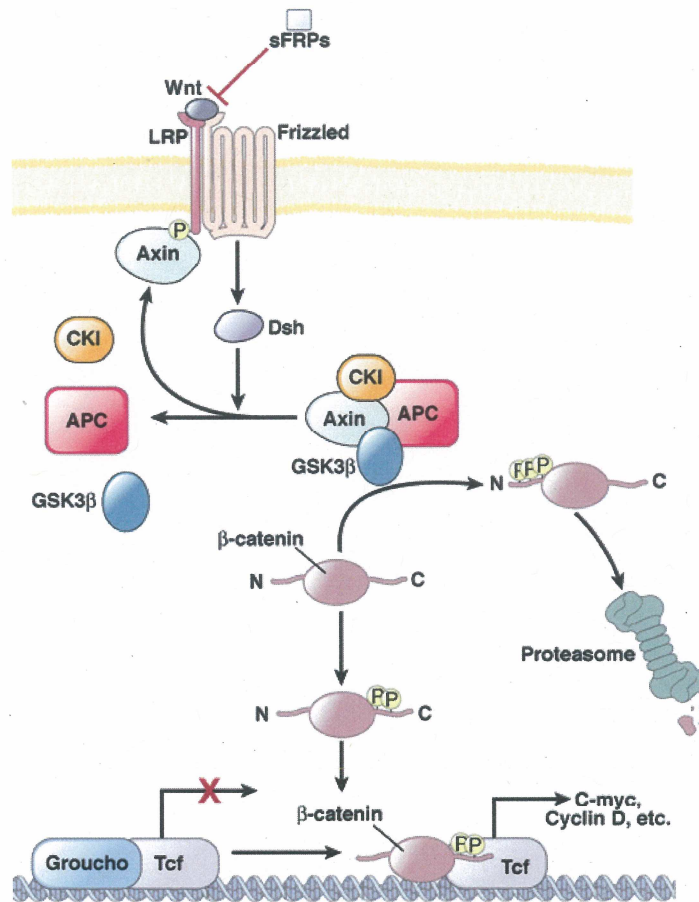
La communication d'une cellule épithéliale à une autre peut être également établie via la sécrétion de facteurs solubles. Le meilleur exemple de ce type d'interaction consiste en la signalisation engendrée par les facteurs Wnts, dont la cascade la mieux caractérisée est la voie dépendante de la  $\beta$ -caténine et de « T cell factor » (TCF), aussi nommée la voie canonique des Wnts (Figure 6). Des voies indépendantes de ces molécules ont également été identifiées, mais elles sont très peu caractérisées dans les CEI. Il est cependant possible qu'elles aient une certaine importance dans le maintien de cet épithélium (SCOVILLE *et al.*, 2008). Dans l'intestin grêle, certains Wnts et récepteurs Frizzled sont exprimés par les cellules épithéliales et mésenchymateuses de la villosité. Par contre, au niveau des cryptes, ces molécules sont uniquement synthétisées par les cellules épithéliales, ce qui suggère que cette voie de signalisation soit exclusive à l'épithélium dans la région proliférative (GREGORIEFF *et al.*, 2005).

De nombreuses expériences ont démontré l'importance de la signalisation des Wnts dans le maintien des CEI souches, ainsi que de la prolifération épithéliale *in vivo*. En effet, la surexpression d'un inhibiteur soluble des Wnts (PINTO *et al.*, 2003; KUHNERT *et al.*, 2004), l'inactivation conditionnelle de la  $\beta$ -caténine (IRELAND *et al.*, 2004), ainsi que l'inactivation de Tcf4 (KORINEK *et al.*, 1998) chez la souris, ont toutes conduit à une perte des cryptes et des cellules prolifératives. De plus, une équipe a démontré que les cellules souches (présomées) se différencient en entérocytes suite à l'inactivation conditionnelle de la  $\beta$ -caténine (FEVR *et al.*, 2007). L'ensemble de ces expérimentations suggère que les cellules souches sont perdues au profit de cellules différenciées lors de l'inactivation de la signalisation des Wnts, l'épithélium entier perdant ainsi sa capacité de renouvellement.

À l'inverse, la suractivation de cette voie, via la délétion de « adenomatous polyposis coli » (APC), mène à une augmentation de la prolifération cellulaire et à un allongement du compartiment cryptal (ANDREU *et al.*, 2005). Le premier type de lésion observable au cours de la carcinogenèse épithéliale intestinale, le foyer de cryptes aberrantes, est constitué de cryptes hyperplasiques dont l'apparition est majoritairement due (80% des cas) à des mutations dans le gène *APC* ou autres régulateurs de la voie des Wnts. De plus, la polypose adénomateuse familiale humaine, une maladie autosomale dominante caractérisée par la formation de nombreux polypes intestinaux (lésions bénignes), est causée par des mutations dans le gène *APC* (GREGORIEFF et CLEVERS, 2005). Les souris hétérozygotes pour une mutation dans ce gène (ex: *APC*<sup>Min/+</sup>) développent de multiples polypes intestinaux et constituent ainsi l'un des meilleurs modèles pour l'analyse *in vivo* de la signalisation précoce impliquée dans la carcinogenèse intestinale.

En plus de leur fonction centrale sur la prolifération et le maintien des cellules souches, les Wnts sont responsables de la séquestration des cellules de Paneth et progénitrices dans le fond des cryptes et leur signalisation est également essentielle à la maturation des cellules de Paneth (ANDREU *et al.*, 2005; BATLLE *et al.*, 2002). De par son implication dans l'ensemble des processus cellulaires de l'épithélium intestinal, la signalisation engendrée par les facteurs Wnts est centrale au contrôle du développement et du maintien de l'homéostasie de ce tissu (SCOVILLE *et al.*, 2008). Bien qu'elle soit intrinsèque à l'épithélium dans la crypte, de nombreuses cascades de signalisation interviennent dans la modulation de la voie des Wnts, soulignant l'importance des interactions de la CEI avec son environnement afin de maintenir l'homéostasie de l'épithélium de l'intestin grêle (GREGORIEFF *et al.*, 2005; SCOVILLE *et al.*, 2008).





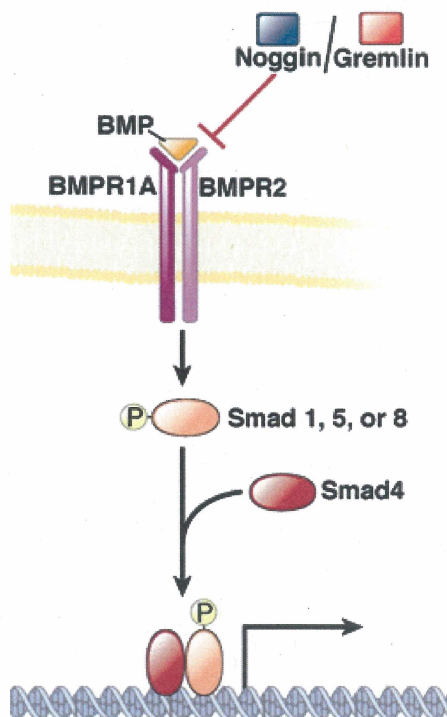
**Figure 6. La voie de signalisation canonique des Wnts.** En absence des Wnts, la  $\beta$ -caténine cytosolique libre est séquestrée et envoyée à la dégradation par le complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine. Ce complexe est composé des suppresseurs de tumeur APC et axine, qui agissent comme protéines d'échafaudage, ainsi que de la « casein kinase I » (CKI) et de la « glycogen synthase kinase 3 $\beta$  » (GSK3 $\beta$ ). La  $\beta$ -caténine est phosphorylée par la CKI, ainsi que par la GSK3 $\beta$ , ce qui résulte en son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Au niveau du noyau, les facteurs de transcription « lymphoid enhancer factor » (LEF)/TCF sont associés à des co-répresseurs, tel Groucho, et répriment ainsi les gènes cibles de la voie des Wnts. Le récepteur des Wnts est un complexe constitué d'un récepteur Frizzled (FZD1-8) et d'un co-récepteur LRP5 ou 6. La liaison d'un ligand Wnt active le complexe FZD/LRP, ce qui résulte en l'inactivation du complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine, par le recrutement de l'axine au niveau du co-récepteur LRP via une interaction avec Disheveled (Dsh). La  $\beta$ -caténine transloque alors au noyau où elle s'associe aux facteurs de transcription LEF/TCF, déplace les co-répresseurs et permet la transactivation des gènes cibles des Wnts. Adaptée de SCOVILLE *et al.*, 2008.



### 1.2.3. Les interactions épithélio-mésenchymateuses

#### 1.2.3.1. Les interactions via l'entremise de facteurs solubles

Sécrétés par l'épithélium ou les cellules mésenchymateuses, certains facteurs solubles traversent le milieu extracellulaire pour interagir avec leurs récepteurs, localisés au niveau des membranes plasmiques du compartiment voisin, afin d'y moduler l'expression génique. À titre d'exemple, les « bone morphogenetic proteins » (BMP) sont synthétisés par les cellules mésenchymateuses et leur association avec leurs récepteurs à la surface des CEI engendre une signalisation qui limite la prolifération cellulaire et cryptale, ainsi que la maturation des cellules sécrétrices (Figure 7; AUCLAIR *et al.*, 2007; HE *et al.*, 2004). Il a été observé que l'inactivation des BMPs chez la souris, via l'invalidation de leur récepteur ou une forte expression d'un inhibiteur, cause une augmentation de la  $\beta$ -caténine nucléaire. Ce qui suggère que les BMPs agissent tel un frein envers la voie de signalisation des Wnts, afin de contrôler le nombre de cellules souches et donc, le nombre de crypte (SCOVILLE *et al.*, 2008).



**Figure 7. La signalisation des BMPs.** Le récepteur des BMPs est un complexe formé du récepteur de type I (BMPR1) et de type II (BMPR2). La liaison du BMP au complexe de récepteurs permet son activation, ce qui induit la phosphorylation des Smads 1, 5 ou 8 (R-Smads). Une fois phosphorylé, le R-Smad s'associe à Smad 4 (co-Smad) et forme un hétérodimère qui transloquera au noyau afin de transactiver les gènes cibles. Certaines cellules sécrètent des inhibiteurs des BMPs (Noggin, Gremlin). Adaptée de SCOVILLE *et al.*, 2008.

### ***1.2.3.2. Les interactions via l'entremise de la matrice extracellulaire***

Les constituants de la matrice extracellulaire qui participent à la signalisation épithélio-mésenchymateuse sont généralement insérés dans la membrane basale. Cette dernière consiste en un agencement particulier de molécules de la matrice, localisé entre l'épithélium et le tissu mésenchymateux et dont les composantes sont synthétisées par l'un ou l'autre des deux compartiments cellulaires (SIMOM-ASSMANN *et al.*, 1988).

Les molécules de la lame basale sont perçues par des récepteurs transmembranaires, dont les plus communs sont les intégrines, des hétérodimères formés d'une sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$ . Suite à la liaison de leurs ligands, les intégrines ont la capacité d'induire des réarrangements du cytosquelette, ainsi qu'une signalisation intracellulaire impliquant, entre autre, des molécules impliquées dans la cascade de signalisation des tyrosines kinases (GIANCOTTI et RUOSLAHTI, 1999; SCHLAEPFER et HUNTER, 1998). Bien que l'invalidation intestinale spécifique de chacune des sous-unités  $\alpha$  des intégrines reste à venir, il a récemment été démontré que l'invalidation de la sous-unité  $\beta 1$  des intégrines dans l'épithélium intestinal cause une hyperplasie intestinale, reliée à une hyperprolifération de l'épithélium. Cette étude démontre l'importance de la communication épithélio-mésenchymateuse via les intégrines et la matrice extracellulaire pour la régulation de la prolifération des CEI (JONES *et al.*, 2006).

D'autre part, certaines composantes de la matrice extracellulaire et de la surface cellulaire interviennent dans la signalisation dépendante des facteurs solubles afin d'en moduler les effets. Par exemple, il a été démontré que les protéoglycans à héparane sulfate (HSPG) sont d'importants modulateurs de plusieurs voies de signalisation, dont celle dépendante des Wnts. Effectivement, plusieurs membres des HSPGs favorisent l'activation de cette voie, via la séquestration et la stabilisation des Wnts, ou encore en effectuant un rôle de co-récepteur (LIN, 2004). Au niveau de la muqueuse épithéliale intestinale, il a été

démontré que les cellules mésenchymateuses contrôlent la signalisation épithéliale des Wnts via la régulation de l'expression de certaines HSPGs (PERREAULT *et al.*, 2001).

### ***1.3. Les facteurs de transcription d'origine endodermique***

En plus de la signalisation engendrée par la communication des CEI avec leur environnement, la capacité de différenciation intrinsèque de l'épithélium intestinal origine de la régulation transcriptionnelle effectuée par des facteurs de transcription spécifiques aux tissus d'origine endodermique ou partageant des fonctions similaires.

#### ***1.3.1. Caudal-related homeobox 2***

*Caudal-related homeobox 2 (Cdx2)* est un facteur de transcription à homéodomaine qui a été cloné chez la souris en 1994, grâce à sa capacité de liaison au promoteur du gène de la *sucrase-isomaltase (SI; SUH et al., 1994)*. Son homologue, *caudal*, est impliqué dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur chez la drosophile (MORENO et MORATA, 1999). Chez la souris, *Cdx2* est exprimé dans les tissus embryonnaires à partir du jour E8,5. Il y est localisé au niveau du tube digestif postérieur, du bourgeon de la queue et dans les régions caudales du tube neural et de la notochorde (BECK *et al.*, 1995). Au cours du développement embryonnaire, une augmentation de l'expression de *Cdx2* se produit dans les CEI de façon coordonnée avec leur période de cytodifférenciation (JAMES *et al.*, 1994). Chez l'adulte, l'expression de *Cdx2* est restreinte à l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon (JAMES *et al.*, 1994). Au niveau de l'intestin grêle, on le retrouve dans toutes les CEI, exception faite des cellules de Paneth (SILBERG *et al.*, 2000; JAMES *et al.*, 1994), et il est exprimé selon un gradient croissant du bas à la demie de la crypte (BOULANGER *et al.*, 2005). De nombreuses études effectuées *in vitro* et *in cellulo* ont permis de démontrer que *Cdx2* a la capacité de réguler, seul ou en association avec d'autres régulateurs transcriptionnels,

plusieurs marqueurs des fonctions épithéliales intestinales, tels la *SI* (BOUDREAU *et al.*, 2002; SUH *et al.*, 1994), la *lactase-phlorizin hydrolase (Lct)*; FANG *et al.*, 2000), la *guanylyl cyclase C (Gucy2c)*; PARK *et al.*, 2000), la calbindin-D9K (*S100g*; COLNOT *et al.*, 1998) et la *mucine 2 (MUC2)*; YAMAMOTO *et al.*, 2003). De par sa localisation restreinte à l'épithélium intestinal, ainsi que sa capacité à moduler l'expression de nombreux gènes spécifiques aux fonctions des CEI, *Cdx2* semble être un régulateur essentiel du développement et du maintien de l'épithélium digestif.

La démonstration expérimentale de l'importance de *Cdx2* pour la différenciation des CEI a été réalisée via l'induction exogène de *Cdx2* dans le modèle cellulaire IEC-6 (SUH *et al.*, 1996). Ces cellules, isolées à partir d'un segment d'iléon de rat, ont été caractérisées comme étant prolifératives et indifférenciées, donc représentatives des cellules cryptales, et elles n'ont pas la capacité de se différencier en culture (QUARONI *et al.*, 1979). Les cellules IEC-6 n'expriment pas *Cdx2*. L'expression forcée de ce dernier via un système inductible cause une prolifération irrégulière, conduisant à la formation d'empilements cellulaires au sommet desquels certaines cellules se polarisent et expriment la *SI* (SUH *et al.*, 1996). Ces observations suggèrent un rôle fondamental pour *Cdx2* au cours de la différenciation des CEI. Malheureusement, l'inactivation de *Cdx2* chez la souris cause la mort des mutants homozygotes vers le jour E3,5, à un moment beaucoup trop précoce pour permettre l'analyse de l'impact de l'inactivation de *Cdx2* sur le développement de l'épithélium intestinal (CHAWENGSAKSOPHAK *et al.*, 1997). Cette mortalité est causée par une défectuosité d'implantation du blastocœle, dans lequel la différenciation du tissu extra-embryonnaire responsable de l'implantation, le trophoectoderme, est dépendante de *Cdx2* (NIWA *et al.*, 2005). Par contre, l'étude des souris hétérozygotes a permis de déterminer que *Cdx2* est essentiel pour le maintien de l'homéostasie intestinale (CHAWENGSAKSOPHAK *et al.*, 1997; BECK *et al.*, 1999). Effectivement, la perte d'un allèle de *Cdx2* cause l'apparition, au

niveau du colon proximal des souris, de lésions bénignes dans lesquelles l'expression de Cdx2 est absente. Ces lésions sont constituées d'un épithélium stratifié, tel que retrouvé au niveau de l'oesophage murin. Ces observations indiquaient que Cdx2 soit le facteur clé pour la détermination du devenir de l'épithélium intestinal, et qu'une cellule progénitrice qui exprime un niveau insuffisant de Cdx2 perd le signal de différenciation épithéliale intestinale, au profit d'un devenir proximal. Ce phénomène a été démontré tout récemment via une invalidation conditionnelle de Cdx2 dans la muqueuse épithéliale intestinale embryonnaire (GAO *et al.*, 2009).

### ***1.3.2. Hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$ (Hnf1 $\alpha$ )***

Hnf1 $\alpha$  est un facteur de transcription à homéodomaine, qui a été isolé en 1987 de par sa capacité à transactiver les promoteurs hépatiques de l' $\alpha$ - et du  $\beta$ -fibrinogène, ainsi que de l' $\alpha$ 1-antitrypsine (BAUMHUETER *et al.*, 1990; COURTOIS *et al.*, 1987; 1988). Il interagit avec sa séquence cible sous forme d'homo ou d'hétérodimères, via l'interaction avec son homologue Hnf1 $\beta$ . Hnf1 $\alpha$  est exprimé dans le foie, les reins, l'intestin, l'estomac et le pancréas (BAUMHUETER *et al.*, 1990; KUO *et al.*, 1990). Au jour E10,5, son ARNm est retrouvé dans l'endoderme du sac vitellin, ainsi qu'au niveau du bourgeon hépatique. Dans l'endoderme intestinal, l'expression de Hnf1 $\alpha$  débute au jour E11,5, et elle y est maintenue pour toute la période embryonnaire (BLUMENFELD *et al.*, 1991). Bien que son ARNm soit détectable tout au long de la vie de l'animal dans l'épithélium intestinal, l'expression protéique de Hnf1 $\alpha$  y est perdue durant les premiers jours post-nataux. Ce n'est qu'au cours de la période du sevrage, que Hnf1 $\alpha$  reprend progressivement sa place dans les noyaux de l'ensemble des CEI (BOSSE *et al.*, 2007; BOUDREAU *et al.*, 2002). Ce facteur de transcription a été démontré comme un régulateur de plusieurs gènes essentiels aux fonctions

de l'épithélium intestinal, tels que la *SI* (BOUDREAU *et al.*, 2001; 2002), la *Lct* (BOSSE *et al.*, 2006), la claudin-2 (SAKAGUCHI *et al.*, 2002), la « liver fatty acid binding protein » (*FABP1*, BOSSE *et al.*, 2007) et la calbindin-D9K (*S100g*; WANG *et al.*, 2004).

Les souris invalidées de façon classique pour *Hnfl*  $\alpha$  (*Hnfl*  $\alpha$  KO) naissent légèrement plus petites que les souris contrôles et, au cours des semaines suivant leur naissance, accusent un retard de croissance marqué (LEE *et al.*, 1998; PONTOGLIO *et al.*, 1996). Ce phénomène de nanisme semble dû à la diminution de l'expression hépatique du IGF-I, du IGF-II et du récepteur des glucocorticoïdes. La réintroduction de façon spécifique de *Hnfl*  $\alpha$  au niveau de cet organe permet d'obtenir des souris de taille normale (LEE *et al.*, 1998; 2003; LIN *et al.*, 2008). Le foie des souris *Hnfl*  $\alpha$  KO présente une hépatomégalie, qui est observable à partir de la 5<sup>e</sup> semaine post-natale et caractérisée par l'accumulation de glycogène dans les hépatocytes (LEE *et al.*, 1998; PONTOGLIO *et al.*, 1996). Ce phénomène est relié à la « glycogen storage disease » chez l'humain et est causé par une perte de l'activité de la glucose-6-phosphatase (HIRAIWA *et al.*, 2001). À partir de la seconde semaine post-natale, les souris *Hnfl*  $\alpha$  KO développent un diabète, caractérisé par une hyperglycémie dû à une faible concentration d'insuline circulante (LEE *et al.*, 1998; PONTOGLIO *et al.*, 1998). Il a été démontré que cette anomalie est causée par une défectuosité au niveau de la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques endocrines (PONTOGLIO *et al.*, 1998). L'invalidation de *Hnfl*  $\alpha$  chez la souris récapitule ainsi le phénotype des patients atteints d'un diabète de type MODY 3, qui est dû à des mutations autosomiques dominantes du gène *HNF1A* (VELHO *et al.*, 2003). Le phénotype intestinal des souris *Hnfl*  $\alpha$  KO n'a pas été étudié en détail.

### 1.3.3. Hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ (Hnf4 $\alpha$ )

Hnf4 $\alpha$  a été isolé en 1990, via sa capacité à transactiver les promoteurs hépatiques de la transthyrétine et de l'apolipoprotéine C-III (SLADEK *et al.*, 1990). C'est un facteur de transcription à doigts de zinc de la superfamille des récepteurs nucléaires, dans laquelle il est l'unique membre d'un sous-groupe de la catégorie des récepteurs "orphelins" (SLADEK *et al.*, 1990). Des analyses poussées de sa structure ont montré qu'un acide gras est inséré dans son site de liaison au ligand lors de sa synthèse, ce qui le rend constitutivement actif (WISELY *et al.*, 2002). Ainsi, suite à sa transcription, Hnf4 $\alpha$  subit une translocation au noyau, où il forme des homodimères qui ont directement la capacité de transactiver l'ADN (JIANG *et al.*, 1995). Généralement, la liaison de leur ligand induit un changement conformationnel chez les récepteurs nucléaires, ce qui cause la dissociation des corépresseurs et l'association des coactivateurs (GRONEMEYER *et al.*, 2004). L'activité de Hnf4 $\alpha$  est donc régulée via des mécanismes différents, tels que: l'utilisation de deux promoteurs (THOMAS *et al.*, 2001; TORRES-PADILLA *et al.*, 2002), l'épissage alternatif (SLADEK *et al.*, 1999) et la phosphorylation (GONZALEZ, 2008; JIANG *et al.*, 1997). De plus, ce facteur de transcription interagit avec plusieurs partenaires transcriptionnels (facteurs de transcription, coactivateurs et corépresseurs), ce qui lui confère une spécificité de transactivation spatio-temporelle (GONZALEZ, 2008). Par exemple, il a été démontré que dans les CEI, Hnf4 $\alpha$  peut établir une interaction protéine-protéine avec Hnf1 $\alpha$ , ce qui lui permet de transactiver l'expression de l' $\alpha$ 1-antitrypsine sans lui-même avoir un site de liaison à l'ADN sur le promoteur de ce gène (HU et PERLMUTTER, 1999).

Hnf4 $\alpha$  est exprimé majoritairement dans le foie, l'intestin grêle, le côlon, le pancréas et le rein. Au cours du développement, son ARNm est exprimé dans l'endoderme primaire dès le jour E4,5 et cette expression est maintenue dans les tissus extra-embryonnaires

(endoderme viscéral, sac vitellin,...). Dans l'embryon, *Hnf4α* apparaît dans l'endoderme au stade E8,5 au niveau des régions qui vont former le foie et les intestins (DUNCAN *et al.*, 1994). Son invalidation chez la souris cause des irrégularités lors de la gastrulation, dû à son rôle dans la différenciation de l'endoderme viscéral, ce qui mène à la mort des embryons avant le jour E10,5 (CHEN *et al.*, 1994; DUNCAN *et al.*, 1997). Une approche d'invalidation tissu spécifique est donc essentielle à l'étude des fonctions de ce facteur de transcription *in vivo* dans les tissus embryonnaires. Au niveau du foie, une invalidation spécifique de *Hnf4α* très tôt au cours du développement a démontré qu'il est impliqué dans la régulation de gènes importants pour le transport et le métabolisme des lipides, le contrôle de la déposition de glycogène, ainsi que l'adhésion et la formation des jonctions cellulaires (LI *et al.*, 2000; PARVIZ *et al.*, 2003; BATTLE *et al.*, 2006). Son invalidation chez l'adulte a également démontré qu'il est essentiel au maintien du métabolisme lipidique et à la survie des animaux. Par contre, la morphologie des hépatocytes (polarisation, jonctions) et l'expression de certains gènes modulés lors de l'invalidation embryonnaire (dont *Hnf1α*), n'étaient pas affectées par la perte de *Hnf4α* au stade adulte (HAYHURST *et al.*, 2001). Au niveau du côlon, son invalidation chez la souris à partir du jour E8,5 empêche la formation des glandes coliques et cause la perte, ou une diminution, de l'expression d'une multitude de gènes de transport, du métabolisme et de l'adhésion cellulaire (GARRISON *et al.*, 2006).

Au niveau de l'intestin grêle, *Hnf4α* est exprimé tout le long de l'axe crypte-villosité selon un gradient ascendant, son expression s'amplifiant avec la différenciation cellulaire (SAUVAGET *et al.*, 2002). *In vitro*, il a été démontré comme un régulateur de plusieurs gènes essentiels aux fonctions d'absorption et de digestion de l'épithélium intestinal, tels que la phosphatase alcaline intestinale (*ALP1*; OLSEN *et al.*, 2004), la FABP intestinale (*FABP2*; KLAPPER *et al.*, 2007), la guanylyl cyclase C (SWENSON *et al.*, 1999) et les



apolipoprotéines CIII et AIV (MIETUS-SNYDER *et al.*, 1992; SAUVAGET *et al.*, 2002). Une analyse bioinformatique comparant les promoteurs des gènes exprimés de façon différentielle entre les cryptes (cellules indifférenciées) et les villosités (cellules différenciées), a suggéré que Hnf4 $\alpha$  puisse être un régulateur central au cours de la différenciation de l'épithélium de l'intestin grêle (STEGMANN *et al.*, 2006). Toutefois, l'implication fonctionnelle du rôle de Hnf4 $\alpha$  au niveau de cet épithélium reste à être démontrée.

#### **1.4. Hypothèses et objectifs**

L'ensemble de mes travaux de recherche a été effectué à partir de l'hypothèse générale suivante : Les facteurs de transcription endodermiques Cdx2, Hnf1 $\alpha$  et Hnf4 $\alpha$  sont essentiels à la régulation de l'homéostasie épithéliale intestinale.

##### **1.4.1. Manuscrit 1**

Puisque l'induction de Cdx2 initie un programme de polarisation et de différenciation chez les CEI indifférenciées en culture, nous avons émis l'hypothèse que les voies moléculaires impliquées dans ces processus sont également importantes pour la régulation de l'homéostasie des CEI *in vivo*.

Une analyse d'expression génique par micropuce à ADN avait préalablement identifié le gène *cathepsine L* comme étant l'un des gènes les plus rapidement induits suite à l'expression de Cdx2 dans les CEI.

Le premier objectif de mon doctorat consistait ainsi en la caractérisation des fonctions de cette cystéine protéase au cours de la différenciation des CEI en culture. Pour ce faire, deux approches complémentaires ont été utilisées, soit l'inhibition de l'activité de la cathepsine L via un inhibiteur pharmacologique, ainsi qu'une diminution de son expression protéique via l'utilisation d'ARN interférence.

Le second objectif de cette étude visait à évaluer une fonction pour la cathepsine L au cours de l'initiation de la tumorigenèse épithéliale intestinale. Pour ce faire, les souris *APC<sup>Min</sup>* ont été croisées avec les souris *furless*, dans lesquelles l'activité de la cathepsine L est invalidée par une mutation ponctuelle.

### ***1.4.2. Manuscrit 2***

Comme les interactions épithélio-mésenchymateuses sont essentielles au développement et au maintien de l'épithélium intestinal, nous avons émis l'hypothèse que les CEI cryptales ont besoin d'être en contact avec des cellules mésenchymateuses afin de se différencier efficacement en culture.

Au cours de cette étude, mon premier objectif visait à établir et caractériser un modèle de co-culture cellulaire permettant de récapituler la différenciation des CEI. L'approche choisie a été l'ensemencement de CEI immortalisées sur une monocouche de cellules mésenchymateuses.

Mon second objectif était de caractériser la fonction des facteurs de transcription Hnf1 $\alpha$  et Hnf4 $\alpha$  au cours de la différenciation des CEI en co-culture, via l'expression forcée de ces deux facteurs de transcription dans ces cellules.

### 1.4.3. Manuscrit 3

Puisque que  $Hnf1\alpha$  a été identifié comme un régulateur de plusieurs gènes encodant pour des marqueurs fonctionnels des CEI et qu'il a un rôle important à jouer dans le contrôle de l'homéostasie du glucose, nous avons émis l'hypothèse que  $Hnf1\alpha$  est un important régulateur de l'homéostasie de l'épithélium intestinal *in vivo*.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle de souris invalidées de façon classique pour  $Hnf1\alpha$ .

Au cours de cette étude, mon premier objectif consistait en l'analyse morphologique du phénotype intestinal des souris invalidées pour  $Hnf1\alpha$ .

Mon second objectif était de vérifier l'impact de l'invalidation de  $Hnf1\alpha$  sur le devenir fonctionnel des différents types de cellules épithéliales différenciées.

#### **1.4.4. La double invalidation de *Hnf1α* et *Hnf4α***

En parallèle aux études précédentes, l'invalidation conditionnelle de *Hnf4α* dans la muqueuse intestinale a été effectuée et caractérisée dans notre laboratoire (BABEU *et al.*, 2009). Malgré le rôle majeur que mes travaux avaient préalablement montré pour ce facteur de transcription dans la différenciation fonctionnelle du modèle de co-culture, l'intestin grêle de ces souris n'est que légèrement affecté par l'invalidation de *Hnf4α*. De plus, l'expression de *Hnf1α* y est conservée.

Puisque mes travaux précédant démontraient que l'invalidation de *Hnf1α* chez la souris n'altère pas de façon vitale les fonctions métaboliques de l'intestin grêle, nous avons émis l'hypothèse que *Hnf1α* et *Hnf4α* puissent collaborer (de façon directe ou indirecte) dans le contrôle des fonctions métaboliques de cet organe. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai produit des souris totalement invalidées pour *Hnf1α* et invalidées de façon conditionnelle au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle pour *Hnf4α*.

Dans ce dernier volet de mon doctorat, mon premier objectif consistait à déterminer l'impact de cette double invalidation lors de la période embryonnaire, via l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *villine* (BABEU *et al.*, 2009; MADISON *et al.*, 2002).

Mon second objectif visait à vérifier l'impact de cette double invalidation lors de la période post-sevrage, via l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur inductible du promoteur du gène *Cyp1a1* (IRELAND *et al.*, 2004).

## 2. RÉSULTATS

### 2.1. Manuscrit 1

François Boudreau, **Carine R. Lussier**, Sébastien Mongrain, Mathieu Darsigny, Julie L. Drouin, Geneviève Doyon, Eun Ran Suh, Jean-François Beaulieu, Nathalie Rivard et Nathalie Perreault. Loss of cathepsin L activity promotes claudin-1 overexpression and intestinal neoplasia. 2007. FASEB J. Dec;21(14):3853-65. Epub 2007 Jul 10.

### AVANT-PROPOS

Bien que mon apport intellectuel y soit non négligeable, ma participation à cette première étude est majoritairement technique. J'ai effectué la plupart des expériences entourant la caractérisation de l'expression et de l'activité de la cathepsine L au cours de la différenciation des cellules IEC-6/Cdx2L1. J'ai mis au point et effectué les essais enzymatiques, ainsi que les traitements avec les inhibiteurs de la cathepsine L. J'ai effectué toutes les expériences de microscopie électronique sur les cellules, les immunofluorescences indirectes, les RT-PCR et les RT-PCRq quantitatifs. J'ai cloné et validé les shRNA dirigés contre la cathepsine L et j'ai effectué les infections cellulaires. J'ai mis au point le génotypage des souris furless via l'utilisation du PCRq (mutation ponctuelle) et j'ai géré partiellement la colonie de souris. Les études de croisements avec les souris  $APC^{Min}$  ont été effectuées par l'équipe de la Pre. Perreault, particulièrement par Julie Drouin. Les fragmentations cellulaires et la plupart des travaux techniques entourant la claudine-1 ont été effectués par Sébastien Mongrain. Lors de la rédaction du manuscrit, j'ai rédigé plusieurs portions de la section «material and methods», j'ai préparé plusieurs figures et j'ai effectué des expériences en vue de satisfaire les évaluateurs. Tout au long de cette étude, j'ai aidé à la progression du travail par des discussions régulières avec les différents membres de l'équipe, apportant ainsi mon point de vue et mes idées.

## RÉSUMÉ

L'intégrité et la polarité épithéliales intestinales sont maintenues par des interactions cohésives entre les cellules via la formation des jonctions serrées. Des irrégularités dans les jonctions serrées ont récemment été associées avec l'initiation et la progression de néoplasies intestinales. Les protéines de la famille des claudines font partie intégrante de la structure et de la fonction des jonctions serrées, mais les événements moléculaires qui régulent l'expression de ces composantes sont très peu connus. La présente étude identifie la cathepsine L, classiquement une cystéine protéase localisée dans le lysosome, comme étant induite au cours de la polarisation et la différenciation épithéliale intestinale. L'inhibition de l'activité intracellulaire de la cathepsine L dans des cellules épithéliales en culture résulte dans l'accumulation de couches cellulaires désorganisées et en un déclin de l'expression de marqueurs de différenciation. Ceci coïncide avec une accumulation rapide de la claudin-1 au niveau protéique. Des souris mutantes, déficientes en activité de la cathepsine L (*furless*), présentent un niveau élevé de l'expression intestinale des claudines 1 et 2. La perte de l'activité de la cathepsine L entraîne une élévation marquée de la charge tumorale dans l'intestin des souris *Apc<sup>Min</sup>*. Vu le rôle biologique traditionnel de la cathepsine L dans le traitement du contenu lysosomal ainsi que dans le remodelage pathologique de la matrice extracellulaire, les résultats présentés démontrent une fonction intracellulaire non suspectée pour cette protéase dans la polarisation épithéliale intestinale normale ainsi que l'initiation de néoplasie.

**LOSS OF CATHEPSIN L ACTIVITY PROMOTES CLAUDIN-1  
OVEREXPRESSION AND INTESTINAL NEOPLASIA.**

François Boudreau<sup>1</sup>, Carine R. Lussier<sup>1</sup>, Sébastien Mongrain<sup>1</sup>, Mathieu Darsigny<sup>1</sup>, Julie L. Drouin<sup>1</sup>, Geneviève Doyon<sup>1</sup>, Eun Ran Suh<sup>2</sup>, Jean-François Beaulieu<sup>1</sup>, Nathalie Rivard<sup>1</sup> and Nathalie Perreault<sup>1</sup>

From the <sup>1</sup>Département d'Anatomie et Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, CIHR Group in Functional Development and Physiopathology of the Digestive Tract, Sherbrooke, Québec, Canada and the <sup>2</sup>Department of Medicine, GI division, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA



## ABSTRACT

Intestinal epithelial integrity and polarity are maintained by cohesive interactions between cells *via* the formation of tight junctions. Irregularities in tight junctions have only recently been found to be associated with the initiation and progression of intestinal neoplasia. The claudin family of proteins is integral to the structure and function of the tight junction but little is known of the molecular events that regulate the expression of these components. The present report identifies cathepsin L, classically a lysosomal cysteine protease, as being induced during intestinal epithelial cell polarization and differentiation. Inhibition of intracellular cathepsin L activity results in the accumulation of disorganized cell layers and a decline in the expression of differentiation markers in cultured intestinal epithelial cells. This coincides with a rapid upregulation of claudin-1 protein accumulation. Mutant mice defective in cathepsin L activity (*furlless*) display an elevated level of intestinal claudin-1 and claudin-2 expression. Loss of cathepsin L activity leads to a marked increase in tumor multiplicity in the intestine of *ApcMin* mice. Given the traditionally viewed biological role of cathepsin L in the processing of lysosomal content as well as in pathological extracellular matrix remodeling, the results here demonstrate an as yet unsuspected intracellular role for this protease in normal intestinal epithelial polarization and initiation of neoplasia.

*Key words: Tight junction•polarization• intestinal epithelium*

## INTRODUCTION

Establishment of the functional adult intestinal epithelium is the result of several succinct steps starting with the gross morphogenesis of the digestive tract, followed by cytodifferentiation of the epithelium and induction of intestine-specific genes (1). The mature intestinal epithelium is composed of absorptive cells and secretory cell lineages (Paneth, goblet, and enteroendocrine) organized in a compartmentalized cellular monolayer, with cellular proliferation limited to the crypt region and terminally differentiated cells present on the villi (1). This epithelium is maintained by a constant renewal program initiated by crypt stem cell division, rapid proliferation of progenitor cells, differentiation, and apoptosis. The integrity of the intestinal epithelial barrier is achieved by macromolecular assembly of the tight junction (TJ) complexes between cells and contributes to the normal function of the intestinal epithelium (2). Claudins are crucial members of the transmembrane tetraspan family that constitute TJ (3). More than 14 different claudin members are detectable in the mouse adult intestine, some of which display differential expression patterns along the horizontal and vertical axes (4). Claudin-1, -3, and -4 are up-regulated in colorectal cancer (5) and claudin-1 was recently shown to influence intestinal epithelial cell transformation and colon cancer metastasis (6).

Differential molecular mechanisms account for the intricate control of proliferation vs. differentiation of the epithelium. One of the best-characterized signaling pathways controlling proliferation and differentiation along the crypt-villus axis is the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway (7). Activation of canonical Wnt signaling leads to stabilization of  $\beta$ -catenin, which accumulates in the cytoplasm, translocates to the nucleus and associates with the transcription factor T cell factor/lymphoid-enhancing factor (TCF/LEF) (8). This signaling imposes a crypt progenitor phenotype (9) and controls crypt Paneth cell positioning

(10). Nuclear  $\beta$ -catenin delocalization is a prerequisite for intestinal epithelial cell differentiation (11), and sustained Wnt signaling significantly contributes to the initiation of colorectal cancer (12–14). The  $\beta$ -catenin/Tcf transcriptional complex has also been suggested to positively regulate transcription of the claudin-1 gene in colorectal cell lines (6, 15). In an effort to gain a better understanding of the molecular pathways involved in the control of intestinal epithelial cell homeostasis, we investigated target genes modulated during the induction of cell polarization and differentiation by gene expression analysis. As a model, we used the intestinal epithelial cell line IEC-6, which conditionally expresses Cdx2, a transcription factor that initiates intestinal epithelial differentiation (16, 17). This analysis identified cathepsin L as a component induced during the course of this process.

Cathepsin L belongs to the cysteine protease class of the papain superfamily that is involved in intracellular and extracellular protein degradation (18). The intracellular role of cathepsin L has long been regarded as related exclusively to terminal degradation of proteins in the lysosomal compartment given its relatively high abundance in lysosomes and its ubiquitous distribution (19). Cathepsin L is synthesized as a proenzyme and targeted to the endoplasmic reticulum for subsequent processing into its active, mature enzymatic form in the acidic environment of late endosomes or lysosomes (20). However, alternative routing has also been reported to account for the specific targeting of extracellular procathepsin L (21, 22). A growing amount of evidence supports a direct link between secreted procathepsin L and progression of pathological conditions such as colorectal cancer (23–26). It is now well accepted that cysteine proteases such as cathepsin L promote the degradation of basement membranes and extracellular matrix, thereby facilitating invasion and metastasis (27). Recent reports have also demonstrated a crucial role for cathepsin L in hair follicle morphogenesis (28) as well as in differentiation of spermatocytes in mice (29). Recent evidence has challenged the intracellular lysosome-restricted role of this cysteine protease

with the demonstration that cathepsin L functions in the regulation of cell cycle progression through its presence in the nucleus and its ability to proteolytically process the CDP/Cux transcription factor (30). These observations suggest that normal cathepsin L expression could be crucial to the maintenance of cellular homeostasis and may play a role in the constant paradigm between proliferation and differentiation.

Here we demonstrate that inhibition of cathepsin L activity interferes with the molecular mechanisms that instruct epithelial cells to polarize and undertake a differentiation program. Inhibition of cathepsin L activity induces claudin-1 expression both *in vitro* and *in vivo*. Mice deficient for cathepsin L enzymatic activity have an enhanced tumor multiplicity in the intestinal neoplasia *ApcMin* mouse model. These observations open up a new field of investigation for the implication of intracellular cysteine proteases in the control of normal intestinal epithelial homeostasis as well as in the initiation of intestinal epithelial disease.

## MATERIALS AND METHODS

### *Cell culture*

The IEC-6/Cdx2L1 cell line (17) was maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 4.5 g/liter d-glucose, 25 mM HEPES, 5% fetal bovine serum, and 0.1 U/ml insulin. The Caco-2/15 cell line was maintained under identical conditions except for 10% fetal bovine serum. Cells were subcultured for 5 to 10 passages and prevented from reaching confluence. For pharmacological treatments, cells were supplemented with the cell membrane-permeable Z-Phe-Tyr(tBu)-diazomethylketone (ZPhe) (Bachem Bioscience, St. Helens, UK) or the cell membrane nonpermeable Z-Phe-Tyr-CHO (cathepsin L inhibitor 2, Inh 2) Calbiochem, San Diego, CA, USA) at varying concentrations, as indicated. Cell proliferation was monitored by the measurement of [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation exactly as reported elsewhere (31).

### *Mice and macroadenoma counts*

C57BL/6J-*Apc*<sup>Min</sup> and C57BL/6J-*furless* mice were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Homozygous mice and control littermates (wild-type) were obtained by breeding with C57BL/6J. For macroadenomas studies, age-matched *Apc*<sup>Min</sup> (control) and *Apc*<sup>Min</sup> (*furless*) mice on a C57BL/6J background were sacrificed at 90 to 100 days of age. Mice were genotyped for *Apc*<sup>Min</sup> alleles as reported previously (32). The *furless* point mutation was detected by real-time PCR using fluorogenic probes as described previously (33). The 5' amplification primer was 5'-agtgtgcatgtataaaggc-3' and the 3' amplification primer was 5'-ccttgagcgtgagaac-3'. The 5' hybridization probe (anchor probe) was 5'-cccgatgcgctaacgcc-3' and the 3' hybridization probe (sensor probe) was 5'-

aggaaacatctgtccttctaggc-3'. Real-time PCR and melting point analysis were performed using the Light-Cycler apparatus and software 4.0 (Roche Diagnostics, QC, Nutley, NJ, USA). The melting curve analysis was obtained as follows: 95°C, 0 s, 40°C, 2 min increasing to 70°C at 0.2°C/s with a continuous read. To evaluate macroadenomas in adult mice, the gastrointestinal tract from stomach to rectum was removed. The stomach and small intestine was cut longitudinally and washed gently with PBS to remove fecal material. Tissues were placed in a Petri dish and the mucosa was overlaid with 1% methylene blue. A dissection microscope was used to count the polyps as described previously (34).

### ***Microarray analysis***

Microarray analysis was performed using the Atlas Mouse 588 cDNA Expression Array membrane (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Total RNA was obtained from IEC6 and IEC6-Cdx2L1 cells that had been grown in the absence or presence of 4 mM isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) for 30 h. Preparation of probes and hybridization were performed according to the user manual. Briefly, cDNA was labeled at 50°C for 25 min in the reverse transcription (RT)/amplification reaction containing 5  $\mu$ g of DNase I-treated total RNA, 1  $\mu$ l primer mix (provided by Clontech), 50  $\mu$ M dNTPs, 0.5  $\mu$ l [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP (3,000 Ci/mmol, 10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l), 5 mM dithiothreitol, and 5  $\mu$ l reaction buffer with 200 U of M-MLV reverse transcriptase. The labeled cDNA was purified with a NucleoSpin Extraction Spin column (Clontech) to remove unincorporated nucleotides. Arrays were hybridized at 68°C overnight with the labeled probes, washed, and exposed for autoradiography. Signals on hybridized filters were recorded by a phosphorimager (Storm PhosphorImager; Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA, USA). The result of each gene in each subject was recorded as the intensity of hybridization signal. The digitized data were analyzed using image analysis software associated with the cDNA arrays (Atlas Image, ver. 1.5; Clontech Laboratories).

The signal intensity of each element on the array was determined and corrected by subtracting background. After signals in each array were normalized to the housekeeping (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) *G3PDH* gene, each gene was compared from experiment to experiment for differential expression.

### ***Plasmid construction and lentivirus production***

The lentiviral shRNA expression vector (pLenti6-U6) was constructed by cloning the U6 promoter from pSilencer 2.0-U6 (Ambion, Austin, TX, USA) into pLenti6/V5-D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Briefly, the U6 promoter was amplified by PCR from pSilencer 2.0-U6 using the forward primer 5'-ccatcgatcatgattacgaattgcaacg-3' (insertion of a *Cla*I site) and the reverse primer 5'-ggccagtgcgaagcttg-3'. The PCR product was digested with *Bam*HI and *Cla*I and cloned into recircularized pLenti6/V5-D-TOPO between the *Bam*HI and *Cla*I sites replacing the cytomegalovirus promoter. shRNA oligonucleotides were designed according to Ambion guidelines (technical bulletin #506) using the siRNA sequences ggatggatcttgtaaatac (#1) or ggcagatagtgaatggcta (#2) with ttcaagaga as the loop sequence (see Fig. 6A). The oligonucleotide-annealed product was subcloned into plenti6-U6 between the *Bam*HI and *Xho*I sites, giving rise to pLenti6-shCTSL. An irrelevant (irr) pLenti-sheGFP negative control was similarly generated with the siRNA sequence gccacaacgtctatatcatgg. Lentiviruses were produced and used for cell infection according to Invitrogen recommendations (ViraPower Lentiviral Expression System, Instruction Manual).

### ***Cell fractionation along the crypt-villus axis***

Segments of mouse CD-1 small intestine were inverted onto polyethylene tubing, ligated at both extremities, and washed extensively with KRP buffer, pH 7.5, as described previously (35). Segments were then incubated under agitation with ice-cold isolation buffer (2.5 mM

EDTA and 0.25 mM NaCl) for 2 min. After each interval, cell suspensions were centrifuged at 400 g for 5 min. Pellets were then washed with ice-cold KRB buffer and lysed in chilled Triton lysis buffer [150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 40 mM Tris, pH 7.6, 1% Triton X-100, 1% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 0.1 mM orthovanadate]. The crypt or villus origin of the various cell fractions was determined by evaluating sucrase-isomaltase and trehalase brush border enzyme activities as described previously (35).

### *Enzymatic assays*

Total protein extracts were isolated in acetate buffer (0.1M sodium acetate, pH 5.2, 1 mM EDTA, 0.01% Triton X-100) by three freeze (liquid nitrogen) and thaw (37°C) cycles. Protocols and specific biochemicals for the assay of cathepsin L activity were provided by Calbiochem. Briefly, 10 µl of fresh cell lysate were diluted in 0.1% BRIJ 35 to a total of 500 µl. The enzyme was activated for 1 min at 30°C in the presence of 250 µl of assay buffer (340 mM sodium acetate, 60 mM acetic acid, 4 mM EDTA, pH 5.5; 8 mM DTT added just before use) after which 250 µl of the substrate solution (20µM Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin) was added. After a 10 min incubation at 30°C, the enzymatic reaction was stopped by the addition of 1 ml of stop solution (100 mM sodium monochloroacetate, 70 mM acetic acid, 30 mM sodium acetate, pH 4.3). The 7-amido-4-methylcoumarin (AMC) fluorescent product was quantified using a spectrofluorometer with an excitation wavelength of 370 nm and an emission wavelength of ~460 nm. Standard curves were performed with dilutions of AMC stock solution using a 1:1 mixture of assay buffer and stop solution. One unit was defined as the amount of enzyme hydrolyzing 1 mmol of Z-Phe-Arg-AMC at 30°C, pH 5.5. To ensure specificity of cathepsin L activity detection, the specific cathepsin B



substrate Z-Arg-Arg-amido-4-methylcoumarin (Calbiochem) was used in parallel. No significant cathepsin B activity was detected under these conditions.

#### ***In vitro transcription/translation and claudin-1 processing assay***

*In vitro* transcription/translation was performed with rabbit reticulocyte lysate-TNT kit from Promega and vectors supporting expression for either Cux/CDP, human  $\beta$ -catenin or human claudin-1; 0.1  $\mu$ l of synthesized protein was further used for each assay. Activated cathepsin L enzyme isolated from human liver (Calbiochem) was incubated with the *in vitro* synthesized products in reaction buffer (50 mM sodium acetate, 0.04 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT at pH 5.5) at 37°C for 15 min in a total volume of 20  $\mu$ l as described elsewhere (36). The reactions were then analyzed by Western blot.

#### ***Western blot analysis***

Total protein extracts were isolated with lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1% Nonidet P-40, 0.5% Nadeoxycholate) containing protease and phosphatase inhibitors (37). Differential extraction of cellular proteins from the cytosol, membrane and organelles, nucleus and cytoskeleton was performed with the ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit according to the manufacturer's instructions (Calbiochem, EMD Biosciences, San Diego, CA, USA). Twenty  $\mu$ g of protein extract or 20  $\mu$ l of concentrated extracellular medium was analyzed by 4–12% BisTris Nu-PAGE (Invitrogen) and transferred onto a PVDF blotting membrane (Roche Diagnostics, QC). Western blot was then performed as described (37). The following affinity-purified antibodies from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) were used: cathepsin L (C-18) goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping the C terminus of human cathepsin L (1/250), histone-H1 (FL-

219) rabbit polyclonal antibody raised against the full-length peptide sequence of human histone-H1 (1/250), CDP affinity-purified goat polyclonal antibody mapping the C terminus of human CDP (1/250), and actin goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping the C terminus of human actin (1/10000). Both claudin-1 (1 µg/ml) and claudin-2 (1 µg/ml) rabbit polyclonal antibody from Zymed Laboratories (Invitrogen) as well as a β-catenin rabbit polyclonal antibody raised against a peptide mapping the C terminus of human β-catenin (1/3000) from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) were used.

### *Electron microscopy*

Cell cultures and portions of mouse intestinal segments were rinsed with PBS, prefixed for 15 min with a 1:1 mixture of culture medium (Dulbecco's modified Eagle's medium) and freshly prepared 2.8% glutaraldehyde in cacodylate buffer (0.1 M cacodylate and 7.5% sucrose), then fixed for 30 min with 2.8% glutaraldehyde at room temperature. After two rinses, specimens were postfixed for 1 h with 2% osmium tetroxide in cacodylate buffer. The tissues were then dehydrated using graded ethanol concentrations (40, 70, 90, 95, and 100%, three times each) and coated twice for 3 h with a thin layer of Araldite 502 resin (for ethanol substitution). Finally the resin was allowed to polymerize at 60°C for 48 h. The specimens were detached from the plastic vessels, inverted in embedding molds, immersed in Araldite 502, and polymerized at 60°C for 48 h. Ultramicrotome-prepared thin sections were contrasted with lead citrate and uranyl acetate, then observed on a Jeol 100 CX transmission electron microscope. All reagents were purchased from Electron Microscopy Sciences (Cedarlane, Hornby, ON, Canada).

### ***RNA analysis***

Total RNA was isolated from cultured cells and subjected to DNase treatment according to the manufacturer's instructions (ToTALLY RNA kit, Ambion, TX, USA). Reverse transcription reactions were carried out at 42°C for 1 h in the presence of 1 µg RNA, 40 mU of polyoligo(dT)12–18 (Amersham Biosciences) and 40 U of reverse transcriptase (Roche Diagnostics, QC). Typical PCR reactions were performed in a total volume of 50 µl in the presence of 1 µl of RT reaction, 1 U of HotMaster *Taq*DNA polymerase (Eppendorf), and 100 ng of each specific oligonucleotide. Real-time PCR was performed using a LightCycler apparatus (Roche Diagnostics, QC). Experiments were run and analyzed with the LightCycler software 4.0 (relative quantification monocolor) according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, QC). Synthesis of double-stranded DNA during the various PCR cycles was monitored using SYBR Green I (QuantiTect SYBR Green PCR Kit; Qiagen, Valencia, CA, USA) and PCR programs designed as detailed in the QuantiTect SYBR Green PCR Handbook (Qiagen). A standard calibration curve was prepared for each gene using serial dilutions of the calibrator sample (IEC6/Cdx2 cells); crossing point values were then plotted vs. the log of the relative concentration of each dilution. This standard curve was used to correct for differences in the efficiency of the PCR reactions varying from 1.82 to 2.00 depending on the amplified target. Primer sequences are available on request.

### ***Indirect immunofluorescence on intestine or cultured cell preparations***

Indirect immunofluorescence was performed as described before (38) except that tissues and cell samples were fixed in methanol at -20°C. A claudin-1 rabbit polyclonal antibody from Zymed Laboratories (Invitrogen) was diluted 1/80 in BSA 2%. Images were captured on a Leica DMLB2 microscope using a Leica DC300 camera.

### ***Statistical analysis***

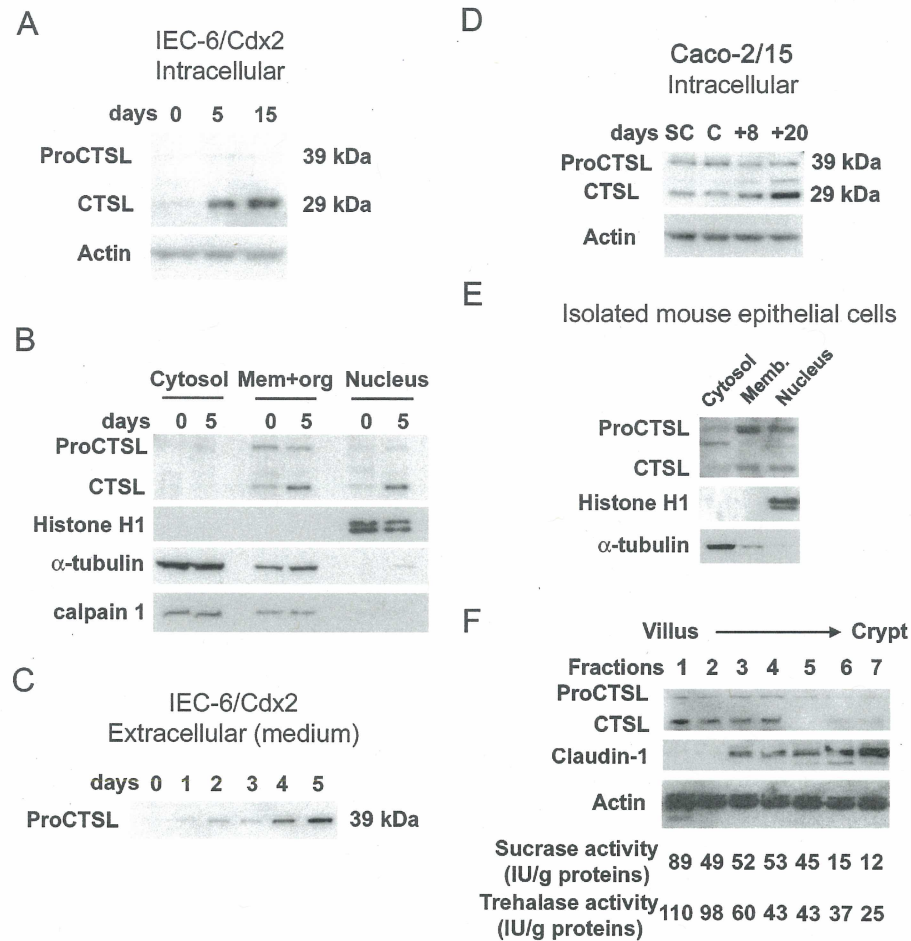
Data are expressed as mean  $\pm$  se. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test.

Differences were considered significant with a *P* value of  $\leq 0.05$ .

## RESULTS

### *Cathepsin L expression is up-regulated in differentiated intestinal epithelial cells*

To identify novel molecular targets involved in intestinal epithelial cell differentiation, a cDNA microarray analysis was performed with samples obtained from epithelial cells induced to differentiate. The IEC-6/Cdx2L1 cell line, which conditionally expresses the transcription factor Cdx2 when IPTG is included in the culture medium (16, 17), was used. Total RNA was isolated from 30 h IPTG-induced or uninduced cells and processed for microarray analysis. The cathepsin L gene product, predicted to be significantly up-regulated, was selected for further investigation (data not illustrated). The cathepsin L profile during IEC-6/Cdx2L1 differentiation was then established at the protein level. Western blots were performed, with total extracts obtained at various intervals from IEC-6/Cdx2L1 cells induced to differentiate. A strong increase in the 29 kDa catalytically active processed form of cathepsin L (CTSL) was observed (Fig. 1A). Differential extraction of IEC-6/Cdx2L1 cellular proteins from the cytosol, membrane/organelles, and nuclear compartments demonstrated that the 29 kDa catalytically active form of cathepsin L was specifically up-regulated in the membrane/organelles (2-fold $\pm$ 0.08,  $P\leq 0.001$ ) and nuclear cellular compartments (1.8-fold $\pm$ 0.009,  $P\leq 0.001$ ) (Fig. 1B). Since procathepsin L has been reported to be secreted by intestinal epithelial cells in culture (39), we next verified whether the increase in intracellular cathepsin L could be associated with the accumulation of extracellular procathepsin L. Cell culture media were concentrated from IEC-6/Cdx2L1 cells at different intervals after induction of cellular differentiation and subjected to Western blot analysis. Procathepsin L secreted protein was detected in the culture medium 1 day after IPTG supplementation and increased with time (Fig. 1C).

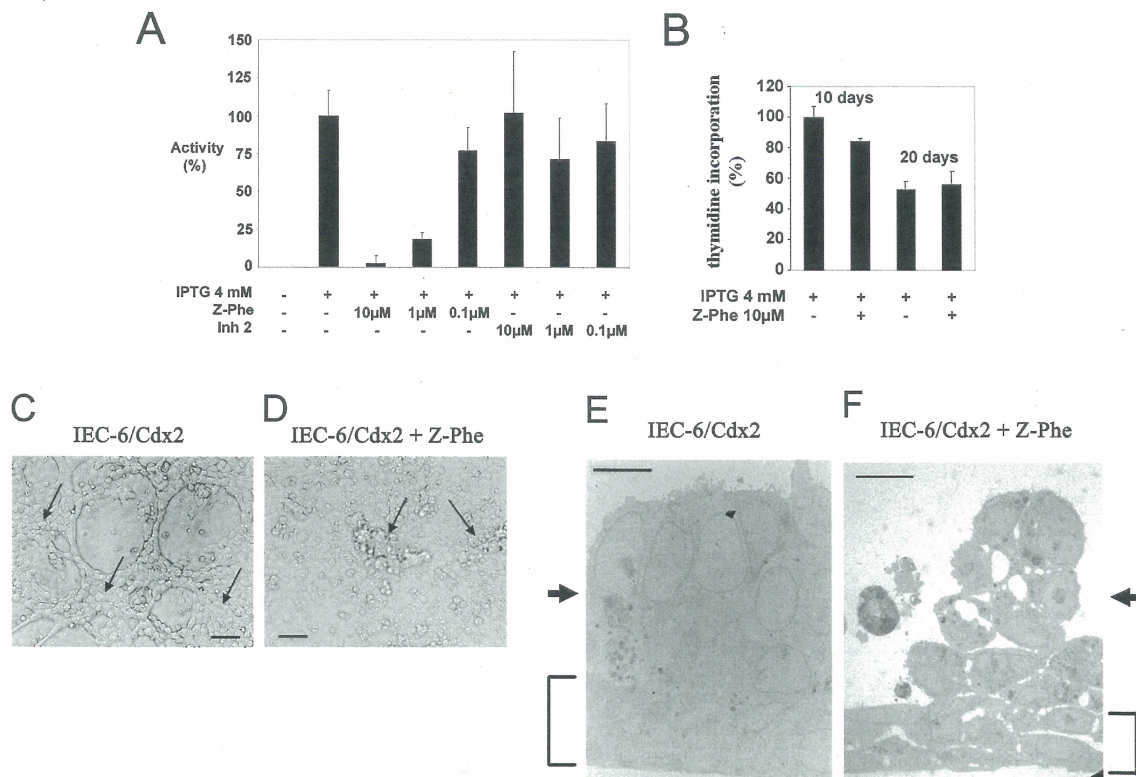


**Figure 1. Cathepsin L expression is induced in differentiated intestinal epithelial cells.** *A*) Western blot analysis was performed using a cathepsin L polyclonal antibody on 20  $\mu$ g of total cell lysates harvested on various days from IEC-6/Cdx2L1 cells cultured in the presence of 4 mM IPTG. *B*) Subcellular fractions [cytosol, membranes, organelles (Mem\_org), and nucleus] of IEC-6/Cdx2L1 cells were prepared 0 and 5 days after addition of 4 mM IPTG and Western blots were performed with cathepsin L, histone-H1,  $\alpha$ -tubulin, and calpain 1 antibodies. *C*) Western blot analysis was performed using a cathepsin L polyclonal antibody on concentrated culture medium harvested on various days from IEC-6/Cdx2L1 cells cultured in the presence of 4 mM IPTG. *D*) Total lysates of Caco-2/15 cells (SC, subconfluent; C, confluent; \_8, 8 days after confluency; \_20, 20 days after confluency) were harvested and a Western blot was performed with cathepsin L or actin antibodies. *E*) Intestinal epithelial cells were isolated from the jejunum of adult mice and subcellular fractions were prepared and blotted as described in panel *B*. *F*) Western blot analysis was performed with 20  $\mu$ g of lysates from isolated mouse crypt and villus epithelial cell populations (fractions 1–7; see Materials and Methods).

These observations indicated that the initiation of IEC-6/Cdx2L1 differentiation is associated with an intracellular accumulation of catalytically active cathepsin L as well as extracellular secretion of procathepsin L. A specific increase in catalytically active cathepsin L expression was also observed in postconfluent Caco-2/15 cells, which spontaneously differentiate into enterocytes upon reaching confluence (Fig. 1D). To verify that catalytically active cathepsin L could be detected in the nucleus of enterocytes *in vivo*, epithelial cells were isolated from the mouse adult intestine. Differential extraction of cellular proteins confirmed the presence of the 29 kDa catalytically active form of cathepsin L into the nucleus (Fig. 1E). To further reinforce the relationship between the induction of cathepsin L expression and intestinal epithelial differentiation, the expression profile of cathepsin L was investigated along the small intestinal epithelium *in vivo*. The expression profile of cathepsin L was assessed in crypt and villus cell populations sequentially isolated from adult mouse jejunum according to a modified Weiser procedure (35). Expression of the catalytically active form of cathepsin L was strongly increased in cell populations associated with differentiation (Fig. 1F). Overall, these observations confirmed that catalytically active cathepsin L protein expression is up-regulated in differentiated intestinal epithelial cells.

***Intracellular inhibition of catalytically active cathepsin L impairs intestinal epithelial cell polarization and differentiation***

To further investigate the functional relationship between the increase in cathepsin L expression and intestinal epithelial cell differentiation, experiments were undertaken in which intracellular and extracellular cathepsin L activity was inhibited during cell differentiation. The effect of two highly specific and nonreversible cathepsin L pharmacological inhibitors was first evaluated on enzyme intracellular activity during IEC-6/Cdx2L1 differentiation (Fig. 2A).

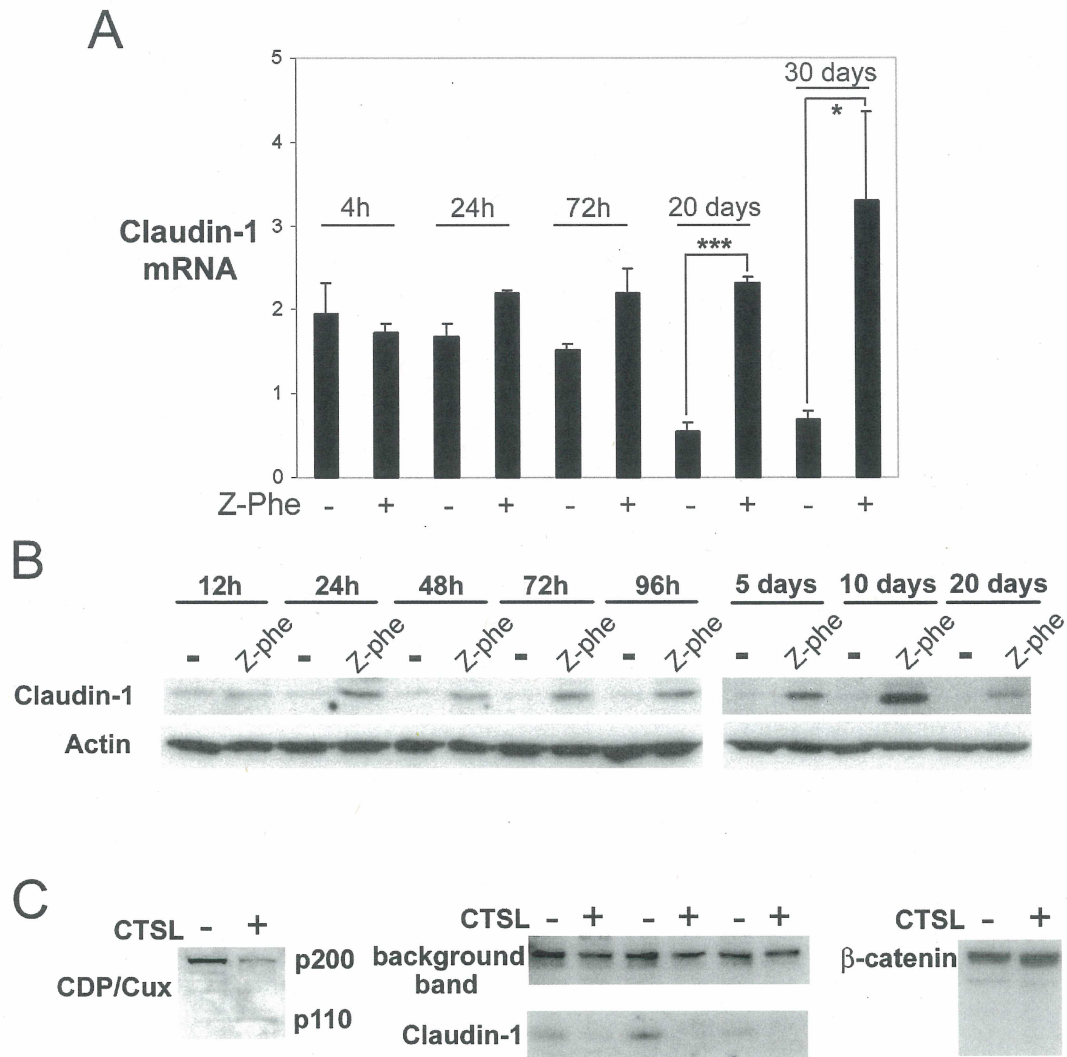


**Figure 2. IEC-6/Cdx2L1 cell polarization is impaired by the inhibition of cathepsin L intracellular activity.** *A*) Assays for cathepsin L activity were performed on total lysates from IEC-6/Cdx2L1 cells cultured with varying concentrations of cathepsin L inhibitors (Z-Phe or Inh 2). Results in triplicate are representative of 3 independent experiments. *B*) IEC6/Cdx2L1 cells were supplemented with or without 10  $\mu$ M Z-Phe for 10 or 20 days and incubated with [methyl-3H]-thymidine 18 h before CPM counting. Each point represents the mean of triplicate values. Results are expressed as percentage of thymidine incorporation obtained with IEC-6/Cdx2L1 cells cultured for 10 days. *C*) IEC-6/Cdx2L1 cells were cultured in medium containing 4 mM IPTG for 30 days. Typical multicellular structures (arrows) were observed as originally described (bar 50  $\mu$ M) (17). *D*) IEC-6/Cdx2L1 cells were cultured in medium containing 4 mM IPTG supplemented with 10  $\mu$ M Z-Phe for 30 days. Light microscope morphology showed disturbance of typical multicellular structures (see arrows; bar 50  $\mu$ m). *E*) Electron microscopic analysis confirmed the presence of proliferating multicellular structures (bracket) with polarized enterocytes on the surface of these cells (arrow) (bar 15  $\mu$ m). *F*) Electron microscopic analysis revealed the loss of polarization and the accumulation of several disorganized cellular layers (arrow) (bar 10  $\mu$ m).

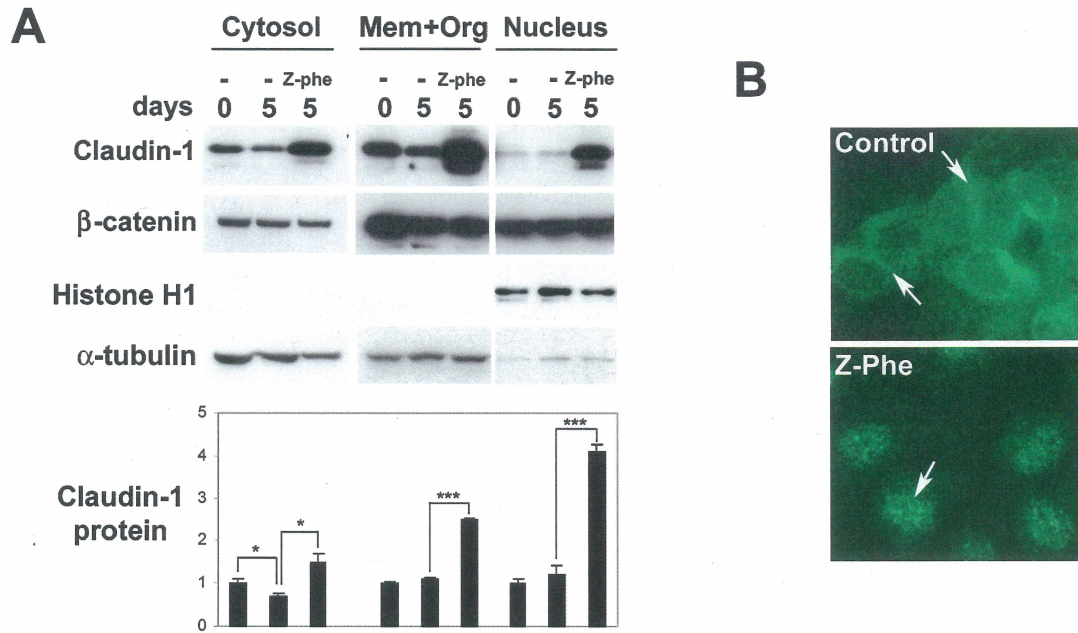


Addition of 10  $\mu$ M of Z-Phe-tyr-(tBu)-diazomethylketone (Z-Phe) led to a 95% reduction in cell cathepsin L activity (Fig. 2A). As expected, the cell nonpermeable Z-Phe-Tyr-CHO inhibitor (Inh 2) failed to significantly influence intracellular cathepsin L activity under the same concentration range (Fig. 2A). The proliferation rate of IEC-6/Cdx2L1 cells treated with 10  $\mu$ M Z-Phe was not significantly altered when compared with nontreated cells (Fig. 2B). IEC-6/Cdx2L1 cells were then supplemented with either Z-Phe or Inh 2 (10  $\mu$ M), followed by induction of cell differentiation. IEC-6/Cdx2L1 cells revealed the formation of typical multicellular proliferating structures with the initiation of epithelial polarization on the surface (Fig. 2C, E) (17). Electron microscopy analysis confirmed the initiation of enterocyte polarization on the surface of these multicellular structures (Fig. 2E). IEC-6/Cdx2L1 cells exposed to various concentrations of the nonpermeable Inh 2 showed similar structures (data not illustrated). In contrast, IEC-6/Cdx2L1 cells treated with Z-Phe exhibited a strong disorganization of the multicellular structures with an accumulation of dense cellular clusters (Fig. 2D). These clusters were composed of several anchored cells that had lost the characteristics associated with polarized enterocytes (Fig. 2F) and which consistently detached into the culture medium. Longterm inhibition of cathepsin L activity resulted in an increase of caspase-3 cleavage that was not associated with irreversible cell death, since detached cells were not stained by the Trypan blue exclusion test; when they were subcultured into new vessels in the absence of cathepsin L inhibitor, they readhered and continued to proliferate (data not illustrated). Since it was obvious that cellular polarization was impaired in cathepsin L inhibited cells (Fig. 2), the mRNA profile of several molecules known to maintain adherent and tight junction integrity was next investigated. RT-PCR analysis failed to detect any significant modification of ZO-1, occludin, and E-cadherin expression levels during inhibition of cathepsin L activity (data not illustrated). However, claudin-1 gene expression was identified to be affected at the transcript level when IEC-

6/Cdx2L1 cell cultures were supplemented with Z-Phe (Fig. 3A). Indeed, the relative level of claudin-1 mRNA expression was decreased over time in IEC-6/Cdx2L1 cultured cells whereas the addition of Z-Phe significantly prevented this reduction (Fig. 3A). Claudin-2, -3, and -4 mRNA expression was not affected under these conditions (data not illustrated). A Western blot analysis showed that claudin-1 protein was already up-regulated 24 h after pharmacological inhibition of intracellular cathepsin L and remained elevated during the entire treatment (Fig. 3B). Since the mechanism for upregulation of claudin-1 by the loss of cathepsin L activity appeared to be rapidly mediated at the protein stability, we hypothesized that claudin-1 protein could be a direct target of cathepsin L protease activity. *In vitro* synthesized proteins were incubated with active cathepsin L enzyme under defined conditions (36), followed by Western blot. CDP/Cux, used as a positive control, was rapidly cleaved by cathepsin L to produce the p110 isoform as previously reported (Fig. 3C) (30). Incubation of recombinant claudin-1 protein with cathepsin L led to a rapid degradation of the protein with no apparent residual cleaved forms of the protein (Fig. 3C). Recombinant  $\beta$ -catenin, a suspected regulator of claudin-1 transcription (6, 15), was not altered under these experimental conditions (Fig. 3C). Differential extraction of IEC-6/Cdx2L1 cellular proteins from the cytosol, membrane and organelles, nuclear and cytoskeletal compartments confirmed claudin-1 up-regulation after pharmacological inhibition of cathepsin L, the nuclear cellular compartment being the most affected (Fig. 4A). The level of  $\beta$ -catenin protein remained unchanged during the pharmacological treatment (Fig. 4A). An immunofluorescence experiment confirmed the induction of claudin-1 protein in the nucleus of IEC-6/Cdx2L1 cells incubated with Z-Phe (Fig. 4B).



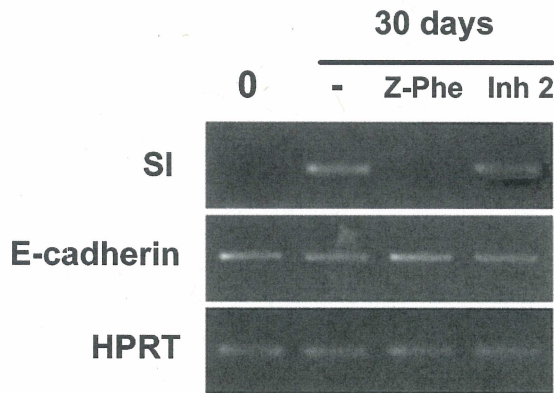
**Figure 3. Inhibition of cathepsin L promotes expression of claudin-1 in IEC-6/Cdx2L1 cells.** *A)* IEC-6/Cdx2L1 cells were cultured in medium with 4 mM IPTG supplemented or not with 10  $\mu$ M Z-Phe. Total RNA was isolated at different time points and claudin-1 mRNA expression was monitored by real-time PCR compared with the TBP gene product.  $*P \leq 0.05$ ;  $***P \leq 0.001$ . *B)* Total protein was isolated at different times after IEC-6/Cdx2L1 treatment, and claudin-1 protein levels were monitored compared with actin protein. *C)* Recombinant claudin-1 was degraded by cathepsin L *in vitro*. The recombinant Cux/CDP protein was used as a positive control for cathepsin L processing activity (30). Recombinant  $\beta$ -catenin was also used as a negative control. Western blots were hybridized with Cux/CDP, claudin-1, and  $\beta$  catenin antibodies. Representative results of 3 independent experiments.



**Figure 4. Inhibition of cathepsin L promotes nuclear localization of claudin-1 in IEC-6/Cdx2L1 cells.** *A*) Subcellular fractions of IEC-6/Cdx2L1 cells were harvested 0 and 5 days after addition of 4 mM IPTG supplemented or not with Z-Phe. Western blots were performed with claudin-1,  $\beta$ -catenin, histone H1, and  $\alpha$ -tubulin antibodies. Claudin-1 protein level in each fraction was calibrated with the corresponding loading control ( $n3$ ).  $*P \leq 0.05$ ;  $***P \leq 0.001$ . *B*) Immunofluorescences were performed on IEC-6/Cdx2L1 cells treated (Z-Phe) or not (control) with 10  $\mu$ M Z-Phe for 5 days. White arrows indicate the strongest signal for claudin-1.

The next step consisted of confirming whether specific genes associated with intestinal differentiation could also be influenced under the same conditions. The SI gene was chosen because it is specific to the enterocyte lineage and is expressed only in the differentiated compartment of the intestinal crypt-villus axis (40–42). Moreover, this gene was the only one previously reported to be detectable at the mRNA level in differentiated IEC-6/Cdx2L1 cells (17). IEC-6/Cdx2L1 cells were supplemented with either 10  $\mu$ M Z-Phe, 10 $\mu$ M Inh 2, or no inhibitor and induced to differentiate with the addition of IPTG. Total RNA was isolated after 30 days of culture, when SI becomes significantly detectable in this culture model (17),

and processed for RT-PCR analysis. Inhibition of intracellular cathepsin L activity with Z-Phe resulted in a reduction of SI mRNA expression compared with untreated differentiated cells (Fig. 5). Addition of the nonpermeable Inh 2 inhibitor did not affect expression of the SI gene over the course of IEC-6/Cdx2L1 differentiation (Fig. 5).



**Figure 5. Expression of an intestinal epithelial cell marker of differentiation is impaired by the inhibition of cathepsin L.** IEC-6/Cdx2L1 cells were supplemented with Z-Phe or Inh 2 for 30 days. Sucrase-isomaltase (SI) and E-cadherin mRNA expression was monitored. The HPRT gene product was used as a control for RNA integrity.

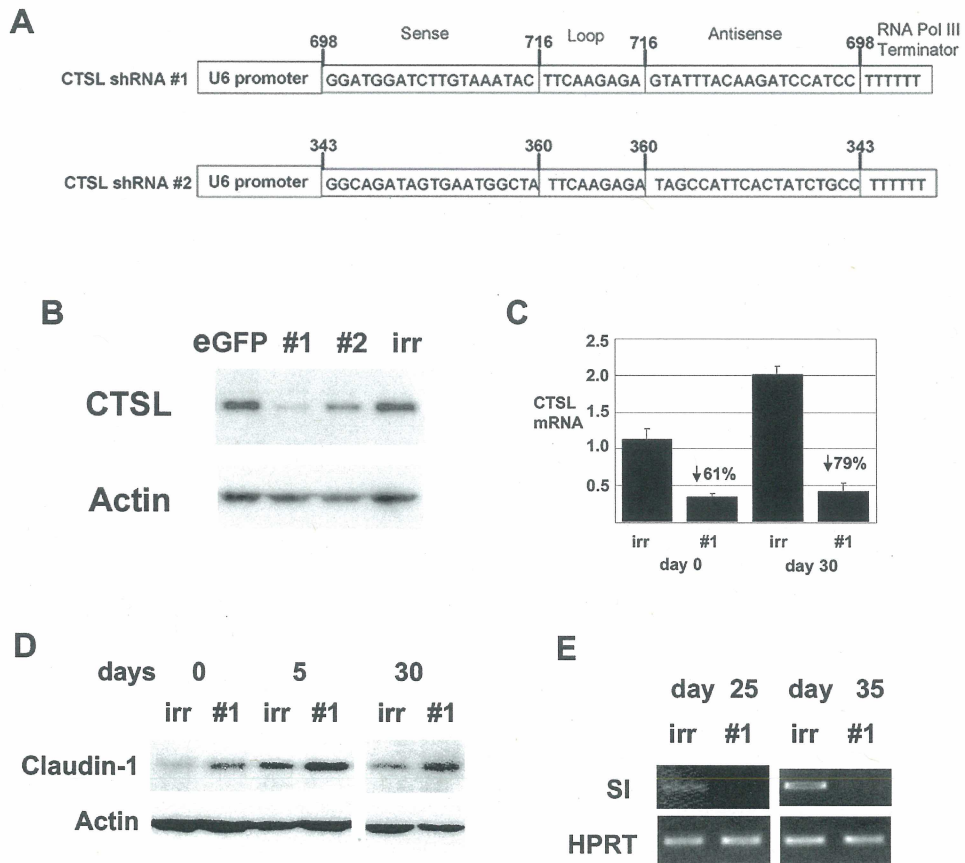
An experiment to directly neutralize cathepsin L activity was next designed by a knockdown approach. Lentivirus constructs containing shRNA sequences under the control of the U6 promoter and predicted to target rat cathepsin L mRNA were generated (Fig. 6A). Stable infection of a lentivirus-eGFP into IEC-6/ Cdx2L1 cells consistently resulted in 90% of positive eGFP cells. The efficiency of two different shRNA CTSL lentiviruses was subsequently evaluated for the downregulation of cathepsin L synthesis. Western blot analysis was performed, with total extracts obtained from stably infected IEC-6/Cdx2L1 populations. The cathepsin L protein level was decreased in IEC-6/Cdx2L1 infected with either of the CTSL shRNA lentiviruses compared with cells infected with an eGFP lentivirus or an irrelevant (irr) shRNA lentivirus (Fig. 6B). The CTSL shRNA lentivirus #1 was further used for its potent effect in cathepsin L knockdown (Fig. 6B). Stable IEC-6/Cdx2L1

populations were generated with either CTSL shRNA or irrelevant shRNA lentiviruses and induced to differentiate with the addition of IPTG. Total RNA was isolated and the level of cathepsin L mRNA expression evaluated by real-time RT-PCR. The expression of cathepsin L was reduced on average by 70% in CTSL shRNA populations compared with control populations (Fig. 6C). The efficiency in targeting cathepsin L mRNA expression was still present 30 days after induction of cellular differentiation (Fig. 6C). Cathepsin L intracellular activity was reduced by 50% in CTSL shRNA IEC-6/Cdx2L1 cells compared with controls as determined by an enzymatic assay. Total protein was then isolated at different days of culture and processed for Western blot analysis. A modest but reproducible up-modulation of the claudin-1 protein level was observed in the IEC-6/Cdx2L1 population (CTSL shRNA) that sustained 50% of residual intracellular cathepsin L activity (Fig. 6D). Total RNA was also isolated from both populations of cells and processed for RT-PCR analysis. Reduction in intracellular cathepsin L activity resulted in the decline of SI mRNA expression in CTSL shRNA populations compared with control cells (Fig. 6E). Overall, these observations confirm that fully sustained cathepsin L intracellular activity is essential to restrain claudin-1 expression as well as to sustain SI mRNA expression in differentiated enterocytes in culture.

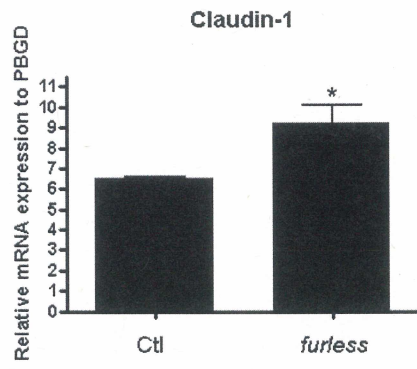
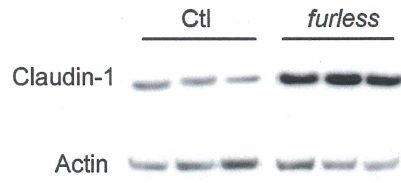
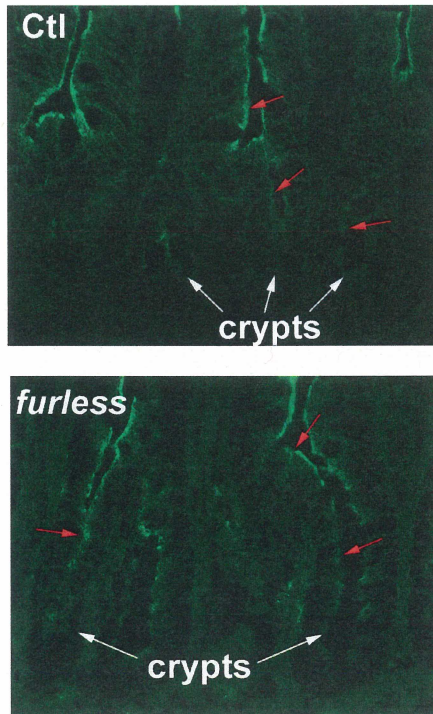
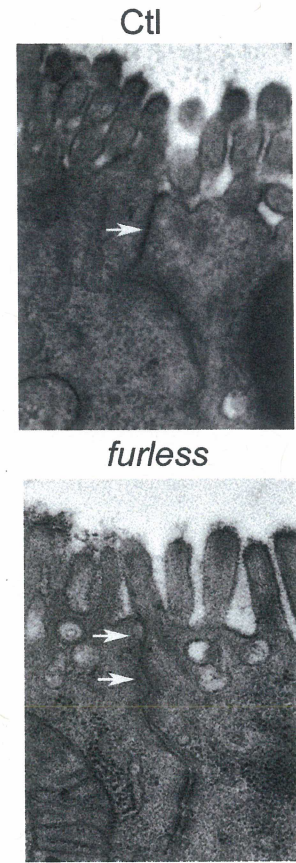
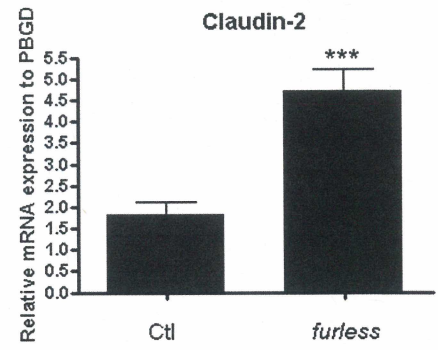
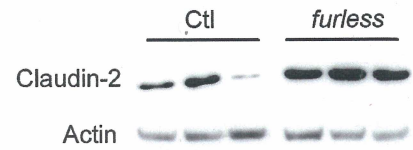
***Mice defective for cathepsin L enzymatic activity display enhanced claudin-1 expression and are prone to increased intestinal neoplasia***

The molecular interaction between cathepsin L activity and claudin-1 expression was next monitored in *furless* mice, which express catalytically inactive cathepsin L (28). Total RNA was isolated from the small intestine of control and mutant mice and processed for real-time PCR analysis. Claudin-1 mRNA expression was significantly more elevated in *furless* mice than in control littermate mice (Fig. 7A). Western blot analysis confirmed that the claudin-1 protein level was up-regulated in the small intestine of *furless* mice (Fig. 7B).





**Figure 6. Down-modulation of cathepsin L expression by RNA interference influences expression of claudin-1 and sucraseisomaltase.** *A*) CSTL shRNA sequences (#1 and #2) were designed to construct lentiviral-shRNA vectors. Numbers refer to the position within the rat cathepsin L cDNA. *B*) Western blot analysis was performed with CSTL and actin polyclonal antibodies on total cell lysates obtained from IPTG-induced (4 days) populations of infected cells with lentiviruses that contained eGFP, shRNA CSTL #1, shRNA CSTL #2 or an shRNA irrelevant sequence (irr). *C*) Real-time PCR was performed with total RNA isolated from uninduced (day 0) or IPTG induced (day 30) populations of cells that had stably integrated CSTL (#1) or irrelevant (irr) shRNA lentiviruses. Expression of cathepsin L was quantified relative to HPRT. *D*) Western blot analysis was performed with claudin-1 and actin polyclonal antibodies on total cell lysates obtained from IPTG-induced populations (day 0 to 30) of cells that had stably integrated CSTL (#1) or irrelevant (irr) shRNA lentiviruses. *E*) RT-PCR was performed with total RNA isolated from populations of cells that had stably integrated CSTL (#1) or irrelevant (irr) shRNA lentiviruses and induced to differentiate with 4 mM IPTG for 25 and 35 days. Sucrase-isomaltase (SI) mRNA expression was monitored compared with the HPRT gene product.

**A****B****C****D****E****F**

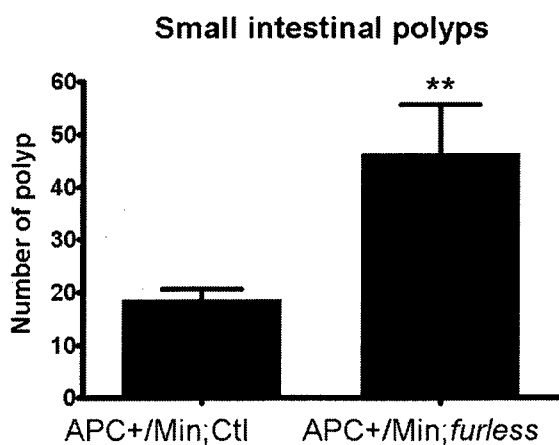


**Figure 7. *furless* mice display elevated levels of claudin-1.** *A)* A real-time PCR was performed with total RNA isolated from the small intestine of control littermates and *furless* adult mice. Claudin-1 expression was monitored compared with the PBGD gene product (*n*5). \**P* ≤ 0.05. *B)* Western blot analysis was performed using claudin-1 polyclonal antibodies on total lysates prepared from the small intestine of 3 control littermates and 3 *furless* mice. Actin polyclonal antibody was used to monitor protein integrity. *C)* Immunofluorescences on small intestinal sections from control and *furless* adult mice. White arrows indicate crypts and the red arrows display typical labeling in the tight junctions. Original magnification, 400X. *D)* Electron microscopic analysis of intestinal epithelial cells from the lower crypt in control and *furless* mice. Arrows indicate apical TJ. *E)* A real-time PCR was performed with total RNA isolated from the small intestine of control littermates and *furless* adult mice. Claudin-2 expression was monitored compared with the PBGD gene product (*n*5). \*\*\**P* ≤ 0.001. *F)* Western blot analysis was performed using claudin-2 polyclonal antibodies on total lysates prepared from the small intestine of the 3 control littermates and 3 *furless* mice.

The cell distribution of claudin-1 protein in the small intestine was comparable between control and mutant mice, a typical signal being detected mostly at the apical junctions of enterocytes, as reported before (Fig. 7C) (43). Ultrastructures of small intestinal lower crypt cells were then visualized by electron microscopy. Epithelial cells from control mice displayed typical TJ on the apical side of the cells whereas the TJ in *furless* mice systematically appeared less well defined, although it was technically difficult to quantitatively evaluate this difference (Fig. 7D). TJ of villus epithelial cells were comparable between control and *furless* mice (data not illustrated). A comparative analysis of epithelial cell proliferation as well as expression of differentiated epithelial markers failed to demonstrate any significant modification between *furless* and control animals (data not illustrated). Because claudin-2 was reported to bring leakiness properties into the tight junction structural organization (44–46), its expression was next monitored in *furless* mice.

Claudin-2 mRNA expression was significantly up-regulated in *furless* mice compared with control littermate mice (Fig. 7E), a tendency also observed at the protein level (Fig. 7F).

To further evaluate whether cathepsin L could interfere with intestinal tumorigenesis, we next crossed *Apc<sup>Min</sup>* mice with *furless* mice of the defined, inbred C57Bl6 background. The integrity of cathepsin L epithelial activity had an important effect on tumor load in the small intestine. While *Apc<sup>Min</sup>* control littermate mice had an average of 18.7 intestinal polyps (Fig. 8), *Apc<sup>Min</sup> furless* mice developed an average of 41 polyps per animal, a 2.2-fold increase over *Apc<sup>Min</sup>* control mice (Fig. 8). A similar tendency was observed in the colon, but the number of polyps in these mice was less important ( $0.6 \pm 0.13$  vs.  $1.8 \pm 0.37$ ;  $P \leq 0.01$ ). In addition, *furless* mice did not develop intestinal polyps even at 1 year of age. These results suggest that cathepsin L enzymatic activity and *Apc* act cooperatively to regulate tumor multiplicity in the intestinal epithelium.



**Figure 8. *furless* mice display an increased tumor multiplicity in *Apc<sup>Min</sup>*.** Macroscopic evaluation of the small intestine demonstrated increased tumor multiplicity in 90- to 100-day old *Min* mice with a homozygous mutation of *furless*. An average of 18.7 polyps were found in the small intestine of *Apc<sup>Min</sup>* control littermates mice compared with an average of 41 polyps in *Apc<sup>Min</sup> furless* mice ( $n10$ ).  $**P \leq 0.01$ .

## DISCUSSION

Cysteine proteases of the papain family have been studied extensively for their important contribution to the processing of lysosomal content as well as extracellular proteins (19). More recently, experiments conducted with mice deficient in either cathepsin L or D have exemplified their involvement in the control of cellular proliferation and differentiation (28, 29, 47, 48). Our study has identified cathepsin L as a component that is up-regulated in differentiated intestinal epithelial cells. Strategies used here to down-modulate cathepsin L activity have distinctly demonstrated the intracellular importance of this enzyme in enterocyte polarization and maturation *in vitro*. An important component of the tight junction, claudin-1, has been identified as a downstream target for cathepsin L activity both *in vitro* and *in vivo*. This has an impact on tumor multiplicity in *Apc<sup>Min</sup>* mice. These findings indicate for the first time that a proteolytic enzyme normally associated with lysosomal function is a crucial component of the molecular cascade that leads to normal enterocyte polarization as well as intestinal neoplasia.

The involvement of cathepsin L activity in intestinal epithelial cell polarization and differentiation represents an uncharacteristic finding for this protease. Cathepsin L has been proposed to positively influence tumor invasion and metastasis in different models (49–51). Cathepsin L plays a crucial role in the invasive activity of endothelial cells (48) as well as in proliferative disorders and tumor growth in pancreatic islet cell carcinogenesis (36). Extracellular secretion of the proenzyme has been extensively linked to progression of many different cancers (23) and correlative relationships have been proposed for cysteine protease activities and their role in colorectal cancer progression (25, 26, 52). However, these studies did not address the specific subcellular targeting of cathepsin L action during cancer progression. Our analysis is the first to clearly demonstrate that intracellular cathepsin L

expression is induced with differentiation of intestinal epithelial cells. Intracellular enzymatic inhibition of cathepsin L led to claudin-1 misexpression and lack of cellular polarization, whereas specific inhibition of the secreted extracellular preproenzyme with a nonpermeable inhibitor did not influence differentiation of cultured intestinal epithelial cells. Other systems have suggested a role for cathepsin L in keratinocyte and spermatogenic normal cell maintenance (28, 29). Indeed, *furless* mice present an alteration in hair follicle morphogenesis caused by hyperproliferation of hair follicle epithelial cells (28) as well as defects in spermatocyte differentiation (29). As a simplistic explanation, we propose that modulation and cellular distribution of this protease represent an important variable for its biological role in the function of cell origin, initiation of disorder, and progression through carcinoma and metastasis. For example, cathepsin L was undetectable in normal cells of the pancreatic islet but became progressively induced as pancreatic endocrine neoplasms became more aggressive (36). This contrasts with our observation of enhanced expression in normal differentiated intestinal epithelial cells. Future functional experiments *in vivo* could determine the molecular relevance of increased intracellular vs. extracellular cathepsin L synthesis in the context of initiation and progression of intestinal cancer.

The spontaneous mouse mutant model *furless*, which exhibits inactivated cathepsin L proteinase activity (28) failed to demonstrate defects in intestinal epithelial proliferation-to-differentiation homeostasis (data not illustrated). Although inactivation of cathepsin L enzymatic activity may not be crucial in order to maintain the intestinal epithelium in this particular model, it remains plausible that these mice develop compensatory mechanisms during early development to overcome deficiency in cathepsin L activity. Lung tissue extracts of cathepsin L-deficient mice express increased amounts of cathepsin D (53). Mice deficient for cathepsin D display abnormalities in intestinal mucosal cell turnover (47). Strategies to investigate a putative crosstalk between these different proteases as well as

other molecular determinants known to be involved in the establishment and maintenance of the intestinal epithelium represent a future challenge.

The increase in cathepsin L protein level was much more evident in the accumulation of the enzymatically intracellular active mature form than the unprocessed form during intestinal differentiation. Two nonexclusive possibilities could explain this specific pattern in normal intestinal epithelial cells. 1) Cathepsin L synthesis could be augmented *via* the classic endoplasmic reticulum route and lead to extracellular secretion of the procathepsin L form and preferential accumulation of the mature protein form within specialized intracellular vesicles. This is supported by the observation that secreted procathepsin L is up-regulated during IEC-6/Cdx2L1 differentiation. 2) A mechanism favoring the use of a downstream AUG site, thus escaping the signal peptide sequence of the traditional enzyme, could be activated. Indeed, fibroblasts can synthesize a cathepsin L isoform downstream of the traditional AUG site (30). This leads to a protease devoid of a signal peptide with the same molecular weight as the catalytically active form capable of translocating to the nucleus and proteolytically processing the CDP/Cux transcription factor (30). This second possibility is supported by strong induction of the mature form within the cells as well as the presence of a catalytically active isoform of cathepsin L observed here in the nucleus of intestinal epithelial cells. Although there was no evidence of CDP/Cux processing in intestinal epithelial cells with nuclear cathepsin L (data not illustrated), other uncharacterized nuclear targets of this protease in the context of differentiated epithelial cells remain to be identified.

How could the loss of cathepsin L activity promote initiation of intestinal tumorigenesis? As mentioned before, increases in secreted cathepsin L enzymatic activity have been well documented to be associated with tumor progression and metastasis. However, no clues were provided in this particular context for the specific roles of intracellular cathepsin L. Our study has identified claudin-1 as being rapidly induced in the

absence of cathepsin L intracellular activity. *In vitro* experiments that tested whether recombinant claudin-1 was a direct target substrate for cathepsin L supported the notion that this enzyme might prevent claudin-1 protein accumulation. However, it is still unclear whether this protease can directly target claudin-1 under any specific subcellular region *in vivo*. The induction of claudin-1 is well documented in cancer, a process that has been correlated with decreased TJ integrity (54). Overexpression of claudin-1 in human colorectal cell lines resulted in epithelial-mesenchymal transition with increased growth of xenografted tumors, a process that was reversed when siRNA specific for claudin-1 was used (6). Another study showed that inhibition of claudin-1 expression with siRNA largely suppressed the invasion properties of oral squamous carcinoma cells (55). Claudin-1 knockout mice confirmed an important role in maintaining barrier integrity in the epidermis, as mice die within 1 day of birth with defects in the epidermal barrier (56). One could argue that increases in claudin-1 should improve tight junction formation, polarization, and maturation. Crypt epithelial cells of *furless* mice appeared less well defined than control mice, an observation that is probably linked to the induction of claudin-2 expression (44–46). Changes in claudin-1 localization, particularly within the cytosol and nucleus, are currently proposed to account for the effect of claudin-1 on cellular transformation; however, the molecular nature of this mechanism remains unknown (6, 54). Inhibition of cathepsin L enzymatic activity resulted in an induction of nuclear claudin-1 in IEC-6/Cdx2L1 cells, an effect not seen in *furless* mice. This indicates that nuclear translocation of claudin-1 is not solely dependent on cathepsin L but other pathways must be required. IEC-6 cells are immortalized and could have acquired signaling pathways essential for claudin-1 nuclear translocation. Claudin-1 transcriptional regulation has been suggested to depend on the  $\beta$ -catenin/Tcf/Lef signaling pathway (6, 15). A transient transfection assay for measuring transcriptional activation due to activated  $\beta$ -catenin signaling failed to demonstrate a direct interference of

cathepsin L with this signaling pathway. In addition, the level of nuclear  $\beta$ -catenin was not affected in IEC-6/Cdx2L1 cells deficient in cathepsin L activity or in *furless* mice. This finding is consistent since *furless* mice do not present defects in intestinal epithelial proliferation nor develop spontaneous adenomas. *Apc<sup>Min</sup>* mice already display nuclear claudin-1 expression (6). We thus suggest that the increase in claudin-1 expression by the *furless* mice and the potential for claudin-1 to nuclear translocate in *Apc<sup>Min</sup>* mice (6) act synergistically to initiate intestinal tumorigenesis.

In conclusion, our findings support an unsuspected role for intracellular cathepsin L in maintaining the normal intestinal epithelium. Future identification of cathepsin L-specific substrates during intestinal epithelial cell differentiation will allow a better understanding of how this protease protects intestinal epithelium integrity, an essential feature to limiting the progression of intestine-related diseases.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CIHR. F.B. and N.P. are scholars from the “Fonds de la Recherche en Santé du Québec,” N.R. is the recipient of a Canadian Research Chair in Signaling and Digestive Physiopathology, and J.F.B is the recipient of a Canadian Research Chair in Intestinal Physiopathology. The authors wish to thank Denis Martel for assistance in electron microscopy procedures, Anne Vézina for assistance with the cell fractionation procedure, and Dr. Dominic Jean for construction of the U6-lentivirus vector. The authors also thank Pierre Pothier and Elizabeth Herring for critical reading of the manuscript.



## REFERENCES

1. Menard, D., Beaulieu, J. F., Boudreau, F., Perreault, N., Rivard, N., and Vachon, P. H. (2006) Gastrointestinal tract. In *Cell Signaling and Growth Factors in Development: from Molecules to Organogenesis* (Unsicker, K., and Kriegstein, K., eds) pp. 755–790, Wiley-VCH
2. Madara, J. L. (1998) Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 143–159
3. Van Itallie, C. M., and Anderson, J. M. (2006) Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 403–429
4. Holmes, J. L., Van Itallie, C. M., Rasmussen, J. E., and Anderson, J. M. (2006) Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Exp. Patterns* **6**, 581–588
5. de Oliveira, S. S., de Oliveira, I. M., De Souza, W., and Morgado-Diaz, J. A. (2005) Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Lett.* **579**, 6179–6185
6. Dhawan, P., Singh, A. B., Deane, N. G., No, Y., Shiou, S. R., Schmidt, C., Neff, J., Washington, M. K., and Beauchamp, R. D. (2005) Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J. Clin. Invest.* **115**, 1765–1776
7. Pinto, D., and Clevers, H. (2005) Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp. Cell Res.* **306**, 357–363
8. Eastman, Q., and Grosschedl, R. (1999) Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 233–240
9. van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., *et al.* (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* **111**, 241–250
10. Batlle, E., Henderson, J. T., Beghtel, H., van den Born, M. M., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de Wetering, M., Pawson, T., and Clevers, H. (2002) Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* **111**, 251–263
11. Sansom, O. J., Reed, K. R., Hayes, A. J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I. P., Batlle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I. S., Clarke, A. R., and Winton, D. J.

- (2004) Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev.* **18**, 1385–1390
12. Moon, R. T., Bowerman, B., Boutros, M., and Perrimon, N. (2002) The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* **296**, 1644–1646
13. Clevers, H. (2004) Wnt breakers in colon cancer. *Cancer Cell* **5**, 5–6
14. Clevers, H., and Batlle, E. (2006) EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. *Cancer Res.* **66**, 2–5
15. Miwa, N., Furuse, M., Tsukita, S., Niikawa, N., Nakamura, Y., and Furukawa, Y. (2001) Involvement of claudin-1 in the betacatenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol. Res.* **12**, 469–476
16. Suh, E., Wang, Z., Swain, G. P., Tenniswood, M., and Traber, P. G. (2001) Clusterin gene transcription is activated by caudal-related homeobox genes in intestinal epithelium. *Am. J. Physiol.* **280**, G149–G156
17. Suh, E., and Traber, P. G. (1996) An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol. Cell Biol.* **16**, 619–625
18. Chapman, H. A., Riese, R. J., and Shi, G. P. (1997) Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 63–88
19. Turk, B., Turk, D., and Turk, V. (2000) Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 98–111
20. Kominami, E., Tsukahara, T., Hara, K., and Katunuma, N. (1988) Biosynthesis and processing of lysosomal cysteine proteinases in rat macrophages. *FEBS Lett.* **231**, 225–228
21. Gottesman, M. M. (1978) Transformation-dependent secretion of a low molecular weight protein by murine fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 2767–2771
22. Collette, J., Bockock, J. P., Ahn, K., Chapman, R. L., Godbold, G., Yeyeodu, S., and Erickson, A. H. (2004) Biosynthesis and alternate targeting of the lysosomal cysteine protease cathepsin L. *Int. Rev. Cytol.* **241**, 1–51
23. Chauhan, S. S., Goldstein, L. J., and Gottesman, M. M. (1991) Expression of cathepsin L in human tumors. *Cancer Res.* **51**, 1478–1481
24. Sheahan, K., Shuja, S., and Murnane, M. J. (1989) Cysteine protease activities and tumor development in human colorectal carcinoma. *Cancer Res.* **49**, 3809–3814
25. Maciewicz, R. A., Wardale, R. J., Etherington, D. J., and Paraskeva, C. (1989) Immunodetection of cathepsins B and L present in and secreted from human pre-malignant and malignant colorectal tumour cell lines. *Int. J. Cancer* **43**, 478–486

26. Troy, A. M., Sheahan, K., Mulcahy, H. E., Duffy, M. J., Hyland, J. M., and O'Donoghue, D. P. (2004) Expression of cathepsin B and L antigen and activity is associated with early colorectal cancer progression. *Eur. J. Cancer* **40**, 1610–1616
27. McGrath, M. E. (1999) The lysosomal cysteine proteases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 181–204
28. Roth, W., Deussing, J., Botchkarev, V. A., Pauly-Evers, M., Saftig, P., Hafner, A., Schmidt, P., Schmahl, W., Scherer, J., Anton-Lamprecht, I., *et al.* (2000) Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J.* **14**, 2075–2086
29. Wright, W. W., Smith, L., Kerr, C., and Charron, M. (2003) Mice that express enzymatically inactive cathepsin L exhibit abnormal spermatogenesis. *Biol. Reprod.* **68**, 680–687
30. Goulet, B., Baruch, A., Moon, N. S., Poirier, M., Sansregret, L. L., Erickson, A., Bogyo, M., and Nepveu, A. (2004) A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol. Cell* **14**, 207–219
31. Boucher, M. J., Jean, D., Vezina, A., and Rivard, N. (2004) Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **286**, G736–G746
32. Dietrich, W. F., Lander, E. S., Smith, J. S., Moser, A. R., Gould, K. A., Luongo, C., Borenstein, N., and Dove, W. (1993) Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. *Cell* **75**, 631–639
33. Hnatyszyn, H. J., Podack, E. R., Young, A. K., Seivright, R., Spruill, G., and Kraus, G. (2001) The use of real-time PCR and fluorogenic probes for rapid and accurate genotyping of newborn mice. *Mol. Cell. Probes* **15**, 169–175
34. Perreault, N., Sackett, S. D., Katz, J. P., Furth, E. E., and Kaestner, K. H. (2005) Foxl1 is a mesenchymal Modifier of Min in carcinogenesis of stomach and colon. *Genes Dev.* **19**, 311–315
35. Menard, D., and Pothier, P. (1987) Differential distribution of digestive enzymes in isolated epithelial cells from developing human fetal small intestine and colon. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **6**, 509–516

36. Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanahan, D., and Joyce, J. A. (2006) Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev.* **20**, 543–556
37. Boudreau, F., Rings, E. H., van Wering, H. M., Kim, R. K., Swain, G. P., Krasinski, S. D., Moffett, J., Grand, R. J., Suh, E. R., and Traber, P. G. (2002) Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucraseisomaltase gene. *J. Biol. Chem.* **277**, 31909–31917
38. Perreault, N., Katz, J. P., Sackett, S. D., and Kaestner, K. H. (2001) Foxl1 controls the Wnt/beta-catenin pathway by modulating the expression of proteoglycans in the gut. *J. Biol. Chem.* **276**, 43328–43333
39. De Stefanis, D., Demoz, M., Dragonetti, A., Hourri, J. J., Ogier-Denis, E., Codogno, P., Baccino, F. M., and Isidoro, C. (1997) Differentiation-induced changes in the content, secretion, and subcellular distribution of lysosomal cathepsins in the human colon cancer HT-29 cell line. *Cell Tissue Res.* **289**, 109–117
40. Markowitz, A. J., Wu, G. D., Birkenmeier, E. H., and Traber, P. G. (1993) The human sucrase-isomaltase gene directs complex patterns of gene expression in transgenic mice. *Am. J. Physiol.* **265**, G526–G539
41. Traber, P. G. (1990) Regulation of sucrase-isomaltase gene expression along the crypt-villus axis of rat small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 765–773
42. Traber, P. G., Yu, L., Wu, G. D., and Judge, T. A. (1992) Sucrase-isomaltase gene expression along crypt-villus axis of human small intestine is regulated at level of mRNA abundance. *Am. J. Physiol.* **262**, G123–G130
43. Sakaguchi, T., Gu, X., Golden, H. M., Suh, E., Rhoads, D. B., and Reinecker, H. C. (2002) Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha. *J. Biol. Chem.* **277**, 21361–21370
44. Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A. H., Schoneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J. D., and Fromm, M. (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.* **115**, 4969–4976
45. Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., and Tsukita, S. (2001) Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J. Cell Biol.* **153**, 263–272

46. Lipschutz, J. H., Li, S., Arisco, A., and Balkovetz, D. F. (2005) Extracellular signal-regulated kinases 1/2 control claudin-2 expression in Madin-Darby canine kidney strain I and II cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 3780–3788
47. Saftig, P., Hetman, M., Schmahl, W., Weber, K., Heine, L., Mossmann, H., Koster, A., Hess, B., Evers, M., and von Figura, K. (1995) Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO J.* **14**, 3599–3608
48. Urbich, C., Heeschen, C., Aicher, A., Sasaki, K., Bruhl, T., Farhadi, M. R., Vajkoczy, P., Hofmann, W. K., Peters, C., Pennacchio, L. A., *et al.* (2005) Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nat. Med.* **11**, 206–213
49. Joyce, J. A., Baruch, A., Chehade, K., Meyer-Morse, N., Giraudo, E., Tsai, F. Y., Greenbaum, D. C., Hager, J. H., Bogyo, M., and Hanahan, D. (2004) Cathepsin cysteine proteases are effectors tumorigenesis. *Cancer Cell* **5**, 443–453
50. Berchem, G., Glondu, M., Gleizes, M., Brouillet, J. P., Vignon, F., Garcia, M., and Liaudet-Coopman, E. (2002) Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene* **21**, 5951–5955
51. Krueger, S., Kellner, U., Buehling, F., and Roessner, A. (2001) Cathepsin L antisense oligonucleotides in a human osteosarcoma cell line: effects on the invasive phenotype. *Cancer Gene Ther.* **8**, 522–528
52. Herszenyi, L., Plebani, M., Carraro, P., De Paoli, M., Roveroni, G., Cardin, R., Tulassay, Z., Naccarato, R., and Farinati, F. (1999) The role of cysteine and serine proteases in colorectal carcinoma. *Cancer* **86**, 1135–1142
53. Wille, A., Gerber, A., Heimburg, A., Reisenauer, A., Peters, C., Saftig, P., Reinheckel, T., Welte, T., and Buhling, F. (2004) Cathepsin L is involved in cathepsin D processing and regulation of apoptosis in A549 human lung epithelial cells. *Biol. Chem.* **385**, 665–670
54. Leotlela, P. D., Wade, M. S., Duray, P. H., Rhode, M. J., Brown, H. F., Rosenthal, D. T., Dissanayake, S. K., Earley, R., Indig, F. E., Nickoloff, B. J., *et al.* (2006) Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene* **26**, 3846–3856
55. Oku, N., Sasabe, E., Ueta, E., Yamamoto, T., and Osaki, T. (2006) Tight junction protein claudin-1 enhances the invasive activity of oral squamous cell carcinoma cells by promoting cleavage of laminin-5 gamma2 chain *via* matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane-type MMP-1. *Cancer Res.* **66**, 5251–5257

56. Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., and Tsukita, S. (2002) Claudin based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* **156**, 1099–1111

## **2.2. Manuscrit 2**

**Carine R. Lussier**, Jean-Philippe Babeu, Benoît A. Auclair, Nathalie Perreault et François Boudreau. Hepatocyte nuclear factor-4alpha promotes differentiation of intestinal epithelial cells in a coculture system. 2008. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 294(2):G418-28. Epub 2007 Nov 21.

### **AVANT-PROPOS**

Mes connaissances entourant le modèle cellulaire IEC6-Cdx2/L1 et l'implication du compartiment mésenchymateux au cours de la différenciation cellulaire m'ont donné l'idée de développer le système de co-culture présenté dans cet article. J'ai modifié des méthodes publiées, afin de mettre au point les milieux de cultures et la méthode d'isolation des cellules mésenchymateuses. J'ai effectué les analyses des résultats de micropuce à ADN. J'ai préparé la majorité des constructions utilisées, sauf pour le vecteur d'expression de HNF-4 $\alpha$  qui a été fait par Jean-Philippe Babeu, étudiant à la maîtrise dans notre laboratoire. J'ai réalisé presque la totalité des expériences présentées dans le manuscrit, sauf pour certaines analyses par RT-PCR quantitatif qui ont été réalisées par Benoît Auclair, assistant de recherche chez la Pre. Nathalie Perreault. J'ai rassemblé mes idées et connaissances, les notions et opinions acquises lors de discussions externes (conférences, examen pré-doctoral,...) et, bien sûr, les connaissances de mon directeur de recherche, pour mener à bien les expérimentations pertinentes à l'avancement du projet. Pour le manuscrit, j'ai préparé les figures 1 à 8, écrit la section « material and methods » et j'ai préparé une ébauche des autres sections. J'ai également effectué les expérimentations demandées par les évaluateurs.

## RÉSUMÉ

Jusqu'à maintenant, aucun modèle de cellules normales n'a permis de récapituler de façon efficace le processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales *in vitro*. L'objectif de cette étude était d'établir et de caractériser génétiquement un modèle de co-culture épithélio-mésenchymateuse afin d'identifier des régulateurs transcriptionnels impliqués dans la différenciation épithéliale intestinale. L'ensemencement de cellules épithéliales intestinales de rat sur une monocouche de cellules mésenchymateuses humaines a rapidement mené à la formation d'agglomérats composés de cellules épithéliales polarisées présentant une bordure en brosse et des complexes jonctionnels. Une analyse par micropuce à ADN, effectuée à différents moments au cours de ce processus, a permis d'identifier une induction de l'expression de « Hepatocyte-nuclear-factor-4alpha » (HNF-4 $\alpha$ ) et de « Hepatocyte-nuclear-factor-1alpha » (HNF-1 $\alpha$ ) en parallèle avec l'apparition des structures épithéliales polarisées. L'introduction stable de HNF-4 $\alpha$  dans des cellules épithéliales intestinales indifférenciées a mené à une induction rapide de HNF-1 $\alpha$ , ainsi que de plusieurs gènes spécifiques à l'intestin et reliés au métabolisme, dont les ARNm avaient été identifiés dans l'analyse par micropuce à ADN. HNF-4 $\alpha$  a également été capable de transactiver le promoteur du gène encodant pour la calbindin 3, un processus augmenté de façon synergique en présence de HNF-1 $\alpha$ . Lorsque les cellules exprimant HNF-4 $\alpha$  ont été ensemencées sur les cellules mésenchymateuses, des structures en dômes, caractéristique d'un transport vectoriel des ions, se sont formées rapidement. L'expression forcée de HNF1- $\alpha$  seul n'a pas résulté en la formation de dômes. En résumé, ce nouveau système de co-culture a permis d'identifier pour la première fois de façon fonctionnelle HNF-4 $\alpha$  comme un important modulateur de la différenciation épithéliale intestinale et offre une nouvelle opportunité pour l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus.



**HEPATOCTYTE-NUCLEAR-FACTOR-4ALPHA PROMOTES DIFFERENTIATION  
OF INTESTINAL EPITHELIAL CELLS IN A CO-CULTURE SYSTEM**

**Carine R. Lussier, Jean-Philippe Babeu, Benoît A. Auclair, Nathalie Perreault, and  
François Boudreau**

CIHR Team on Digestive Epithelium, Département d'Anatomie et Biologie Cellulaire,  
Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC,  
Canada, J1H 5N4

## ABSTRACT

Normal cellular models able to efficiently recapitulate intestinal epithelial cell differentiation in culture are not yet available. The aim of this work was to establish and genetically characterize a mesenchymal-epithelial co-culture system in order to identify transcriptional regulators involved in this process. The deposition of rat intestinal epithelial cells on human intestinal mesenchymal cells led to the formation of clustered structures that expanded shortly after seeding. These structures were composed of polarized epithelial cells with brush borders and cell junction complexes. A rat genechip statistical analysis performed at different time points during this process identified Hepatocyte-nuclear-factor-4alpha (HNF-4 $\alpha$ ) and Hepatocyte-nuclear-factor-1alpha (HNF-1 $\alpha$ ) as being induced coincidentally with the apparition of polarized epithelial structures. Stable introduction of HNF-4 $\alpha$  in undifferentiated epithelial cells alone led to the rapid induction of HNF-1 $\alpha$  and several intestinal specific markers and metabolism-related genes for which mRNA was identified to be up-regulated during epithelial differentiation. HNF-4 $\alpha$  was capable to transactivate the calbindin 3 gene promoter, a process that was synergistically increased in the presence of HNF-1 $\alpha$ . When HNF-4 $\alpha$  expressing cells were plated on mesenchymal cells, an epithelial monolayer formed rapidly with the apparition of dome structures that are characteristics of vectorial ion transport. Forced expression of HNF-1 $\alpha$  alone did not result in dome structures formation. In summary, this novel co-culture system functionally identified for the first time HNF-4 $\alpha$  as an important modulator of intestinal epithelial differentiation and offers an innovative opportunity to investigate molecular mechanisms involved in this process.

## KEY WORDS

intestinal epithelial cells, mesenchymal cells, HNF-4 $\alpha$ , HNF-1 $\alpha$ , differentiation

## INTRODUCTION

The intestinal epithelium is organized in crypts mostly populated by proliferative cells as well as villi composed of differentiated cells (for a review, see Sancho et al (47)). Stem cells constantly produce precursor cells that migrate along the crypt-to-villus axis. These progenitor cells progressively undergo a succession of molecular changes that lead to an arrest of proliferation and a commitment into specific differentiation programs completed as the cells reach the crypt-villus junction (40). Two different lineages will result from this commitment: the columnar absorptive enterocytes (comprising 90 % of all small intestinal epithelial cells) and the secretory cell lineages that include goblet, enteroendocrine and Paneth cells.

Intestinal homeostasis is dependent on a cross-talk between epithelial and underlying mesenchymal cells (18, 33). Several signaling pathways that involve mesenchymal secreted molecules orchestrate this cellular communication (10). One example is the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway that controls proliferation as well as migration of enterocytes and Paneth cells (16). Moreover, extra-cellular matrix deposition between the epithelial and mesenchymal compartments influences specific cell signaling in a position-dependent manner along the crypt-to-villus axis (2, 51).

Interactions between intestinal epithelial cells and their environment affect intrinsic gene expression (41, 47). To date, numerous endodermal transcription factors were identified to participate in intestinal epithelial gene regulation (59). Cdx2, an intestinal epithelial specific transcription factor, regulates transcriptional activity of several intestinal epithelial specific genes (for a review, see Guo et al (17)). Other transcriptional regulators such as GATA-4 or Hepatocyte-nuclear-factor-1 alpha (HNF-1 $\alpha$ ) cooperate with Cdx2 and regulate transcription of sucrase-isomaltase (SI) (6), lactase-phlorizin hydrolase (31, 56), calbindin 3

(60), liver fatty acid binding protein gene (52) and claudin 2 (13, 46). Restriction of apolipoprotein A-IV (ApoA-IV) expression to villus differentiated enterocytes has been functionally linked to Hepatocyte-nuclear-factor-4alpha (HNF-4 $\alpha$ ) (49). Computer-based analyses recently suggested that HNF-4 $\alpha$  could act as a regulator of villus genes involved in lipid metabolism (53). However, no functional data have clearly demonstrated the role of HNF-4 $\alpha$  in small intestinal epithelial functions.

Immortalized intestinal epithelial cell (IEC) lines derived from the ileum have been established from weaned rats (43). Morphological and immunological characterization classified these cells as undifferentiated small intestinal crypt cells (42, 43). The first demonstration that these cell lines could differentiate came from xenografts experiment that involved combination of IEC-17 with fetal rat gut mesoderm (24). This experimental approach confirmed that IEC-17 could generate a mature epithelium composed of the four major intestinal epithelial cell lineages (24). The potential of these cells to differentiate in culture was provided when IEC-6 cells were engineered to conditionally express Cdx2 (54). The induction of Cdx2 resulted in irregular cellular proliferation with the accumulation of multicellular layers covered with few differentiated cells (54). Since the natural contact between epithelium and mesenchyme supplies IEC with extracellular matrix and soluble molecules (33, 34), we hypothesized that intestinal epithelial crypt cells needed to interact with mesenchymal cells to efficiently reproduce villus epithelial differentiation in culture.

Here, we present evidence that immortalized IEC seeded on fetal intestinal mesenchymal cells can rapidly polarize and differentiate in culture. These cells display the morphological characteristics of an epithelium and support the expression of multiple intestinal functional markers. A genechip analysis identified HNF-4 $\alpha$  and HNF-1 $\alpha$  as being strongly induced during IEC differentiation. Forced expression of HNF-4 $\alpha$  in undifferentiated IEC induced the expression of several intestinal specific markers and

metabolism-related genes identified to be up-regulated during IEC differentiation in co-culture, a consequence that was not observed with forced expression of HNF-1 $\alpha$ . This places HNF-4 $\alpha$  as a strong candidate to support IEC differentiation.

## MATERIALS AND METHODS

### *Establishment of mesenchymal primary culture*

Human intestine from fetuses ranging from 17 to 20 weeks of age (post-fertilization) were obtained after legal abortion. The project was in accordance with a protocol approved by the Institutional Human Research Review Committee for the use of human material. The small intestine was divided in three equal parts and the most distal one was considered as the ileum where 5 to 8 cm fragments were used for mesenchymal cell isolation. Smooth muscle layers were pulled out with forceps and the intestinal tube was opened and cut into 0.5 cm<sup>2</sup> pieces. Ileum fragments were then incubated for 2 h at room temperature in an EDTA solution (3 mM EDTA, 0.05 mM DTT, in PBS) to separate the epithelium from the mesenchymal compartment (62). After isolation, mesenchymal pieces were incubated 4 h at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 0.2 U per ml of collagenase H (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Cells were recovered by a short centrifugation and seeded in 100 mm Petri dishes. Cells were maintained under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in DMEM supplemented with 4.5 g/liter D-glucose, 25 mM HEPES and 10% foetal bovine serum. Mesenchymal primary cultures were used between passages 3 and 8.

### *Cell co-culture*

The IEC-6 cell line was obtained from ATCC (CRL-1592). The IEC-6/L1 cell line was a gift from Dr. P.G. Traber. The IEC-6/L1-HNF-4 $\alpha$  cell line was generated by retroviral infection of a rat HNF-4 $\alpha$ /Babepuro construct. The IEC-6/L1-HNF-1 $\alpha$  cell line was generated by lentiviral infection of a rat HNF-1 $\alpha$ /pLenti6/V5 construct. These cell lines were maintained in DMEM supplemented with 4.5 g/liter D-glucose, 25 mM HEPES, 5% foetal bovine serum and 0.1 U of insulin per ml as originally described (43, 54). Cells were

maintained under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and subcultured for five to 10 passages preventing each time the reach of confluence. Human primary mesenchymal cells were seeded in their complete growth medium (DMEM 10%) in an appropriate number to result in 50 % of confluence. After 24 h, fresh medium supplemented with 50 µg/ml ascorbic acid (co-culture medium) was added and cells were grown for 14 days with fresh co-culture medium replaced every two days. IEC-6, IEC-6/L1, IEC-6/L1-HNF-4 $\alpha$  and IEC-6/L1-HNF-1 $\alpha$  cells were recovered in co-culture medium and seeded on mesenchymal cell monolayer at a density of 1 X 10<sup>5</sup> cells per cm<sup>2</sup>. Co-cultures were grown for a maximum of twelve days with the co-culture medium being replaced every two days.

### ***RNAi targeting***

shRNA oligonucleotides were designed using the siRNA sequences GCTGCAGATCGATGATAATGA and TTCAAGAGA as the loop sequence as described previously (5). The oligonucleotide-annealed product was subcloned into the plenti6-U6 between BamHI and XhoI sites, giving rise to pLenti6-shHNF-4 $\alpha$ . An irrelevant (control) pLenti-sheGFP negative control was used in parallel (5). Lentiviruses were produced and used for cell infection accordingly to Invitrogen recommendations (ViraPower Lentiviral Expression System, instructions manual).

### ***Electron microscopy***

Cell cultures were prepared exactly as reported before (5). Thin sections were prepared using an ultramicrotome, contrasted with lead citrate and uranyl acetate, and observed on a Jeol 100 CX transmission electron microscope. All reagents were purchased from Electron Microscopy Sciences (Cedarlane, Hornby, Ontario).

### ***RNA isolation and RT-PCR analysis***

Total RNA was isolated from cultured cells and subjected to a DNase treatment according to the manufacturer's instructions (Totally RNA kit, Ambion, Tx). Reverse transcriptions were carried out at 42°C for 1 h in the presence of 2 µg RNA, 40 mU of polyoligo(dT)<sub>12-18</sub> and 40 U of Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics, Qc). Semi-quantitative PCR was performed in a total volume of 20 µl in the presence of 1 µl of RT reaction, 0.6 U of Taq DNA polymerase (New England Biolabs, MA), 0.2 mM dNTPs and 30 ng of each specific primer. Primer sequences are available upon request. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was performed using a LightCycler apparatus (Roche Diagnostics, Qc). Experiments were run and analyzed with the LightCycler software 4.0 according to manufacturer's recommendations (Roche Diagnostics, Qc). Synthesis of double stranded DNA during the PCR cycles was monitored using SYBR Green I (QuantiTect SYBR Green PCR Kit; Qiagen) and PCR programs designed as detailed in the QuantiTect SYBR Green PCR Handbook (Qiagen). Target expression was quantified relatively to porphobilinogen deaminase (PBGD) or Tata-Binding-Protein (TBP) expression. For this purpose, a standard calibration curve was prepared for each gene using serial dilutions of the calibrator sample (day 1 or day 8 co-cultured cells) and crossing point values were plotted versus the log of the relative concentration of each dilution. This standard curve was used to correct for differences in PCR efficiencies.

### ***Microarray Screening and Data Analysis***

Probes for the microarray analysis were generated from isolated RNA obtained at days 1, 3, 5 and 8 of co-cultures from three independent experiments. Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Rat Genome 230 2.0 arrays were screened with the twelve generated probes via the microarray platform of McGill University and Génome Québec Innovation Center



(<http://genomequebec.mcgill.ca>) exactly as described previously (35). To test for statistically significant changes in signal intensity ( $P$  values of  $\leq 0.05$ ), compiled data (RMA analysis) were screened using the software available on the microarray platform website. Genes were then filtered for up- or down-regulation of expression of a minimum of 2.5-fold and a minimum magnitude change of 200 fluorescence units between day 1 and 8. Graphical representations as well as gene ontology analyses were performed with the use of the GeneSifter® software (VizX, WA, USA).

### ***Western Blot Analysis***

Cell total extracts preparation and Western blotting were performed exactly as described previously (5). The following antibodies from Zymed Laboratories (Invitrogen, CA) were used: occludin affinity-purified rabbit polyclonal antibody (#71-1500) and claudin-4 affinity-purified rabbit polyclonal antibody (#38-4800). The following antibodies from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) were used: HNF-1 $\alpha$  affinity-purified goat polyclonal antibody (#SC-6547), HNF-4 $\alpha$  affinity-purified goat polyclonal antibody (#SC-6556), GATA-4 affinity-purified goat polyclonal antibody (#SC-1237) and actin affinity-purified goat polyclonal antibody (#SC-1615). A rabbit polyclonal antibody raised against CDX2/3 was kindly provided by Dr. Rivard (CDX2/3-NR) (8).

### ***Indirect immunofluorescence***

Cells were co-cultured in lab-tek chamber slides (Nalge Nunc International, NY) for 10 days, fixed in 2% paraformaldehyde for 30 min at 4°C, permeabilized in 0.1% Triton X-100 in PBS and blocked for 20 min in 2 % bovine serum albumin in PBS. Primary antibody was diluted in the blocking solution and incubated with the cells for 2 h at room temperature. The following antibodies were used: occludin mouse monoclonal antibody (#33-1500, Zymed

Laboratories),  $\beta$ -catenin affinity-purified rabbit polyclonal antibody (#9587, Cell Signaling Technology). Claudin-4 antibody was the same as described above. For F-actin staining, fixed cells were incubated with 1  $\mu$ g/ml phalloidin-fluorescein isothiocyanate conjugated in replacement of the primary antibody. Slides were then washed in PBS and incubated 1 h at room temperature with the appropriate secondary antibody (Vector Laboratories) diluted in the blocking buffer.

### ***Transient transfections and luciferase assays***

The rat calbindin 3 promoter was amplified by PCR from purified genomic DNA isolated from IEC-6 cells. The primers used for the amplification included positions -1004 and +43 relatively to the transcriptional initiation site. The PCR product was subcloned into the pGL3basic luciferase reporter vector (Promega, Madison, WI, USA). Integrity of the subcloned PCR product was confirmed by sequence analysis. HEK293T cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Cells at 50% confluence were incubated with 0.2  $\mu$ g of luciferase reporter, 0.025 ng of HNF-4 $\alpha$  and/or HNF-1 $\alpha$  expression vector, 0.6 ng of the pRL SV40 Renilla luciferase vector (Promega, Madison, WI, USA) and a constant total DNA amount of 0.8  $\mu$ g per transfected well in the presence of 2  $\mu$ l of Lipofectamine 2000/600  $\mu$ l of DMEM containing 10% fetal bovine serum. The medium was replaced by fresh DMEM after an incubation of 4 h. The luciferase and *Renilla* activities were determined 48 h after the transfection using the dual luciferase assay kit (Promega Biotech, Madison, WI). Each experiment was repeated four times in triplicate.

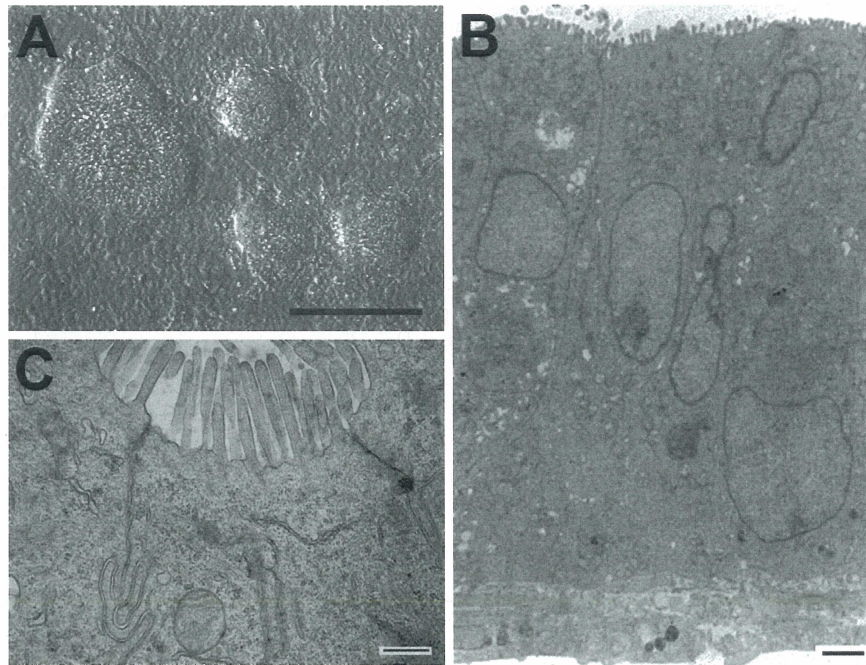
## RESULTS

### *Co-culture of IEC-6/L1 with intestinal mesenchymal cells results in morphological differentiation.*

IEC-6/L1 cells are derivative of IEC-6 cells modified to express Cdx2 (54). These cells proliferate in multicellular layers and differentiate poorly *in vitro*. In order to stimulate IEC-6/L1 cells to efficiently differentiate into a monolayer that mimics the normal intestinal epithelium, a co-culture system was engineered. IEC-6/L1 cells were cultured on top of a monolayer of primary mesenchymal cells derived from human foetal ileum. The heterologous nature of this system was chosen to further distinguish the specific molecular changes that could occur in IEC cells versus the mesenchymal counterpart. Primary mesenchymal cells were grown in the co-culture medium for 14 days prior the deposition of IEC-6/L1. Co-cultures were maintained for 12 days.

A scattered formation of clustered structures was observed among the IEC-6/L1 cell population five days after these cells were seeded on the human mesenchymal primary culture (Fig. 1A), a phenomenon that was not observed when IEC-6/L1 was cultured directly on plastic (54) or on commercial matrices including Matrigel, Laminin, Collagen IV or Fibronectin (data not illustrated). Electron microscopy of co-cultured cells revealed that IEC clusters consisted of polarized epithelial cells organized in a monolayer (Fig. 1B). These cells presented cell to cell junctions in addition to a well-established brush border on their apical side (Fig. 1C). The parental IEC-6 cell line (43), negative for Cdx2 expression (54), remained flat and undifferentiated when it was co-cultured under the exact same experimental conditions (data not illustrated). In addition, the prevention of physical contact between IEC6/L1 and mesenchymal cells with the use of Transwell® permeable supports was inefficient to promote formation of differentiated clusters. These observations indicated that

expression of Cdx2 in IEC as well as direct mesenchymal contact was decisive to allow IEC to rapidly polarize in a monolayer and to differentiate under these conditions.



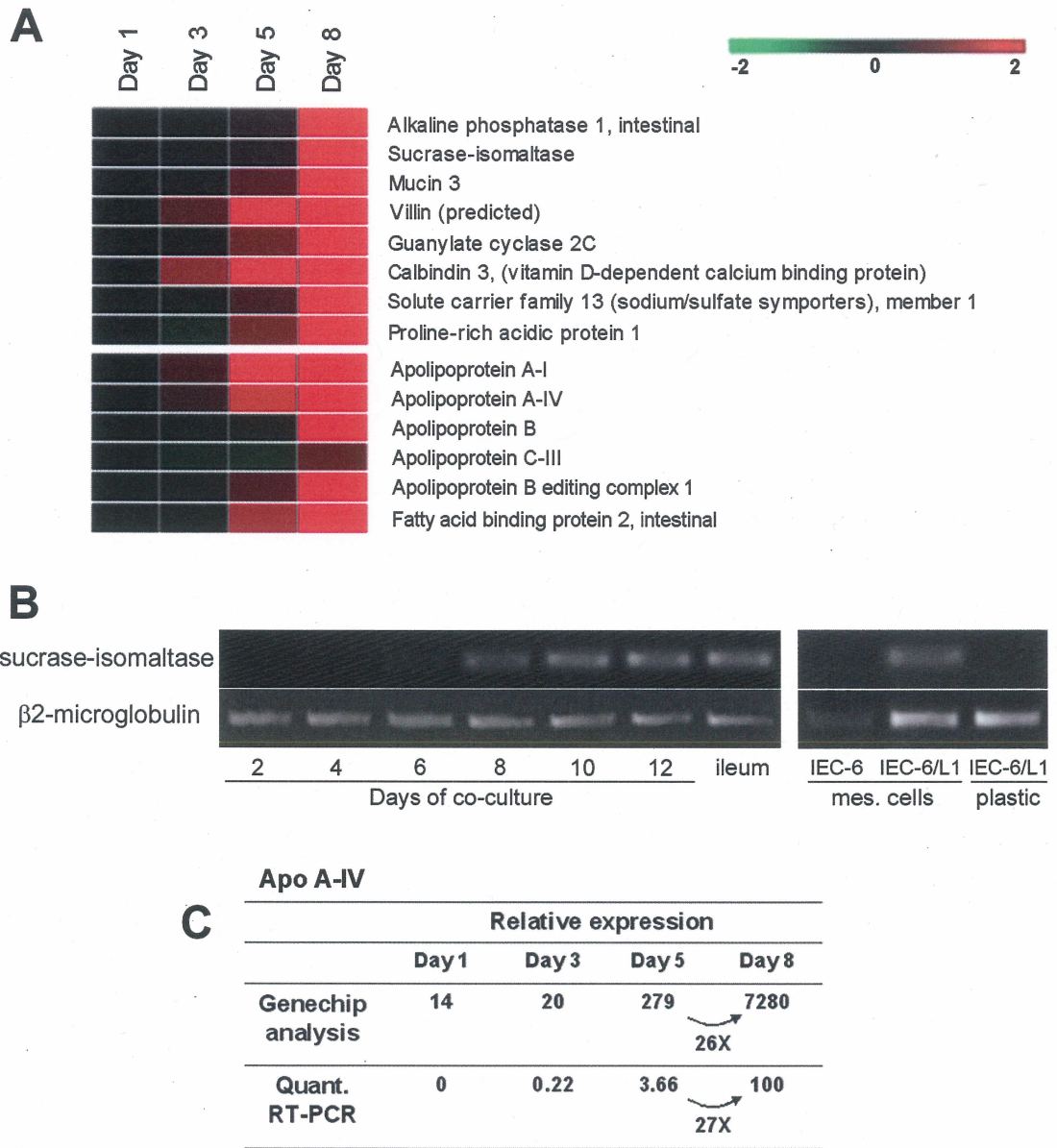
**Fig. 1. Morphological features of IEC-6/L1 co-cultured with human foetal mesenchymal cells from the ileum. A.** Light morphology of IEC-6/L1 monolayer at co-culture day 8. Bar = 100 $\mu$ m. **B. and C.** Electron microscopic analysis of IEC-6/L1 co-cultured for 10 days with mesenchymal cells. Bar = 2 $\mu$ m (D). Bar = 500 nm (E).

***A Gene profiling analysis confirmed the functional differentiation of IEC in co-culture***

To better characterize the nature of the molecular changes occurring during differentiation of IEC-6/L1 in the co-culture system, a gene expression profiling was next performed. In order to provide a stringent characterization of the changes occurring during the rapid differentiation of IEC/L1 cells, the analysis was performed in triplicate with RNA isolated at day 1, 3, 5 and 8 after the seeding of IEC-6/L1 on mesenchymal cells. The GeneChip<sup>®</sup> Rat Genome 230 2.0 Arrays (Affymetrix) that contains more than 30,000 transcripts from the rat genome was utilized to screen for mRNA expression variations that

occurred specifically in the rat IEC-6/L1 cell line. Statistical analysis predicted more than 10,000 rat transcripts being significantly modulated between day 1 and 8 of the co-culture ( $p$  value  $\leq 0.05$ ). When more stringent conditions were applied (differential ratio  $\geq 2.5$  and relative expression difference  $\geq 200$ ), the number of transcripts reached 1,220 (supplementary tables 1 and 2). A gene ontology analysis for biological processes among these modified genes revealed an important representation for cellular processes related to macromolecule metabolism, response to stress, lipid metabolism, nucleic acid metabolism, immune response and cell adhesion. The expression pattern of well-known intestinal epithelial cell differentiation markers was assembled (Fig. 2A). In general, these genes were not expressed in IEC-6/L1 cell line at day 1, but were induced with the apparition and multiplication of polarized cells between day 3 and 8 (Fig. 2A). The expression of several intestinal apolipoproteins and molecules implicated in lipid uptake and transport was markedly induced between day 3 and 8 (Fig. 2A).

To further validate some targets identified in the genechip analysis, expression of SI and ApoA-IV was monitored by RT-PCR. As expected, expression of SI was undetectable in the co-culture system from days 1 to 6 but became assessable at day 8 with increasing expression throughout day 12 (Fig. 2B). In parallel, SI mRNA expression was undetectable in IEC-6/L1 cultured on plastic or IEC-6 co-cultured on mesenchymal cells (Fig. 2B). ApoA-IV mRNA expression was undetectable at day 1 and 3, became expressed at day 5 and was up-regulated between days 5 and 8 as quantified by qRT-PCR (Fig. 2C). ApoA-IV modulation of expression was quantitatively equivalent to the genechip profiling data obtained during IEC differentiation (Fig. 2C).



**Fig. 2. Intestinal epithelial functional gene markers are expressed in co-cultured IEC-6/L1.** **A.** Expression profiles of IEC differentiation markers and molecules implicated in lipid uptake and transport. **B.** Semi-quantitative RT-PCR analysis of SI expression was performed in IEC-6/L1 cells harvested at different time point after seeding on mesenchymal cells (left panel) as well as in IEC-6/L1 or IEC-6 cultured in the co-culture medium on plastic or on mesenchymal cells for 12 days (right panel). Total RNA from rat ileum was used as a positive control and  $\beta$ 2-microglobulin mRNA level was monitored as a housekeeping gene control. **C.** Comparison of Apolipoprotein A-IV relative mRNA expression monitored by GeneChip and qRT-PCR analysis.

A similar pattern was observed for ApoA-I, ApoB ApoC-III and Apobec, validating the data in Fig. 2A (data not illustrated). These results confirmed that IEC-6/L1 cells can be rapidly induced to express multiple markers of functional differentiated enterocytes when co-cultured with mesenchymal cells.

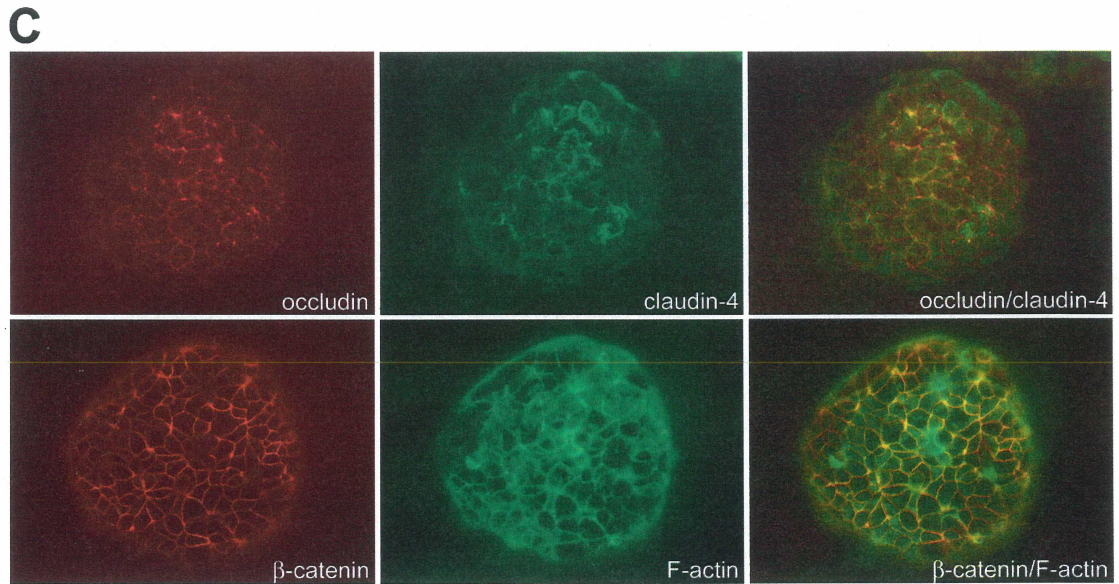
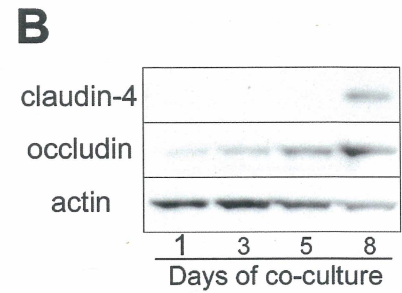
***Polarized IEC developed well-defined cell junction complexes in co-culture.***

Physiological functions of the mature intestinal epithelium are largely dependent on the establishment and maintenance of functional cell junction complexes (30, 32). Cell junction complexes components were detectable in co-cultured IEC cells with several of them showing an up-regulated expression during the time course (Fig. 3A). Indeed, occludin mRNA and protein levels were up-regulated during the course of the co-culture (Fig. 3A and B). Claudin-4 mRNA expression began to be detectable between day 5 and 8 (Fig. 3A), a pattern that was confirmed at the protein level (Fig. 3B). To further determine whether IEC developed well-defined cell to cell junctions in the co-culture conditions, localization of cell junction proteins was next investigated by immunofluorescence. The tight junction proteins occludin and claudin-4 as well as adherens junction molecule  $\beta$ -catenin were localized at the apical membrane of polarized cells (Fig. 3C). The cytoskeleton component F-actin was also co-localized at the apical membrane with  $\beta$ -catenin (Fig. 3C). These results supported that co-cultured IEC can develop well-established cell junction complexes linked to the cellular cytoskeleton.



**A** **Microarray analysis**

	Relative expression (normalized ratio)			
	Day 1	Day 3	Day 5	Day 8
occludin	920	1700	2474	5817
ZO-1	1914	1990	2083	2141
ZO-2	5439	6956	4890	5344
ZO-3	11	29	248	747
claudin-3	57	45	31	178
claudin-4	40	63	75	612
E-cadherin	220	299	322	375



**Fig. 3. Polarized co-cultured IEC-6/L1 express well localized cell junction complex molecules.** **A.** Expression profiles of cell junction complex molecules at specific time points of the co-culture. **B.** Western analysis performed on co-cultured total cell lysates with specific antibodies for the detection of occludin and claudin-4 protein expression. Specific detection of actin was done to control for protein loading. **C.** IEC-6/L1 cells were co-cultured with mesenchymal cells for 10 days. Immunolocalization of occludin, claudin-4 and  $\beta$ -catenin was performed using specific antibodies. Phalloidin-FITC conjugated was used for the specific detection of F-actin. Original magnification 200X.

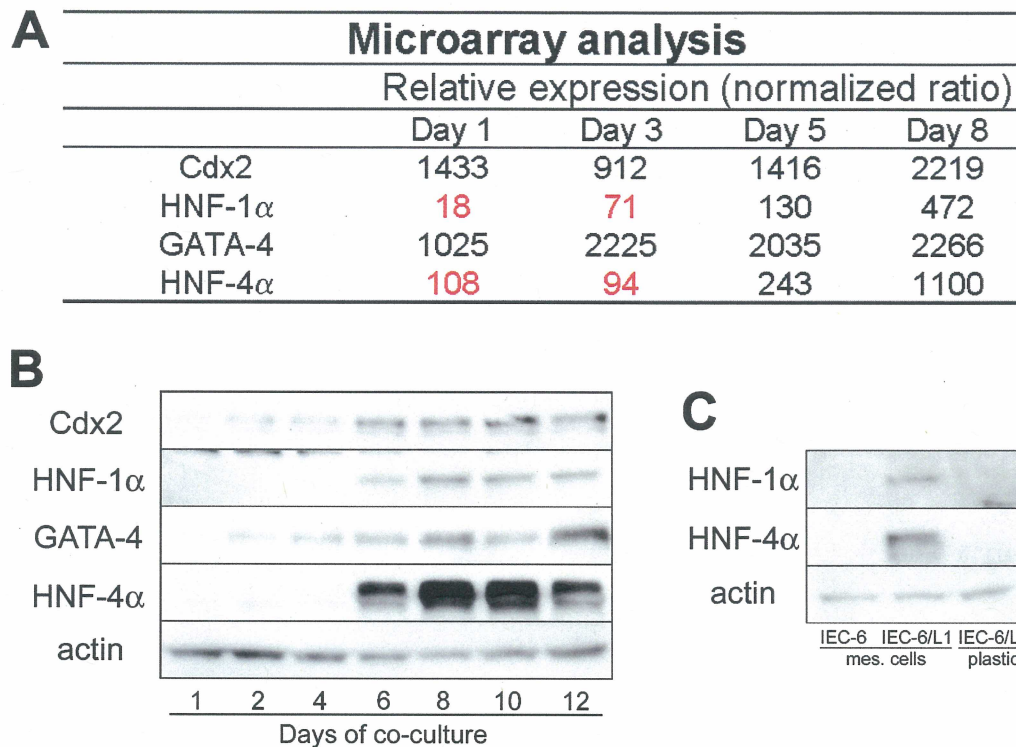


***Specific transcription factors of endoderm-origin are sequentially modulated in the co-culture system.***

A number of regulators crucial to sustain the transcriptional activity of intestinal specific gene promoters have been identified (6, 7, 11, 49, 58). Characterization of the expression profile of some of these transcriptional modulators during the progression of the co-cultures was next undertaken. Data from the gene profiling analysis indicated a statistical increase in Cdx2, GATA-4, HNF-1 $\alpha$  and HNF-4 $\alpha$  mRNA expression when day 8 was compared to day 1 (Fig. 4A). Total protein extracts were then sequentially isolated from several co-culture kinetics and Western analyses performed. The protein expression profile of these factors correlated well with the variations in mRNA expression during the co-culture kinetics. Cdx2 and GATA-4 expression was progressively increased during the kinetics (Fig. 4B). A prominent induction of both HNF-1 $\alpha$  and HNF-4 $\alpha$  was observed around day 6, a time when polarized IEC structures had just appeared (Fig. 4B). HNF-1 $\alpha$  and HNF-4 $\alpha$  protein was not detected in IEC-6/L1 cultured on plastic or in IEC-6 co-cultured on primary mesenchymal cells (Fig. 4C). This indicated that both Cdx2 and mesenchymal cells were essential for the induction of these regulators within these conditions.

***HNF-1 $\alpha$  is a downstream target of HNF-4 $\alpha$  in IEC and cooperates with HNF-4 $\alpha$  in transcriptional modulation of intestinal specific genes.***

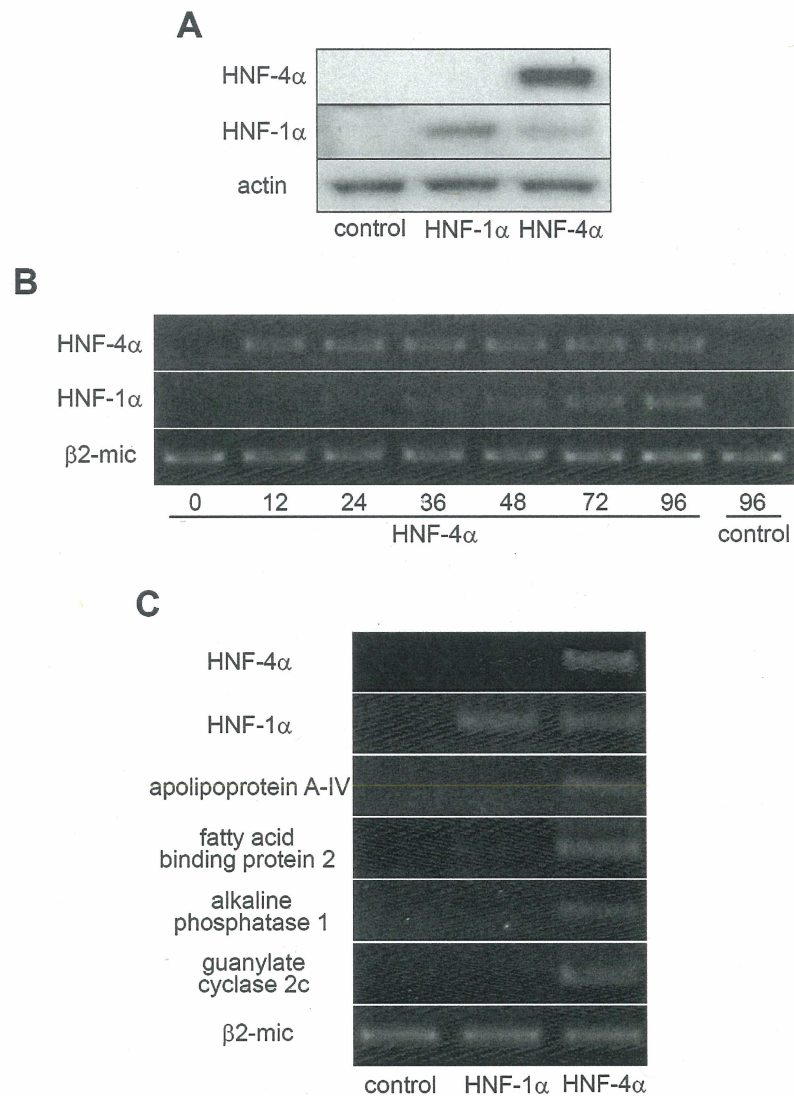
HNF-1 $\alpha$  was shown to participate in the transcriptional regulation of several intestinal specific genes (6, 11, 31, 46, 57, 60). HNF-4 $\alpha$  was recently suggested to act as a regulator of villus specific epithelial genes (53). However, the specific functional role of these regulators on IEC differentiation has never been directly assessed.



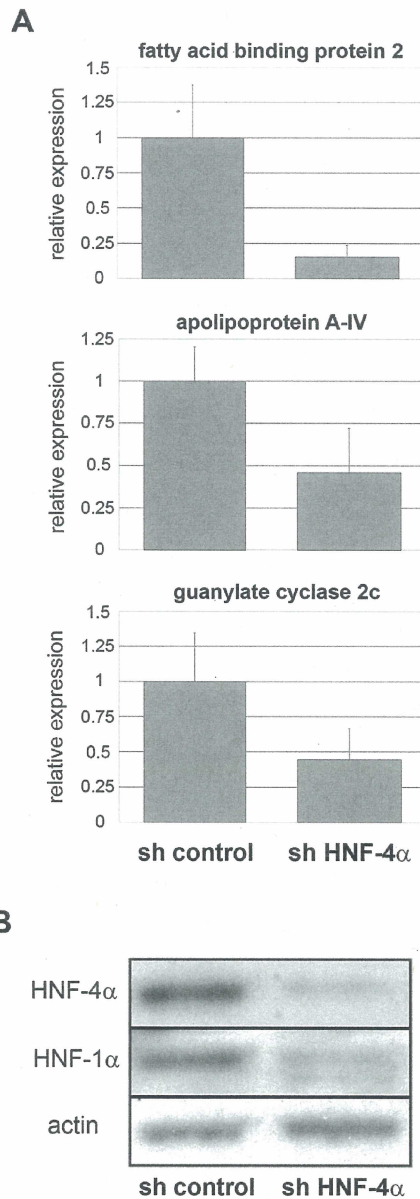
**Fig. 4. Expression of transcription factors involved in the regulation of IEC differentiation-related genes.** **A.** Expression profiles of Cdx2, HNF-1 $\alpha$ , GATA-4 and HNF-4 $\alpha$  at different time point of the co-culture. **B.** Western analysis performed on co-cultured total cell lysates with specific antibodies for the detection of each transcription factors. **C.** Western analysis performed on total cell lysates from IEC-6 and IEC-6/L1 cultured on plastic or on mesenchymal cells. Cells were harvested at day 6 after IEC seeding. Specific detection of actin was used as loading control (B, C).

We thus undertook to verify whether reintroduction of HNF-4 $\alpha$  or HNF-1 $\alpha$  was potent to induce expression of intestinal epithelial genes normally associated with IEC differentiation state. IEC-6/L1 cell populations that had stably integrated HNF-4 $\alpha$  (IEC-6/L1-HNF-4 $\alpha$ ), HNF-1 $\alpha$  (IEC-6/L1-HNF-1 $\alpha$ ) or an empty vector (control) were generated and maintained for several passages in culture. Control cells did not express HNF-4 $\alpha$  or HNF-1 $\alpha$  when cultured on plastic (Fig. 5A), accordingly with the observation made with the parental IEC-6/L1 cell line (Fig. 4C). Interestingly, HNF-1 $\alpha$  protein was detectable among multiple IEC-

6/L1-HNF-4 $\alpha$  established cell populations as represented in Fig. 5A. On the contrary, HNF-1 $\alpha$  overexpression did not impact on endogenous HNF-4 $\alpha$  expression (Fig. 5A). A kinetics of time confirmed that HNF-1 $\alpha$  gene transcript was detectable shortly after the retroviral introduction of HNF-4 $\alpha$  in IEC as determined by RT-PCR analysis (Fig. 5B). This suggested that HNF-4 $\alpha$  could directly activate HNF-1 $\alpha$  gene transcription as reported in hepatocytes (26, 36). The expression of several genes linked to differentiation and metabolism and identified to be up-regulated during the co-culture kinetics (Fig. 2 and Table 1) was next monitored at the gene transcript levels in these populations of cells. HNF-4 $\alpha$  led to the induction of expression of several intestinal epithelial genes whereas HNF-1 $\alpha$  alone did not impact on these genes (Fig. 5C). An experiment to down-modulate HNF-4 $\alpha$  was next designed by a knockdown approach. A lentivirus construct that contained a shRNA sequence under the control of an U6 promoter and predicted to target the rat HNF-4 $\alpha$  mRNA was generated and stably introduced into various IEC-6/L1-HNF-4 $\alpha$  stable cell populations. Total RNA was isolated from these cell populations and the level of induced intestinal epithelial genes transcripts (Fig. 5C) was evaluated by real-time RT-PCR. The expression of these genes transcripts was systematically reduced (50 to 80% in average) in HNF-4 $\alpha$  shRNA populations when compared to infected controls (Fig. 6A). A Western blot confirmed that both HNF-4 $\alpha$  and HNF-1 $\alpha$  protein level was decreased in IEC-6/L1-HNF-4 $\alpha$  cells infected with either of the HNF-4 $\alpha$  shRNA lentivirus as compared to cells infected with control shRNA lentivirus (Fig. 6B). These observations suggested that the continuous presence of HNF-4 $\alpha$  and/or HNF-1 $\alpha$  was crucial to maintain expression of differentiation-related genes.



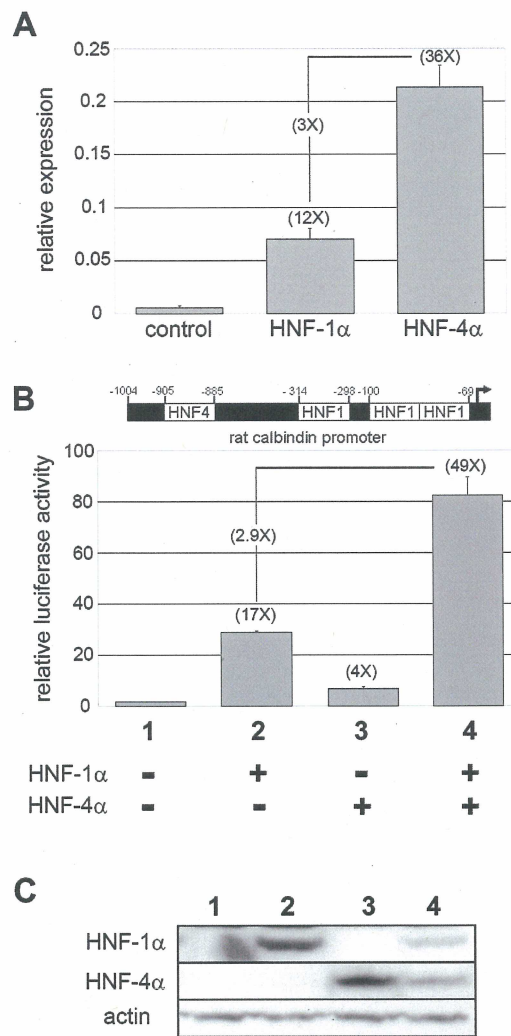
**Fig. 5. HNF-4α induces expression of HNF-1α and intestinal functional gene markers in IEC-6/L1 cultured on plastic.** IEC-6/L1 cells were infected with empty vector (control), HNF-1α or HNF-4α expression vectors. After selection, stable IEC-6/L1 cell populations were harvested. **A.** A western analysis was performed on total cell lysates with specific antibodies for the detection of HNF-4α and HNF-1α. Specific detection of actin was done to control for protein integrity. **B.** IEC-6/L1 cells were infected with empty or HNF-4α expression vector and total RNA were harvested at different hours following the infection. Semi-quantitative RT-PCR detection of HNF-4α and HNF-1α was performed in parallel to β2-microglobulin. **C.** Semi-quantitative RT-PCR detection of mRNA for several intestinal functional gene markers. β2-microglobulin mRNA level was monitored as a housekeeping gene control.



**Fig. 6. Down-modulation of HNF-4 $\alpha$  with RNAi reduces expression of intestinal functional markers in IEC-6/L1-HNF-4 $\alpha$  cultured on plastic.** **A.** Real-time PCR was performed with total RNA isolated from IEC-6/L1-HNF-4 $\alpha$  populations of cells that had stably integrated HNF-4 $\alpha$  or irrelevant (control) shRNA lentiviruses. The expression of fatty acid binding protein 2, apolipoprotein A-IV and guanylate cyclase 2c was quantified relative to TBP (mean  $\pm$  SD, n=3). **B.** Western blot analysis was performed with HNF-4 $\alpha$ , HNF-1 $\alpha$  and actin polyclonal antibodies on total cell lysates obtained from populations of cells that had stably integrated HNF-4 $\alpha$  or irrelevant (control) shRNA lentiviruses.

HNF-1 $\alpha$  was reported to be crucial for the regulation of calbindin 3 gene transcription both *in vitro* and *in vivo* (60). Since this gene transcript was predicted to be up-regulated in differentiating IEC-6/L1 co-cultured cells (Fig. 2A), its expression was next monitored in stable IEC-6/L1-HNF-1 $\alpha$  and IEC-6/L1-HNF-4 $\alpha$  cell populations by qRT-PCR. IEC-6/L1-HNF-1 $\alpha$  cells showed a significant 12-fold increase in calbindin 3 mRNA as compared to control cells whereas IEC-6/L1-HNF-4 $\alpha$  cells displayed a 36-fold increase over control cells (Fig. 7A). To further evaluate whether HNF-1 $\alpha$  was important for HNF-4 $\alpha$  to activate calbindin 3 gene transcript, a portion of the rat calbindin 3 promoter was subcloned into a luciferase reporter vector ( Fig. 7B) and cotransfection assays were performed. HNF-1 $\alpha$  alone increased calbindin 3 promoter activity by 17-fold whereas HNF-4 $\alpha$  by 4-fold when compared to empty vector (Fig. 7B). A synergistic 49-fold induction was observed when both HNF-1 $\alpha$  and HNF-4 $\alpha$  were combined in these assays (Fig. 7B). A Western blot was performed in parallel to confirm the production of both HNF-1 $\alpha$  and HNF-4 $\alpha$  proteins in these cotransfection experiments (Fig. 7C). Overall, these observations demonstrated that HNF-4 $\alpha$  was potent for the activation of several IEC specific genes and that HNF-1 $\alpha$  was able to synergies with HNF-4 $\alpha$  for the activation of intestinal genes such as calbindin 3. Importantly, specific genes associated with terminal differentiation (for example, SI) were not induced under these conditions. This correlated with the poor potential of IEC-6/L1-HNF4 $\alpha$  and IEC-6/L1-HNF-1 $\alpha$  cells to polarize and differentiate in a short term range on plastic (data not illustrated). This suggested that HNF-4 $\alpha$  and/or HNF-1 $\alpha$  presence was not sufficient to trigger IEC-6/L1 cell terminal differentiation and required signaling from mesenchymal cells during this process.



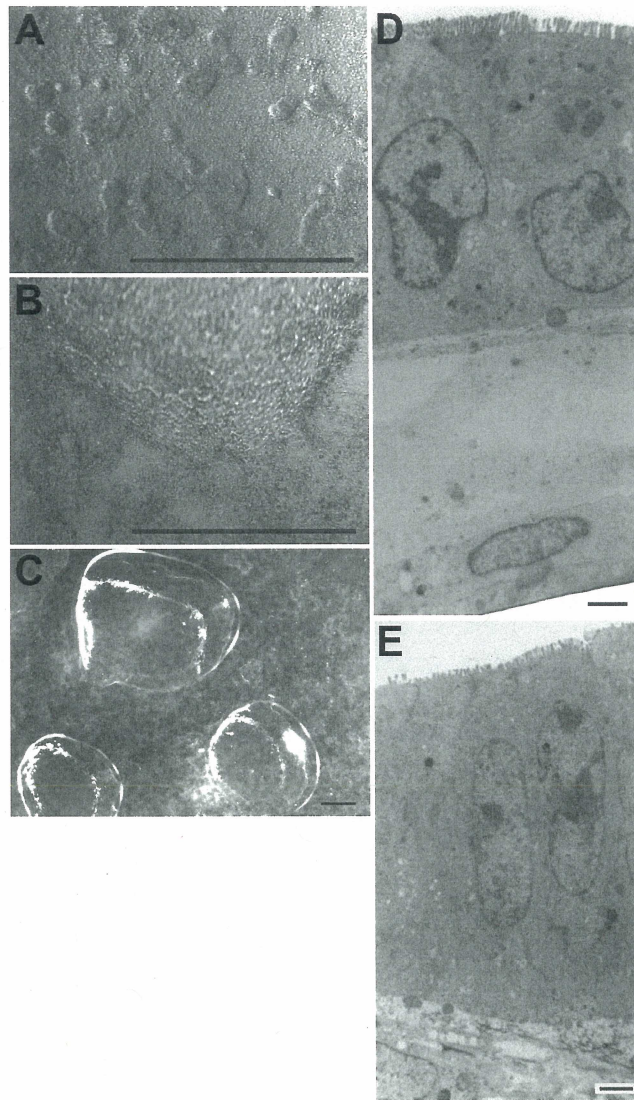


**Fig. 7. HNF-4 $\alpha$  and HNF-1 $\alpha$  synergistically activate the calbindin 3 gene.** **A.** qRT-PCR detection of calbindin 3 mRNA in stable IEC-6/L1 cell populations infected with an empty vector (control), HNF-1 $\alpha$  and HNF-4 $\alpha$ . TBP mRNA level was monitored as a housekeeping gene control. Results obtained in triplicate were reported as the  $-$ fold difference (mean  $\pm$  SD) from the control values. **B.** 293T cells were cotransfected using Lipofectamine 2000 with Calbindin3-luciferase reporter vector, SV40-*Renilla*, and different combinations of HNF-1 $\alpha$  and HNF-4 $\alpha$  expression vectors. The pCDNA3.1 plasmid was used as an empty vector to calibrate the various amounts of expression vectors used in each condition. Results obtained in triplicate were reported as the  $-$ fold difference (mean  $\pm$  SD) from transfections with the reporter construct alone and are representative of four independent experiments. **C.** Western blot analysis was performed with the use of HNF-1 $\alpha$ , HNF-4 $\alpha$  and actin antibodies on protein extracts from 293T cells cotransfected as described in B.

***HNF-4 $\alpha$  but not HNF-1 $\alpha$  promotes the formation of a fully functional polarized epithelium in culture only in the presence of Cdx2 and mesenchymal cells.***

One critical feature of the mature intestinal epithelium is to exert a selective barrier function in relation to apical-to-basal transport. In order to test whether HNF-4 $\alpha$  or HNF-1 $\alpha$  could be involved in such processes, IEC-6/L1-HNF-4 $\alpha$ , IEC-6/L1-HNF-1 $\alpha$  and control cells were plated on mesenchymal cells accordingly to the protocol described above. IEC that overexpressed HNF-4 $\alpha$  did not form scattered clusters as opposed to HNF-1 $\alpha$  or control cells (compare Fig. 8A and B). However, large dome structures appeared rapidly at the surface of HNF-4 $\alpha$  co-cultured cells (Fig. 8B). These large domes were individually filled with trapped liquid material as directly visualized by experimenter's eye and also illustrated in a low magnification field (Fig. 8C). Electron microscopy confirmed the dome structure with the accumulation of substrate in between IEC and mesenchymal cells (Fig. 8D). In addition, IEC-6/L1-HNF-4 $\alpha$  cells presented greater polarization features as compared to control cells (compare Fig. 8D and E) and IEC-6/L1-HNF-1 $\alpha$  cells (data not illustrated). Indeed, the brush border was much more developed and the nucleus was localized at the basal side of enterocytes (Fig. 8D, arrows). Overall, these observations confirmed that HNF-4 $\alpha$  was potent to induce differentiation-related genes in IEC. In addition, the formation of large dome structures that were dependent on the presence of HNF-4 $\alpha$  suggested this factor was able to promote apical-basal transport in the presence of mesenchymal cells, a feature strictly restricted to a fully functional intestinal epithelium.





**Fig. 8. HNF-4 $\alpha$  promotes the formation of dome structures in IEC-6/L1 co-cultured with mesenchymal cells.** **A.** Light morphology of IEC-6/L1 control monolayer of cells at co-culture day 8. The arrow depicts polarized cluster of cells. Original magnification 40X. Bar = 1 mm. **B.** Light morphology of IEC-6/L1-HNF-4 $\alpha$  monolayer of cells at co-culture day 8. The arrows depict a portion of a dome structure. Original magnification 40X. Bar = 1mm. **C.** Light morphology of IEC-6/L1-HNF-4 $\alpha$  monolayer of cells at co-culture day 8. The arrow depicts a dome filled with trapped liquid material. Original magnification 8X. Bar = 1mm. **D. and E.** Electron microscopic analysis of IEC-6/L1-HNF-4 $\alpha$  stable cells (D) or IEC-6/L1-control cells (E) co-cultured with mesenchymal cells for 10 days. Bar = 2  $\mu$ m. The bracket indicates the accumulation of composite resulting probably from apical-basal transport. Arrows indicate brush borders.

## DISCUSSION

Intestinal epithelial cell differentiation is tightly regulated in order to maintain intestinal homeostasis (27, 44). Coordination of gene transcription is recognized to be closely related to the regulatory processes that promote the maturation and maintenance of intestinal epithelial functions. Although molecular pathways involved in these processes were largely investigated (59), the precise and sequential characterization of IEC differentiation was hampered by the lack of adequate cellular systems that can recapitulate this process *in vitro*. Well-characterized culture models of normal crypt-like cells already exist (38, 43). However, these cellular models lack the capacity to differentiate in normal cell culture conditions. The overexpression of Cdx2 in the IEC-6 crypt cell line (IEC-6/L1) can lead to primitive cellular differentiation *in vitro* (54). Indeed, these cells grow in multicellular layers after the reach of confluence on the top of which few cells will present differentiation features after 30 days in culture. In addition, HNF-4 $\alpha$  and HNF-1 $\alpha$  protein expression remain beyond the limit of detection even after this extensive period of time (data not illustrated). The current study aimed to culture IEC-6/L1 cells on top of mesenchymal cells to reconstitute a microenvironment more representative of the normal small intestinal mucosa (33, 34, 41). The co-cultured IEC-6/L1 monolayer rapidly developed clusters of cells that began polarization and displayed morphological features that resembled differentiated enterocytes. The complete gene profiling analysis performed during the course of these morphological modifications supported that IEC were in the process of differentiation as illustrated with the complete and progressive panel of genes modulated during the course of this process. This analysis identified HNF-4 $\alpha$  and HNF-1 $\alpha$  as being strongly induced coincidentally with the beginning of the differentiation process. Molecular analyses confirmed that HNF-4 $\alpha$  was potent to activate intestinal gene transcript expression and that HNF-1 $\alpha$

was able to synergies with HNF-4 $\alpha$  for the transcriptional activation of the calbindin 3 gene normally restricted to differentiated IEC. Finally, reintroduction of HNF-4 $\alpha$  into the co-culture conditions demonstrated its crucial role into the promotion of intestinal epithelial barrier functions.

Multiple signaling pathways implicated in IEC differentiation emerge from the cross talk between mesenchymal and epithelial cells (47). Signaling between these compartments involves secreted soluble and insoluble factors from the epithelium or the mesenchyme that can transduce a signal to neighbour cells. Members of the bone morphogenetic proteins (19, 21) and hedgehog (29, 55) families are well-described modulators of such interactions. Indirect modulators of epithelial-mesenchymal interactions were also identified. For example, the specific mesenchymal transcription factor Foxl1 controls epithelial Wnt signaling via overproduction of epithelial proteoglycans (39). Since the presence of mesenchymal cells is crucial for IEC-6/L1 efficient differentiation *in vitro*, communication between the two cell compartments is obvious. This can implicate regulation at multiple levels including protein phosphorylation, molecule translocation from one compartment to another as well as mesenchymal specific modification of gene expression (16, 22, 63). Our findings demonstrate that mesenchymal cells are crucial to instruct IEC to endogenously express HNF-4 $\alpha$ . It will be of interest to investigate the specific mesenchymal-to-epithelial signaling cascade responsible for the activation of epithelial HNF-4 $\alpha$  gene expression.

The concept that immortalized IEC cells can retain progenitor properties has been provided in xenograft experiments in the past (24). Our results support the notion that Cdx2 expression is required for IEC to initiate differentiation into mature enterocytes in the mesenchymal context. Cdx2 expression increases with polarization and differentiation of IEC clusters (Fig. 4D). This observation is consistent with the increasing gradient of Cdx2 expression along the intestinal crypt (8, 23, 45). Other epithelial cell lineages (goblet and

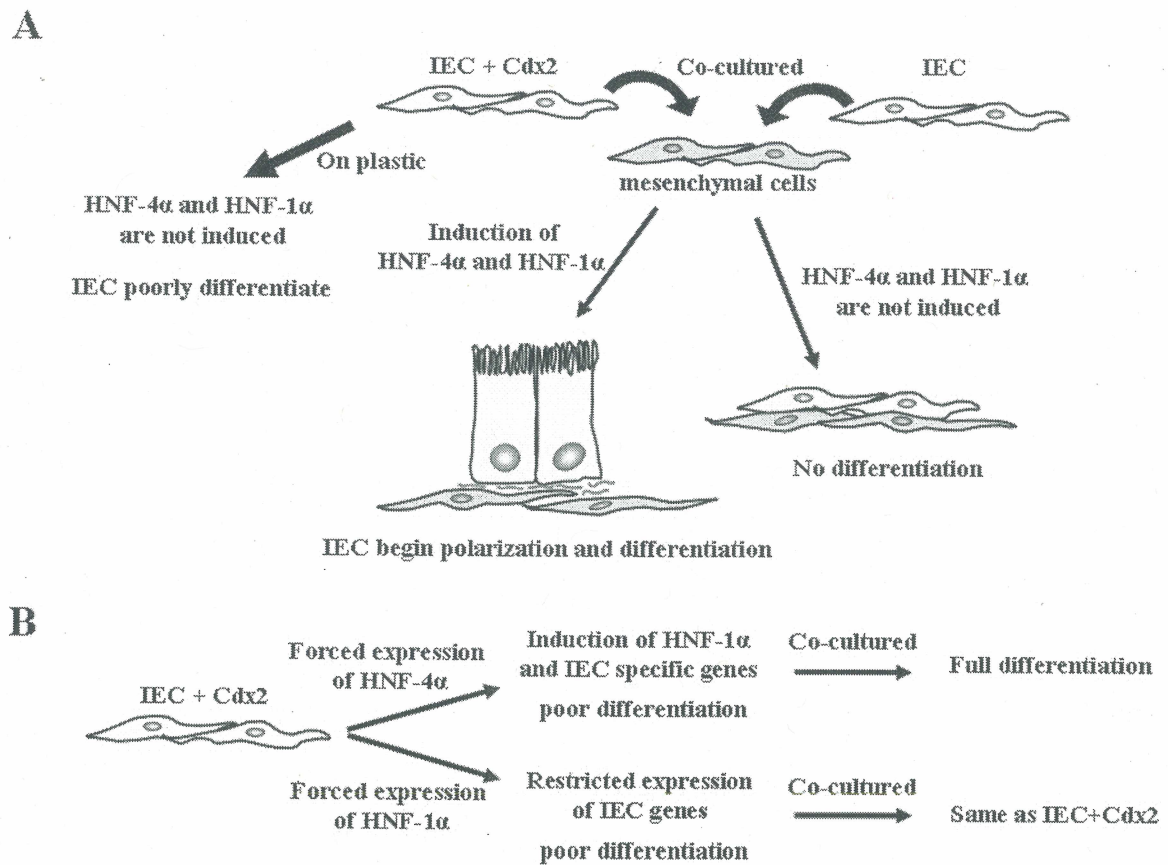
enteroendocrine cells) were rarely but detected throughout the co-culture system (data not illustrated). This agrees with the normal composition of the intestinal mucosa in which secretory cells represent only 5 to 10% of total epithelial cells.

Some transcription factors were identified to modulate intestinal gene expression (59). Cdx2 modulates cellular functions and intestine-specific gene expression (6, 17, 50, 54). GATA-4 and HNF-1 $\alpha$  are expressed in the intestinal epithelium and cooperate in transcriptional regulation of intestinal epithelial specific genes such as SI (6). Specific induction of these factors in differentiating IEC (Fig. 4) emphasizes the initiation of a differentiation program within the co-culture system. Some suggestions from the literature have linked HNF-4 $\alpha$  transcriptional action with the process of epithelial cell polarization (1, 9, 48). HNF-4 $\alpha$  can induce the expression of cell junction molecules such as occludin and claudins and can modulate subcellular localization of proteins associated with cellular polarity (9, 48). Interestingly, HNF-4 $\alpha$  expression was detectable at day 5 when occludin and claudin family members were up-regulated in IEC polarized cells. HNF-4 $\alpha$  is considered to be the master regulator of the human hepatocyte where it controls the expression of molecules implicated in lipid uptake and transport (20, 28, 36, 61). HNF-4 $\alpha$  is expressed along both the vertical and horizontal axis of the gut epithelium and regulates intestinal epithelial expression of alkaline phosphatase, ApoA-IV and meprin-1 $\alpha$  genes (37, 49, 53). Conditional knockout of HNF-4 $\alpha$  demonstrated its crucial role into the embryonic development of the mouse colonic epithelium but still remains to be investigated into the small intestinal context (14). Metabolome, transcriptome and bioinformatic analyses indicated that HNF-4 $\alpha$  could be implicated in intestinal lipid metabolism with the regulation of apolipoproteins synthesis (53). Our findings demonstrate that HNF-4 $\alpha$  is a potent activator of several intestinal genes normally associated with mature enterocyte functions. In addition, HNF-4 $\alpha$  is capable of rapidly inducing HNF-1 $\alpha$  gene transcript and protein levels

within the IEC context. This molecular interaction is probably due to a direct transcriptional action of HNF-4 $\alpha$  on the HNF-1 $\alpha$  promoter since it was previously reported that HNF-4 $\alpha$  can directly control the transcription of HNF-1 $\alpha$  in hepatocytes (26, 36). HNF-1 $\alpha$  was also shown to control HNF-4 $\alpha$  transcription specifically in pancreatic cells (3), a relationship that was not observed in our culture model system. Our observations lead us to suggest that HNF-4 $\alpha$  is required for the activation of HNF-1 $\alpha$  expression in IEC. Since HNF-4 $\alpha$  and HNF-1 $\alpha$  can also physically interact to modulate gene transcription (12, 25), these transcription factors probably form a multicomponent transcriptional loop to regulate intestinal gene transcription. In support of this affirmation, our results show that HNF-4 $\alpha$  can strongly collaborate with HNF-1 $\alpha$  with the transcriptional activation of the calbindin 3 gene. Since the calbindin 3 gene 5'-flanking region contains predicted interacting sites for HNF-4 $\alpha$  and that HNF-1 $\alpha$  was already reported to influence calbindin 3 transcription via several interacting sites (60), the exact nature of the molecular interactions between these transcription factor and the calbindin gene must be complex.

In conclusion, this study led to the generation and detailed molecular characterization of a functional *in vitro* system for IEC polarization and differentiation and functionally identified for the first time HNF-4 $\alpha$  as an important contributor for these actions. Combinatory mechanisms between multiple transcriptional regulators are likely to occur during IEC differentiation and our findings contribute to a better definition of the molecular cascade that lead to the establishment of the intestinal epithelial transcriptome. Based on our findings, we propose the following schematic (Fig. 9): Cdx2 is crucial to initiate IEC to polarize and differentiate when co-cultured on mesenchymal cells. These processes are coordinated with the rapid activation of HNF-4 $\alpha$  and HNF-1 $\alpha$  expression which requires both mesenchymal signals and Cdx2 action (Fig. 9A). On the other hand, HNF-4 $\alpha$  activates HNF-1 $\alpha$  expression. HNF-4 $\alpha$  is a potent activator of intestinal epithelial genes and

collaborates with HNF-1 $\alpha$  to regulate intestinal genes. Forced expression of HNF-1 $\alpha$  in the co-culture system does not improve differentiation, an observation that correlates well with the absence of morphological defect in the intestinal epithelium of HNF-1 $\alpha$  knockout mice (4). However, forced expression of HNF-4 $\alpha$  leads to complete polarization and features normally associated with apical-to-basal transport (15) (Fig. 9B). Genetic modifications of the cellular counterparts of this system will give novel opportunities to sequentially assess the function of any molecules of interest during intestinal differentiation and should allow a better definition of the crucial pathways that regulate maturation of intestinal epithelial cells.



**Fig. 9. Schematic of the cascade of events that lead to IEC differentiation.** **A.** Cdx2 is required to initiate IEC to polarize and differentiate when co-cultured on mesenchymal cells. This coincides with the induction of HNF-4 $\alpha$  and HNF-1 $\alpha$  only in the presence of Cdx2 and mesenchymal cells. **B.** HNF-4 $\alpha$  activates HNF-1 $\alpha$  and several intestinal epithelial genes. Forced expression of HNF-4 $\alpha$  promotes features associated with apical-to-basal transport, a feature limited to well polarized and fully differentiated epithelial cells.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Peter G. Traber (Baylor College of Medicine, Houston) for providing the IEC-6/L1 cell line, Denis Martel and Charles Bertrand for assistance in electron microscopy procedures and the Microarray Platform Lab from McGill University and Génome Québec Innovation Centre for the generation of the cDNA arrays. This work was supported by CIHR (To FB) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC grant number 262094-03). C.R.L. and J.P.B. are supported from the NSERC. F.B. and N.P. are scholars from the « Fonds de la Recherche en Santé du Québec » and members of the FRSQ-funded « Centre de Recherche Clinique Étienne Lebel ».



## REFERENCES

1. **Battle MA, Konopka G, Parviz F, Gaggl AL, Yang C, Sladek FM, and Duncan SA.** Hepatocyte nuclear factor 4alpha orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 8419-8424, 2006.
2. **Beaulieu JF.** Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog Histochem Cytochem* 31: 1-78, 1997.
3. **Boj SF, Parrizas M, Maestro MA, and Ferrer J.** A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 14481-14486, 2001.
4. **Bosse T, van Wering HM, Gielen M, Dowling LN, Fialkovich JJ, Piaseckyj CM, Gonzalez FJ, Akiyama TE, Montgomery RK, Grand RJ, and Krasinski SD.** Hepatocyte nuclear factor-1alpha is required for expression but dispensable for histone acetylation of the lactase-phlorizin hydrolase gene in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G1016-1024, 2006.
5. **Boudreau F, Lussier CR, Mongrain S, Darsigny M, Drouin JL, Doyon G, Ran Suh E, Beaulieu JF, Rivard N, and Perreault N.** Loss of cathepsin L activity promotes claudin-1 overexpression and intestinal neoplasia. *Faseb J* 2007.
6. **Boudreau F, Rings EH, van Wering HM, Kim RK, Swain GP, Krasinski SD, Moffett J, Grand RJ, Suh ER, and Traber PG.** Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *J Biol Chem* 277: 31909-31917, 2002.
7. **Boudreau F, Zhu Y, and Traber PG.** Sucrase-isomaltase gene transcription requires the hepatocyte nuclear factor-1 (HNF-1) regulatory element and is regulated by the ratio of HNF-1 alpha to HNF-1 beta. *J Biol Chem* 276: 32122-32128, 2001.
8. **Boulanger J, Vezina A, Mongrain S, Boudreau F, Perreault N, Auclair BA, Laine J, Asselin C, and Rivard N.** 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, 2005.
9. **Chiba H, Gotoh T, Kojima T, Satohisa S, Kikuchi K, Osanai M, and Sawada N.** Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha triggers formation of functional tight junctions and

establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res* 286: 288-297, 2003.

10. **Crosnier C, Stamatakis D, and Lewis J.** Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* 7: 349-359, 2006.
11. **Divine JK, Staloch LJ, Haveri H, Jacobsen CM, Wilson DB, Heikinheimo M, and Simon TC.** GATA-4, GATA-5, and GATA-6 activate the rat liver fatty acid binding protein gene in concert with HNF-1alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G1086-1099, 2004.
12. **Eeckhoutte J, Formstecher P, and Laine B.** Hepatocyte nuclear factor 4alpha enhances the hepatocyte nuclear factor 1alpha-mediated activation of transcription. *Nucleic acids research* 32: 2586-2593, 2004.
13. **Escaffit F, Boudreau F, and Beaulieu JF.** Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J Cell Physiol* 203: 15-26, 2005.
14. **Garrison WD, Battle MA, Yang C, Kaestner KH, Sladek FM, and Duncan SA.** Hepatocyte nuclear factor 4alpha is essential for embryonic development of the mouse colon. *Gastroenterology* 130: 1207-1220, 2006.
15. **Grasset E, Pinto M, Dussaulx E, Zweibaum A, and Desjeux JF.** Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *The American journal of physiology* 247: C260-267, 1984.
16. **Gregorieff A, and Clevers H.** Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 19: 877-890, 2005.
17. **Guo RJ, Suh ER, and Lynch JP.** The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. *Cancer Biol Ther* 3: 593-601, 2004.
18. **Haffen K, Keding M, and Simon-Assmann P.** Mesenchyme-dependent differentiation of epithelial progenitor cells in the gut. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 6: 14-23, 1987.
19. **Haramis AP, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkhoeer S, Offerhaus GJ, and Clevers H.** De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 303: 1684-1686, 2004.
20. **Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, and Gonzalez FJ.** Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* 21: 1393-1403, 2001.

21. **He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng X, He X, Wiedemann LM, Mishina Y, and Li L.** BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* 36: 1117-1121, 2004.
22. **Hooper JE, and Scott MP.** Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 306-317, 2005.
23. **James R, Erler T, and Kazenwadel J.** Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J Biol Chem* 269: 15229-15237, 1994.
24. **Kedinger M, Simon-Assmann PM, Lacroix B, Marxer A, Hauri HP, and Haffen K.** Fetal gut mesenchyme induces differentiation of cultured intestinal endodermal and crypt cells. *Dev Biol* 113: 474-483, 1986.
25. **Ktistaki E, and Talianidis I.** Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science* 277: 109-112, 1997.
26. **Kuo CJ, Conley PB, Chen L, Sladek FM, Darnell JE, Jr., and Crabtree GR.** A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* 355: 457-461, 1992.
27. **Leedham SJ, Brittan M, McDonald SA, and Wright NA.** Intestinal stem cells. *J Cell Mol Med* 9: 11-24, 2005.
28. **Li J, Ning G, and Duncan SA.** Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev* 14: 464-474, 2000.
29. **Madison BB, Braunstein K, Kuizon E, Portman K, Qiao XT, and Gumucio DL.** Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* 132: 279-289, 2005.
30. **Matter K, Aijaz S, Tsapara A, and Balda MS.** Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 17: 453-458, 2005.
31. **Mitchelmore C, Troelsen JT, Spodsberg N, Sjostrom H, and Noren O.** Interaction between the homeodomain proteins *Cdx2* and *HNF1alpha* mediates expression of the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Biochem J* 346 Pt 2: 529-535, 2000.
32. **Miyoshi J, and Takai Y.** Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 815-855, 2005.
33. **Montgomery RK, Mulberg AE, and Grand RJ.** Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. *Gastroenterology* 116: 702-731, 1999.

34. **Moore KA, and Lemischka IR.** Stem cells and their niches. *Science* 311: 1880-1885, 2006.
35. **Novak JP, Sladek R, and Hudson TJ.** Characterization of variability in large-scale gene expression data: implications for study design. *Genomics* 79: 104-113, 2002.
36. **Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI, and Young RA.** Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303: 1378-1381, 2004.
37. **Olsen L, Bressendorff S, Troelsen JT, and Olsen J.** Differentiation-dependent activation of the human intestinal alkaline phosphatase promoter by HNF-4 in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G220-226, 2005.
38. **Perreault N, and Beaulieu JF.** Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res* 224: 354-364, 1996.
39. **Perreault N, Katz JP, Sackett SD, and Kaestner KH.** Foxl1 controls the Wnt/beta-catenin pathway by modulating the expression of proteoglycans in the gut. *J Biol Chem* 276: 43328-43333, 2001.
40. **Potten CS, and Loeffler M.** Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110: 1001-1020, 1990.
41. **Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, and Mifflin RC.** Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G2-7, 2005.
42. **Quaroni A, and Isselbacher KJ.** Cytotoxic effects and metabolism of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in duodenal and ileal epithelial cell cultures. *J Natl Cancer Inst* 67: 1353-1362, 1981.
43. **Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, and Isselbacher KJ.** Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol* 80: 248-265, 1979.
44. **Radtke F, and Clevers H.** Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307: 1904-1909, 2005.
45. **Rings EH, Boudreau F, Taylor JK, Moffett J, Suh ER, and Traber PG.** Phosphorylation of the serine 60 residue within the Cdx2 activation domain mediates its transactivation capacity. *Gastroenterology* 121: 1437-1450, 2001.

46. **Sakaguchi T, Gu X, Golden HM, Suh E, Rhoads DB, and Reinecker HC.** Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha. *J Biol Chem* 277: 21361-21370, 2002.
47. **Sancho E, Batlle E, and Clevers H.** Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 695-723, 2004.
48. **Satohisa S, Chiba H, Osanai M, Ohno S, Kojima T, Saito T, and Sawada N.** Behavior of tight-junction, adherens-junction and cell polarity proteins during HNF-4alpha-induced epithelial polarization. *Exp Cell Res* 310: 66-78, 2005.
49. **Sauvaget D, Chauffeton V, Citadelle D, Chatelet FP, Cywiner-Golenzer C, Chambaz J, Pincon-Raymond M, Cardot P, Le Beyec J, and Ribeiro A.** 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, 2002.
50. **Silberg DG, Swain GP, Suh ER, and Traber PG.** Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology* 119: 961-971, 2000.
51. **Simon-Assmann P, Kedinger M, and Haffen K.** Immunocytochemical localization of extracellular-matrix proteins in relation to rat intestinal morphogenesis. *Differentiation* 32: 59-66, 1986.
52. **Staloch LJ, Divine JK, Witten JT, and Simon TC.** C/EBP and Cdx family factors regulate liver fatty acid binding protein transgene expression in the small intestinal epithelium. *Biochim Biophys Acta* 1731: 168-178, 2005.
53. **Stegmann A, Hansen M, Wang Y, Larsen JB, Lund LR, Ritte L, Nicholson JK, Quistorff B, Simon-Assmann P, Troelsen JT, and Olsen J.** Metabolome, transcriptome and bioinformatic cis-element analyses point to HNF-4 as a central regulator of gene expression during enterocyte differentiation. *Physiol Genomics* 2006.
54. **Suh E, and Traber PG.** An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* 16: 619-625, 1996.
55. **van den Brink GR, Bleuming SA, Hardwick JC, Schepman BL, Offerhaus GJ, Keller JJ, Nielsen C, Gaffield W, van Deventer SJ, Roberts DJ, and Peppelenbosch MP.** Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat Genet* 36: 277-282, 2004.

56. **van Wering HM, Bosse T, Musters A, de Jong E, de Jong N, Hogen Esch CE, Boudreau F, Swain GP, Dowling LN, Montgomery RK, Grand RJ, and Krasinski SD.** Complex regulation of the lactase-phlorizin hydrolase promoter by GATA-4. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G899-909, 2004.
57. **van Wering HM, Huibregtse IL, van der Zwan SM, de Bie MS, Dowling LN, Boudreau F, Rings EH, Grand RJ, and Krasinski SD.** Physical interaction between GATA-5 and hepatocyte nuclear factor-1alpha results in synergistic activation of the human lactase-phlorizin hydrolase promoter. *J Biol Chem* 277: 27659-27667, 2002.
58. **van Wering HM, Moyer L, Grand RJ, and Krasinski SD.** Novel interaction at the Cdx-2 binding sites of the lactase-phlorizin hydrolase promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 299: 587-593, 2002.
59. **Walters JR.** Recent findings in the cell and molecular biology of the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 21: 135-140, 2005.
60. **Wang L, Klopot A, Freund JN, Dowling LN, Krasinski SD, and Fleet JC.** Control of differentiation-induced calbindin-D9k gene expression in Caco-2 cells by cdx-2 and HNF-1alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G943-953, 2004.
61. **Watt AJ, Garrison WD, and Duncan SA.** HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology* 37: 1249-1253, 2003.
62. **Whitehead RH, Demmler K, Rockman SP, and Watson NK.** Clonogenic growth of epithelial cells from normal colonic mucosa from both mice and humans. *Gastroenterology* 117: 858-865, 1999.
63. **Zhang J, and Li L.** BMP signaling and stem cell regulation. *Dev Biol* 284: 1-11, 2005.

### **2.3. Manuscrit 3**

**Carine R. Lussier**, François Brial, Sébastien A.B. Roy, Marie-Josée Langlois, Elena F. Verdu, Nathalie Rivard, Nathalie Perreault et François Boudreau. Hepatocyte-nuclear-factor-1 $\alpha$  regulates adult mouse intestinal epithelial growth and cell lineages differentiation. Soumis le 28 avril 2010. Gastroenterology. GASTRO-D-10-00835.

### **AVANT-PROPOS**

J'ai effectué la gestion de la colonie de souris, mis au point et effectué les génotypages et réalisé l'ensemble des récoltes de tissus. J'ai réalisé presque la totalité des expériences et observations en lien avec cette étude et effectué les analyses des résultats des micropuces à ADN. François Brial, étudiant au doctorat dans notre laboratoire, a effectué plusieurs extraits d'ARN, quelques RT-PCR quantitatifs, ainsi que les immunodétections de la chromogranine A et nous avons tous les deux effectué les comptages compilés dans les Fig2E, Fig4A,C et Fig5A. Les analyses de la Fig3A ont été effectuées dans les laboratoires de Pre. Elena Verdu. L'expérience en lien avec la Fig3B,C a été effectuée avec Sébastien Roy, étudiant à la maîtrise chez Pre. Nathalie Perreault. Marie-Josée Langlois, assistante de recherche chez Pre. Nathalie Rivard, a effectué les extraits de protéines par « scrapping » de muqueuse. Pour le manuscrit, j'ai compilé les résultats, effectué les analyses statistiques, conçu les graphiques et tableaux, préparé toutes les figures et légendes et écrit la section « materials and methods ». À la lumière de mes analyses, observations, revue de la littérature, j'ai apporté des idées et réflexions originales et innovatrices qui ont augmenté l'impact de ce projet. À titre d'exemple, j'ai suggéré l'implication de REDD2 et soulevé l'importance fonctionnelle de la ghréline, lors de l'analyse du phénotype du modèle expérimental.

## RÉSUMÉ

Malgré le fait que les rôles de *Hnfl* $\alpha$  soient bien caractérisés dans le pancréas et le foie, sa fonction précise au niveau du maintien de l'homéostasie intestinale demeure très peu caractérisée. Nous présentons que la perte de *Hnfl* $\alpha$  chez la souris résulte en un dérèglement des fonctions de plusieurs types cellulaires de l'épithélium intestinal, ainsi qu'en une augmentation de la prolifération cryptale et une intestinalomégalie chez l'adulte. Nous montrons qu'au niveau de la muqueuse, *Hnfl* $\alpha$  est un important régulateur des fonctions de barrière et de transport du glucose vers la circulation sanguine. L'intestin des souris invalidées pour *Hnfl* $\alpha$  présente une dérégulation de la différenciation des cellules endocrines, caractérisée, entre autres, par une diminution de l'expression du « gastric inhibitory polypeptide » et une augmentation de l'expression de la ghreline, deux hormones spécifiquement exprimées par le système gastro-intestinal et directement impliquées dans l'homéostasie du glucose et de l'énergie. Un impact similaire est observé au niveau de la différenciation des cellules de Paneth, qui présentent des granules d'exocytose anormaux, une caractéristique également retrouvée chez les patients atteints de la maladie de Crohn's. Finalement, nous identifions une diminution de l'expression de *Ddit4L/REDD2*, un inhibiteur de « mammalian target of rapamycin » (mTOR), dans l'intestin grêle des souris adultes invalidées pour *Hnfl* $\alpha$ . Cette observation corrèle avec l'activation soutenue de la voie de signalisation de mTOR à l'atteinte de l'âge adulte. L'ensemble de ces résultats révèle un rôle non suspecté pour *Hnfl* $\alpha$  au cours de la maturation des lignées épithéliales sécrétrices et dans la régulation de la croissance intestinale via la voie de signalisation de mTOR.



# **Hepatocyte-nuclear-factor-1 $\alpha$ regulates adult mouse intestinal epithelial growth and cell lineages differentiation**

*Running title:* Hnfl $\alpha$  controls adult gut homeostasis

Carine R. Lussier<sup>1</sup>, François Briat<sup>1</sup>, Sébastien A.B. Roy<sup>1</sup>, Marie-Josée Langlois<sup>1</sup>, Elena F. Verdu<sup>2</sup>, Nathalie Rivard<sup>1</sup>, Nathalie Perreault<sup>1</sup> and François Boudreau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département d'anatomie et biologie cellulaire, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, CANADA. <sup>2</sup>Division of Gastroenterology, McMaster University, Hamilton, ON, CANADA.

*Grants Support:* This work was supported by the Canadian Institute of Health Research (CIHR) (MOP-89770 to F.B.). F.B. is a scholar from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec". F.B., N.P. and N.R. are members of the FRSQ-funded "Centre de Recherche Clinique Étienne Lebel". N.R. is a recipient of a Canadian Research Chair in Signaling and Digestive Physiopathology. C.R.L. is a recipient of a NSERC fellowship. E. Verdu holds a McMaster University Dep. of Medicine Internal Career Research Award.

FBoudreau and CRL were involved in study concept and design; CRL, FBrial, SABR and MJL in acquisition of data; FBoudreau, CRL, EFV, NR and NP in analysis and interpretation of data; FBoudreau and CRL in drafting of the manuscript; FBoudreau, CRL, NR and NP in critical revision of the manuscript for important intellectual content.

## ABSTRACT

**Background & Aims:** Although *Hnf1 $\alpha$*  is crucial for pancreas and liver functions, it is believed to play a limited functional role for intestinal epithelial functions. The aim of this study was to assess the consequences of abrogating *Hnf1 $\alpha$*  on the maintenance of adult small intestinal epithelial functions. **Methods:** An *Hnf1 $\alpha$*  knockout mouse model was used. Assessment of histological abnormalities, crypt epithelial cell proliferation, epithelial barrier, glucose transport and signalling pathways were measured in these animals. Changes in global gene expression were also analyzed. **Results:** Mice lacking *Hnf1 $\alpha$*  displayed increased crypt proliferation and intestinalomegaly as well as a disturbance of intestinal epithelial cell lineages production during adult life. This phenotype was associated with a decrease of the mucosal barrier function and lumen-to-blood glucose delivery. The mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway was found to be overly activated in the small intestine of adult *Hnf1 $\alpha$*  mutant mice. The intestinal epithelium of *Hnf1 $\alpha$*  null mice displayed a reduction of the enteroendocrine cell population. An impact was also observed on proper Paneth cell differentiation with abnormalities in the granule exocytosis pathway. **Conclusions:** Together, these results unravel a functional role for *Hnf1 $\alpha$*  in regulating adult intestinal growth and sustaining the maturation of secretory cell lineages.

Keywords: REDD2; mTOR; enteroendocrine cells; organomegaly; Paneth cells

## INTRODUCTION

The small intestinal epithelium consists of villi and crypts lined with proliferative stem and progenitor cells. These cells ensure constant renewal of the epithelium throughout the life of the individual<sup>1,2</sup>. The suckling-weaning transition occurs during the third post-natal week and leads to profound changes in intestinal gene expression and epithelial cell function for the establishment of the adult functional mucosa<sup>3,4</sup>. The mature epithelium of the small intestine is composed of four major cell lineages including enterocytes, enteroendocrine, goblet and Paneth cells. Enterocytes express several intestinal epithelium gene products involved in carbohydrates and lipids absorption, transport and metabolism as well as in barrier integrity to ensure protection from the luminal side and optimal blood nutrient and hormone delivery to the organism.

Several transcription factors have been identified to participate in intestinal epithelial cell determination and gut functions<sup>1,4</sup>. The zinc finger GATA4 is crucial for jejunal absorption of dietary fat<sup>5</sup>. Conditional ablation of the homeobox *Cdx2* in the mouse intestinal endoderm impairs intestinal identity<sup>6</sup>. The transcriptional regulators *Hnf1α* and *Hnf4α* are direct transcriptional targets of *Cdx2* in this context<sup>6</sup>. Loss of *Hnf4α* during late mouse embryonic gut development results in minor alterations of intestinal homeostasis<sup>7</sup>. The impact of sole *Hnf1α* deletion is currently thought to be of no consequence on adult intestinal epithelium homeostasis<sup>8</sup>.

HNF1α is a homeodomain-containing transcription factor expressed in the liver, kidney, pancreas, stomach and intestine<sup>9,10</sup>. *Hnf1α* knockout mouse models display both Laron-type dwarfism and non-insulin-dependent diabetes characterized also with a marked liver enlargement<sup>11,12</sup> and alterations in the maintenance of normal endocrine pancreas<sup>13</sup>. Hnf1α is expressed in the nucleus of intestinal epithelial cells in the embryo and early after

birth and vanishes during the first two weeks of mouse post-natal life to reappear during the suckling-weaning transition<sup>14 15</sup>. These observations suggested that the presence of intestinal Hnfl $\alpha$  was irrelevant during early post-natal development to become functionally important during the onset of adult life.

To clarify the *in vivo* role of Hnfl $\alpha$  in the small intestinal epithelium, we undertook the characterization of the impact of mouse *Hnfl $\alpha$*  loss in this tissue. We report that loss of Hnfl $\alpha$  results in important intestinal epithelial disorders consisting of drastic increases in crypt proliferation and intestinalomegaly with associated disturbance of intestinal epithelial cell lineages functions during adult life.

## MATERIALS AND METHODS

### **Animals**

The *Hnfl*  $\alpha$  knockout mouse model was described elsewhere <sup>12</sup>. *Hnfl*  $\alpha$  knockout and control littermates were treated in accordance with a protocol reviewed and approved by the Institutional Animal Research Review Committee of the Université de Sherbrooke in conformity with the Canadian Council on Animal Care.

### **Histologic staining and immunofluorescence**

Small intestinal segments were fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4°C, dehydrated, embedded in paraffin and cut to 5- $\mu$ m sections. Alcian blue and hematoxylin and eosin staining, as well as immunofluorescence were performed exactly as previously described <sup>7</sup>. Antibodies used are listed in Supplementary Table 1.

### **Ion transport and permeability measurement**

Each jejunum segment of mouse aged of 3 months was opened along the mesenteric border, rinsed, and mounted in an Ussing chamber. Epithelial ion transport and permeability measurements were done exactly as described before <sup>16</sup>.

### **Gastric gavage and plasma glucose measurement**

D-glucose diluted in water was administered to overnight fasted 2-month-old mice mice through a gastric tube (20G x 1-1/2"; Popper and sons). Glucose plasma level was measured immediately before gastric gavage and at times 5, 10, 15, 30, 60 and 120 min with a FreeStyle Light apparatus (Abbott).

## **RNA isolation and RT-PCR**

Total RNA from small intestinal segment was isolated and qRT-PCR performed exactly as previously described<sup>17</sup>. Results were individually calibrated with TATA box binding protein (TBP). Primer sequences are available upon request.

## **Microarray screening and data analysis**

Probes for microarray analysis were generated from RNA isolated from the distal jejunum of 3 control and 3 *Hnflako* mice at 4 months of age. Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 arrays were screened via the microarray platform of McGill University and Génome Québec Innovation Center as previously described<sup>18</sup>. To test for statistically significant changes in signal intensity ( $p$  values of  $\leq 0.05$ ; EB Wright & Simon), compiled data (RMA) were screened using FlexArray 1.1 (Genome Quebec). Data were analyzed through the use of Ingenuity Pathways Analysis to generate networks of genes associated with biological functions and/or diseases (Ingenuity Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)).

## **Western blot analysis**

Enrichment of mucosal total protein extracts were obtained from starved mice ileum segments as previously reported<sup>19</sup> and electrophoresis and blotting were performed exactly as previously described<sup>20</sup>. Antibodies used are listed in Supplementary Table 1.

## **Quantification and statistical analysis**

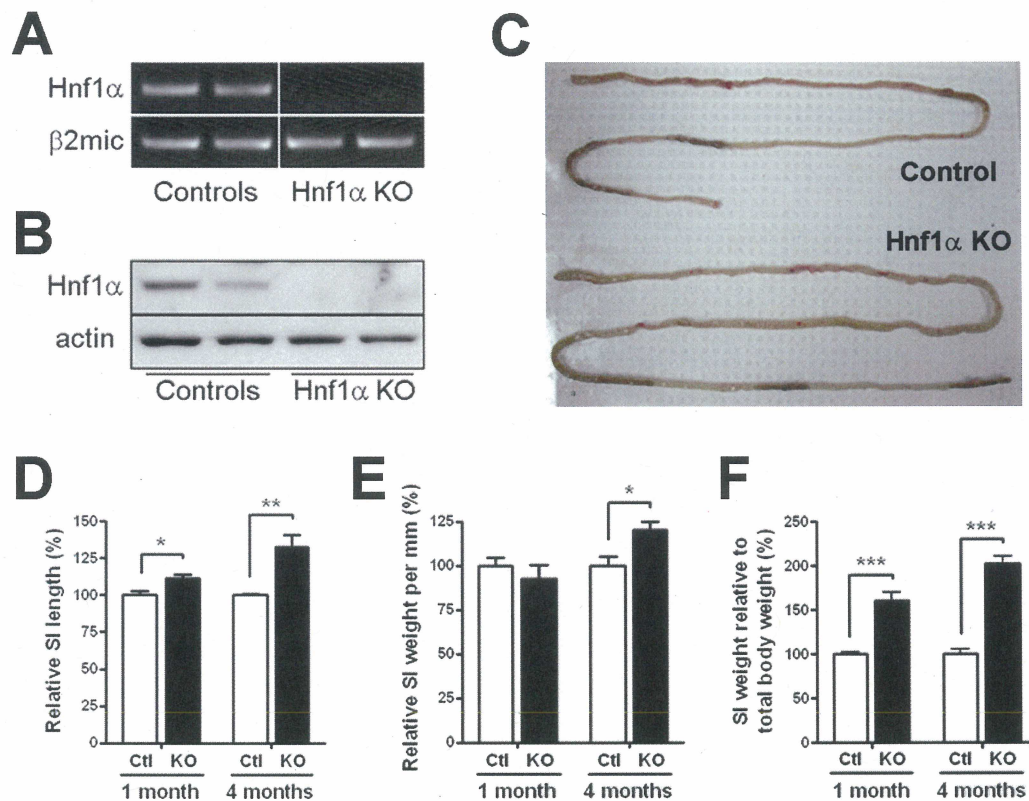
Morphometry was determined using the MetaMorph software (Universal Imaging). Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 4 software. Statistics were calculated using the two-way Student's two-tailed  $t$  test, two-way nested analysis of variance (ANOVA), or by the Mann-Whitney  $U$  test. Differences were considered significant with a  $P$  value of  $<0.05$ .

## RESULTS

### ***Hnflα* deletion alters the architecture of adult small intestinal epithelium and leads to intestinalomegaly**

A mouse *Hnflα* knockout colony was generated by breeding the previously reported *Hnflα* mutant strain in which *Hnflα* gene expression was inactivated with the removal of the first exon that resulted in the abolition of *Hnflα* gene transcription<sup>12</sup>. As previously reported, *Hnflα* mutant mice displayed a critical reduction in their growth during post-natal development that was maintained during adulthood (data not shown). We observed that ~25% of the mutant died during the first 36h after birth. Total RNA and protein isolated from the jejunum and subjected to RT-PCR and Western showed that mutant mice did not produce significant levels of wild-type *Hnflα* mRNA (Figure 1A) and protein (Figure 1B). Macroscopic analysis of intestinal morphology in young *Hnflα* mutant pups did not reveal significant difference with control littermates. However, the intestine of adult *Hnflα* mutant animals was longer and markedly expanded (Figure 1C) despite the fact these mutant mice were significantly reduced in size as compared with those of control littermates. Statistical analysis indicated a significant increase of 1.33-fold in length (Figure 1D), 1.20-fold in relative weight per length (Figure 1E) and 2.02-fold in relative weight to total body weight (Figure 1F) of the small intestines of 4 month-old mutant mice compared with those of control littermates. Significant but less prominent increases in the length and relative weight of the small intestine were also observed in 1 month old mutant animals as compared with those of control littermates (Figure 1D and F).

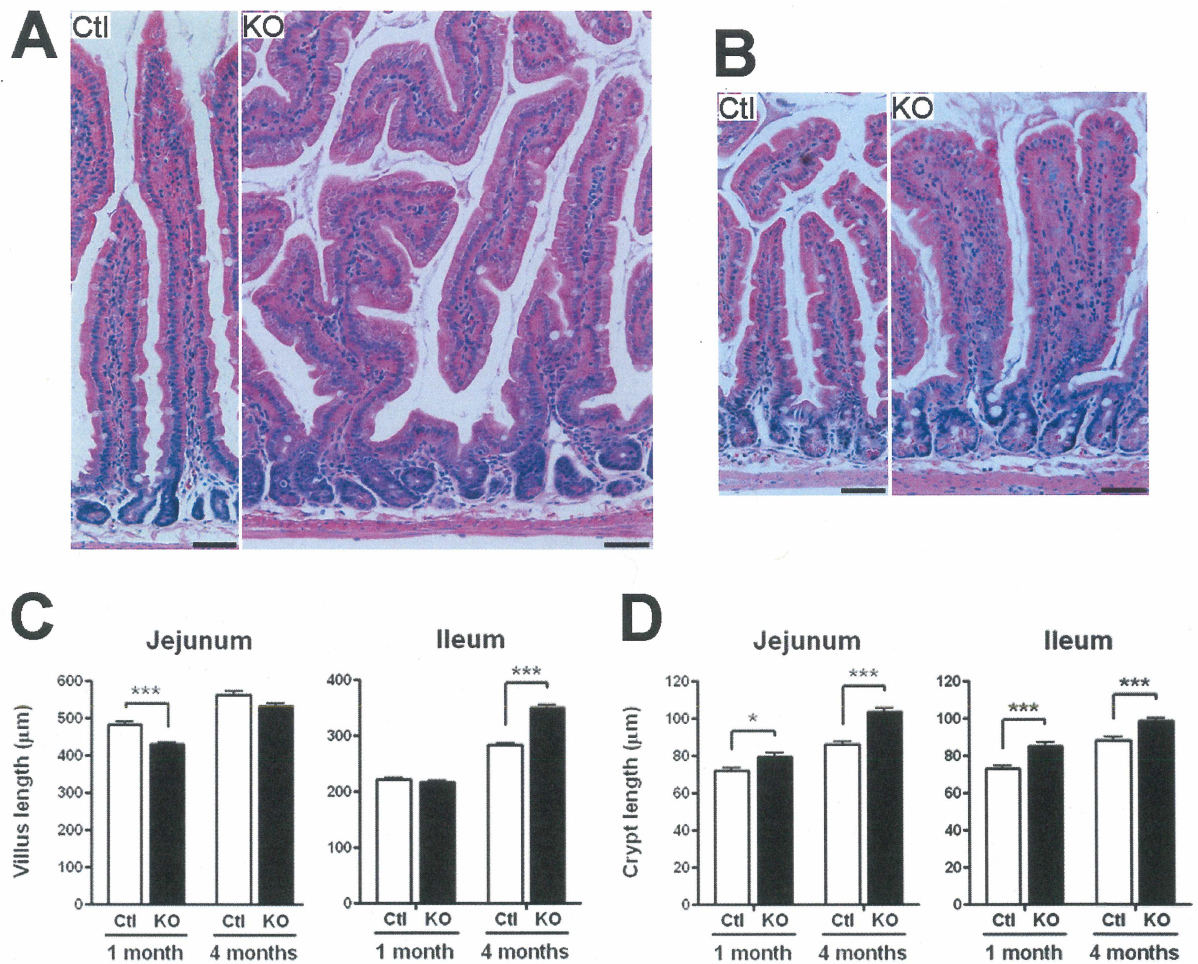




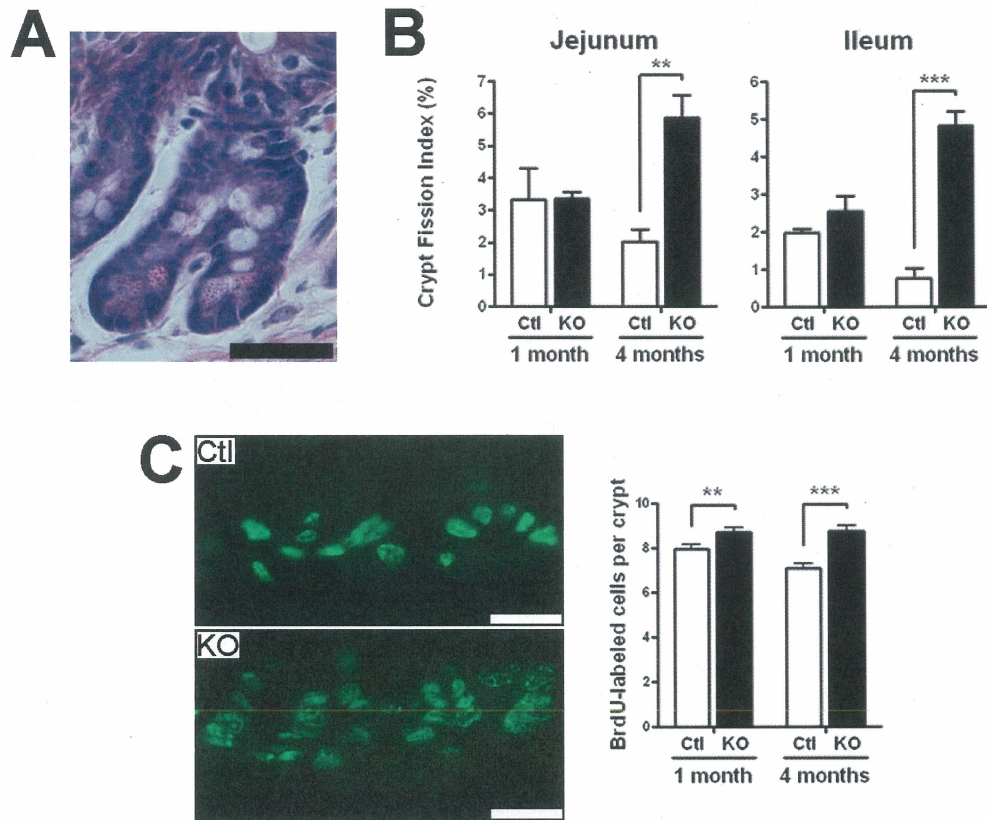
**Figure 1: *Hnf1α* null mice display intestinalomegaly:** (A) RT-PCR detection of *Hnf1α* was performed on total small intestinal RNA extracts. *β2-microglobulin* (*β2mic*) mRNA level was monitored as a housekeeping gene control. (B) Western blot analysis was performed on total small intestinal mucosa lysates with an antibody specific for the detection of *Hnf1α*. Specific detection of actin was done to control for protein integrity. (C) Photograph of representative 5-month-old control and *Hnf1α* null small intestines. Statistical analysis of 4-month-old mice small intestine (SI) relative length (D), relative weight per mm (E) and weight relative to mouse total body weight (F). n = 5-10; \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.

Hematoxylin and eosin staining of jejunum and ileum sections revealed abnormal branching of the villi in the mutant animals (Figure 2A and B, right panels), a feature that was first observed at 1 month-old to become more frequent in the adult intestinal mucosa. A significant 11% decrease of jejunum villi length was observed in 1 month-old *Hnflα* mutant mice as compared to control mice (Figure 2C, left panel). In opposition, a significant 23.6% increase of ileum villi length was observed in 4 month-old *Hnflα* mutant mice as compared to control mice (Figure 2C, right panel). Jejunum and ileum crypts length was significantly increased (10.2% at 1 month and 20.3% at 4 months for the jejunum; 16.5% at 1 month and 11.8% at 4 months for the ileum) in *Hnflα* mutant mice as compared to control mice (Figure 2D).

Increase in intestinal crypt proliferation, a process of crypt fission that occurs more frequently during the first 3 weeks of post-natal life to decline afterward<sup>21</sup>, was also observed in adult mutant mice compared with those of control littermates. The intestinal crypt fission rate, calculated as the number of dividing crypts per 200 crypts per animal (Figure 3A), was significantly up-regulated more than 2.9-fold in the jejunum and 6.5-fold in the ileum (Figure 3B) in adult *Hnflα* mutant mice as compared to controls. This rate did not reach significance in 1-month-old *Hnflα* mutant mice (Figure 3B). A minor but significant increase of the index of epithelial cell proliferation (10%,  $p < 0.01$ ) was observed in the small intestine of 1-month-old *Hnflα* mutant mice as determined by BrdU incorporation (Figure 3C). This tendency was more marked (23%,  $p < 0.0001$ ) in 4-month-old *Hnflα* mutant mice (Figure 3C).



**Figure 2: Loss of *Hnfla* results in disturbed crypt-villus architecture:** Haematoxylin and eosin stained micrographs of the jejunum (**A**) and the ileum (**B**) of 4-month-old mice. Bar = 50 $\mu\text{m}$ . Statistical analysis of villus (**C**) and crypt length (**D**) of jejunum and ileum of 1-month and 4-month-old mice.  $n = 3$ ; total of 99-120 villi and 120 crypts. \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .



**Figure 3: Loss of *Hnf1a* results in increased crypt proliferation index:** (A) Haematoxylin and eosin stained micrograph of a representative dividing crypt event. Bar = 30 $\mu$ m. (B) Statistical analysis of the percentage of dividing crypt unit (crypt proliferation index) in the jejunum and ileum of 1-month and 4-month-old mice. n = 3-4. (C) Representative immunofluorescence for BrdU performed on sections of jejunum of both control (Ctl) and *Hnf1a* null mice (KO) (left panels). Statistical analysis of the number of BrdU labeled cells in the jejunum of 1-month and 4-month-old mice. n = 3; total of 85 and 105 crypts, respectively (right panel). \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

## **The intestinal epithelial mTOR/S6K signalling pathway, but not the $\beta$ -catenin pathway, is upregulated in adult *Hnf1 $\alpha$* deleted mice**

Adult *Hnf1 $\alpha$*  mutant mice displayed a dramatic increase in intestinal crypt proliferation resulting in organomegaly. Because the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway is crucial in the regulation of gut epithelial cell proliferation<sup>1</sup>, the level of  $\beta$ -catenin activity was next compared between *Hnf1 $\alpha$*  mutant and control mice. Western blot analysis on total extracts obtained from small intestinal mucosa scrapping showed no significant modulation of total  $\beta$ -catenin between *Hnf1 $\alpha$*  mutant and control mice (Figure 4A). No change in the level of unphosphorylated active form of  $\beta$ -catenin on serine 37 was observed. We have also verified the phosphorylation status of  $\beta$ -catenin on serine 552, a process regulated by AKT and reported to promote  $\beta$ -catenin stability and nuclear localization<sup>22</sup>. The phosphorylation status of  $\beta$ -catenin at this specific amino acid residue remained unchanged between *Hnf1 $\alpha$*  mutant and controls (Figure 4A). This finding was also confirmed by immunofluorescence for which no difference in nuclear  $\beta$ -catenin labelling was observed (data not shown). The expression of the *Axin2* and stem cells expressing leucine rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 (*Lgr5*) gene transcripts, two well established targets of Wnt signalling in intestinal epithelial cells<sup>23, 24</sup>, was not affected by the loss of *Hnf1 $\alpha$*  (Figure 4B). One specific signalling pathway that regulates cell growth and metabolism is mTOR<sup>25</sup>. To investigate the activation status of the mTOR signalling pathway, the phosphorylation of S6, which is catalyzed by S6 kinase in an mTOR-dependent manner<sup>26</sup>, was monitored in the small intestinal epithelium of *Hnf1 $\alpha$*  mutant and controls mice. Western blot analysis showed that the S6 phosphorylation at Ser235/236 was elevated more than 5-fold in the small intestinal epithelium of 4 month-old *Hnf1 $\alpha$*  mutant mice as compared with control mice (Figure 4C-D). S6 phosphorylation levels was not significantly modulated in the small intestine of 1 month-old *Hnf1 $\alpha$*  mutant mice (Figure 4D) which was consistent with the

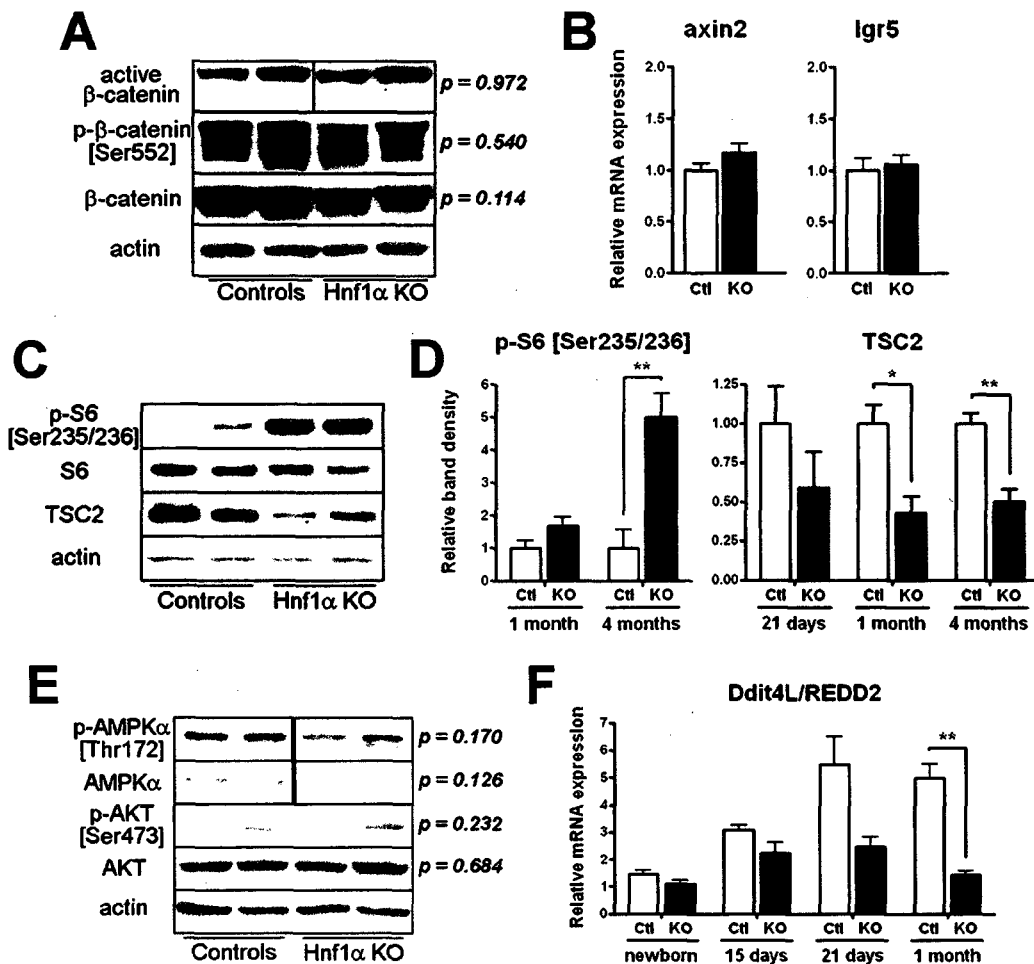


observed delay in the amplification of crypt unit proliferation during the adult life of these mutant mice (Figure 3). One crucial negative regulator of mTOR signalling is the tuberous sclerosis protein TSC2<sup>25</sup>. Although TSC2 gene transcript remained stable during post-natal development and adult life (data not shown), TSC2 protein was down modulated by 50% in the small intestinal epithelium of adult *Hnf1a* mutant mice as compared with control mice (Figure 4C-D). The PI3K/Akt and AMP-activated protein kinase (AMPK) pathways are important regulators of TSC2 protein function and stability. AMPK and AKT phosphorylation-activated status was not significantly modulated in the small intestinal epithelium of 4-month-old *Hnf1a* mutant mice as compared with control mice under our experimental conditions (Figure 4E). Another important molecular entity that inhibits mTOR signalling is the Ddit4l/REDD2 that acts downstream of Akt and upstream of TSC2 preventing the inhibitory binding of 14-3-3 to TSC2<sup>27</sup>. Since no commercial antibodies were available for Ddit4l/REDD2, total RNA was isolated from the small intestine of *Hnf1a* mutant and control mice at different time points during post-natal development. qRT-PCR analyses showed that the Ddit4l/REDD2 gene transcript was significantly increased during the suckling-weaning transition in control mice, a tendency that was abolished in the small intestine of *Hnf1a* null mice (Figure 4F).

### **The enterocyte differentiation program, mucosal barrier function and lumen-to-blood glucose delivery are altered in *Hnf1a* deleted mice**

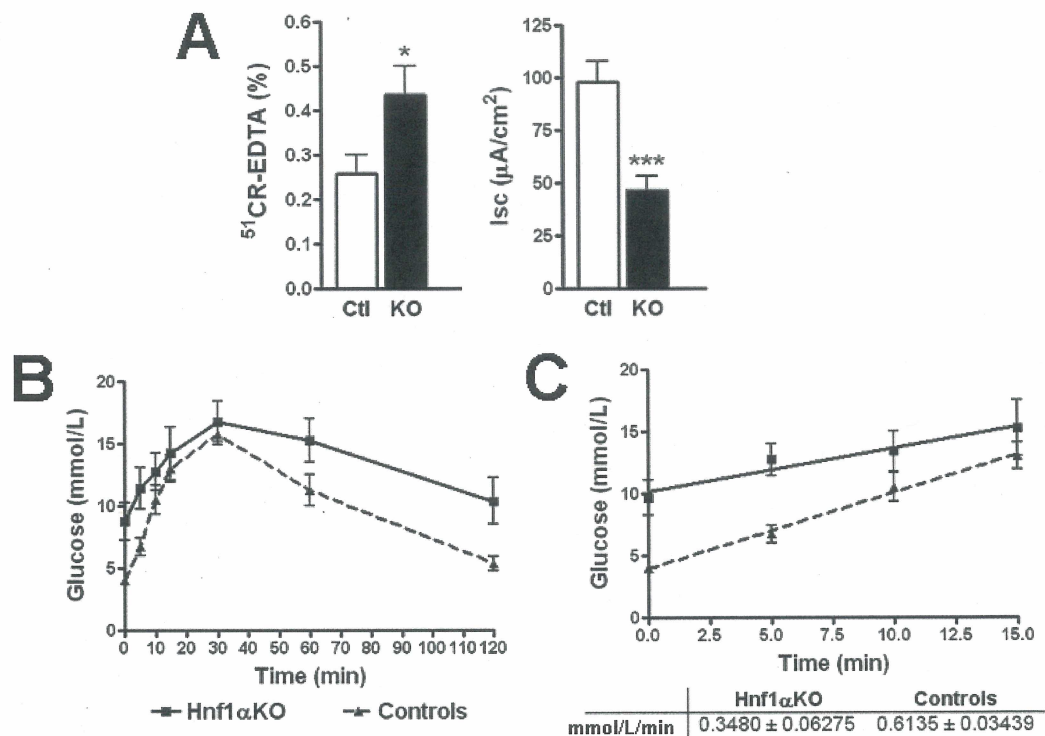
A gene expression profiling was next performed to investigate whether the loss of *Hnf1a* could have an impact on the intestinal gene network and epithelial associated functions. A statistical analysis ( $p \leq 0.05$ ) predicted 317 unique mouse transcripts to be modulated between adult control and mutant jejunum samples (differential ratio  $\geq 2.0$ , Supplementary Table 2). To gain insight into how these modifications relate to epithelial

cell functions, IPA software was utilized to categorize the down-modulated genes by biological function. This analysis identified carbohydrate metabolism, small molecule biochemistry and transport, lipid metabolism and endocrine system development as being the most important gene networks predicted to be down-modulated in the *Hnflα* mutant small intestine (Supplementary Table 3). Intestinal barrier function was next assessed by Ussing chamber technique since several genes involved in ion transport and barrier function were shown to be significantly altered in *Hnflα* mutant. Adult *Hnflα* mutant mice showed a significant 69% increase in small intestinal paracellular permeability to <sup>51</sup>Cr-EDTA as compared to controls (Figure 5A, left panel). In addition, baseline  $I_{sc}$  was decreased more than 52% in the small intestine of adult *Hnflα* null mice as compared to controls demonstrating that a decrease in active epithelial ion transport was also taking place in these animals (Figure 5A, right panel). Decrease in intestinal mucosal ion transport can impact on lumen-to-blood glucose transport<sup>28</sup>. In addition, *Hnflα* null mice displayed an important down-regulation of G6PC and glucose-6-phosphate transporters (Supplementary Table 3), both direct targets for *Hnflα* transcriptional action<sup>29, 30</sup>. In order to test whether intestinal epithelial cells were affected in their capacity to deliver blood glucose from intestinal luminal content, we undertook standardized oral administration of D-glucose in overnight fasted *Hnflα* mutant and control mice. As previously reported<sup>13</sup>, the basal blood glucose concentration was significantly higher in *Hnflα* mutant as compared to control mice (Figure 5B). Blood glucose levels peaked at 15-30 min after glucose administration and thereafter declined in both *Hnflα* mutant and control mice (Figure 5B). However, the rate of plasma glucose delivery during the first 15 min following gastric glucose administration was significantly lowered by more than 43.3% in *Hnflα* mutant when compared to control mice (Figure 5C).



**Figure 4: *Hnf1α* null mice display an increase in mTOR signalling:** (A) Total protein extracts of 4-month-old mice were analyzed by Western blot for the detection of the active form of β-catenin dephosphorylated on Ser37 or Thr41, the active form of β-catenin phosphorylated on Ser552 and the total β-catenin. Band densities relative to the actin level were calculated for each sample and expression variation was statistically validated.  $n = 4$ . (B) qRT-PCR analysis of *axin2* and *lgr5* was performed on total RNA extracts from 4-month-old mice.  $n = 5-10$ . (C) Total protein extracts of 4-month-old mice were analyzed by Western blot for the detection of S6 ribosomal protein phosphorylated on serine 235/236, total S6 and total tuberous sclerosis 2 (TSC2). Specific detection of actin was done to control for protein integrity. (D) Total protein extracts were analyzed by Western blot for the detection of S6 ribosomal protein phosphorylated on serine 235/236 and total TSC2. Band densities relative to the actin level were calculated for each sample and expression variation was statistically validated.  $n = 3-6$ . (E) Total protein extracts of 4-month-old mice were analyzed by Western blot for the detection of total and activated forms of AMPKα and AKT. Band densities relative to the actin level were calculated for each sample and expression variation was statistically validated.  $n = 4-7$ . (F) qRT-PCR analysis of *Ddit4L/Redd2* was performed on total RNA extracts at different time points during post-natal development.  $n = 5-10$  per time point. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .



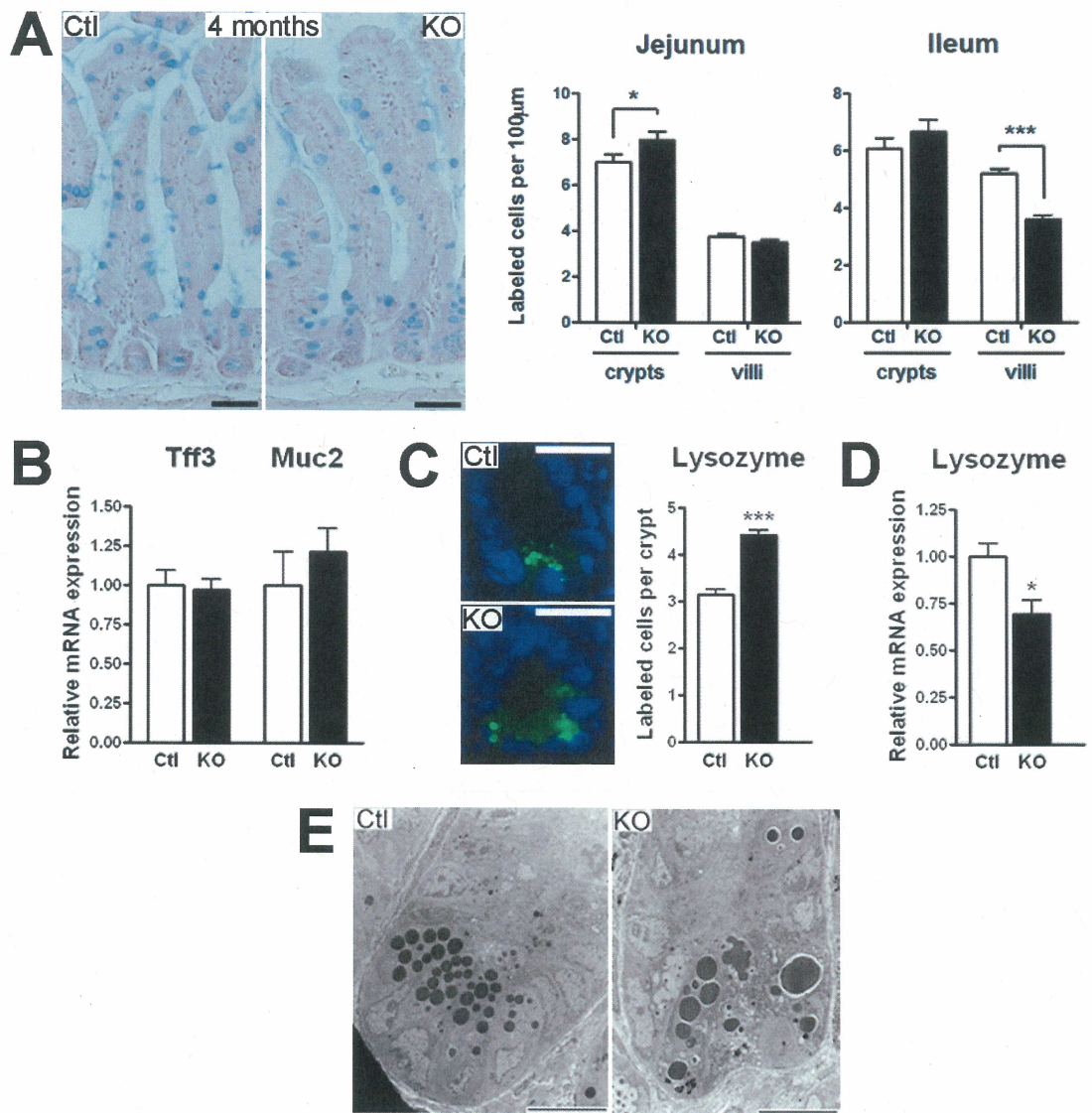


**Figure 5: Barrier functions and glucose transport are deregulated in the *Hnf1 $\alpha$*  mutant intestine:** (A) Statistical analysis of small intestinal permeability for  $^{51}\text{CR-EDTA}$  and ion transport as measured by short circuit current ( $I_{sc}$ ).  $n = 5-6$ . (B) Glucose plasma concentration at 0 (before) and 5, 10, 15, 30, 60, and 120 min after administration of glucose through gastric gavage.  $n = 6-8$ . (C) Linear regression analysis of glucose plasma concentration between 0 and 15 min. \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

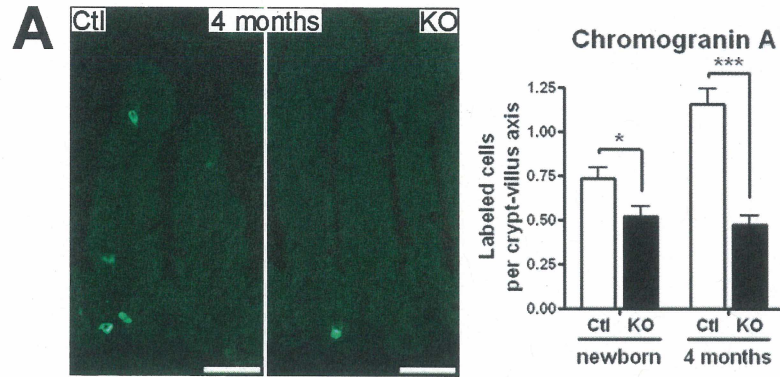
### The Paneth and enteroendocrine cell lineages are deregulated in *Hnf1 $\alpha$* deleted mice.

The effect of *Hnf1 $\alpha$*  deletion on the maturation of intestinal epithelial secretory cell lineages was next monitored. The number of goblet cells was first compared between *Hnf1 $\alpha$*  mutant and control mice by alcian blue staining. The relative number of goblet cells per length units was modestly but significantly increased in the jejunum crypts of *Hnf1 $\alpha$*  mutant mice and significantly decreased in the ileum villi of the same individuals (Figure 6A). However, these subtle modifications did not impact on overall gene transcript expression of goblet cell markers as revealed by qRT-PCR analyses of trefoil factor 3 and mucin 2

transcripts expression (Figure 6B). Although lysozyme staining of the Paneth cells was consistently more diffused in *Hnfla* mutant crypts, a significant 40.5% increase in the number of positive cells per crypt was denoted in the *Hnfla* mutant mice as compared to control mice (Figure 6C, right panel). qRT-PCR analyses showed a significant 30.6% reduction in the expression of lysozyme transcript in the *Hnfla* mutant mice as compared to control mice (Figure 6D). Electron micrograph of Paneth cells confirmed abnormal cellular morphology with aberrant and disorganized granules in the *Hnfla* mutant mice (Figure 6E). Thus, the number of Paneth cells was increased but these cells were less mature in *Hnfla* mutant mice. The number of chromogranin A positive enteroendocrine cells per villus was significantly decreased in newborn (29%) and adult (59%) mutant mice as compared to control mice (Figure 7A). The analysis of several targets associated with enteroendocrine differentiation revealed significant modulations of chromogranin A (Chga), somatostatin (Sst), gastric inhibitory polypeptide (Gip), Ghrelin (Ghrl) and Pax6 gene transcripts expression (Figure 7B). Overall, these observations indicated that loss of *Hnfla* had a significant impact on terminal differentiation of multiple intestinal epithelial cell lineages.



**Figure 6: Loss of *Hnfla* leads to deregulation of Paneth cells homeostasis:** (A) Jejunum and ileum tissue sections were used to perform alcian blue staining. Representative micrographs and statistical analyses of the number of positive labeled-cells per length units of crypts and villi.  $n = 3$ ; total of 75 villi and 60 crypts. Bar =  $50\mu\text{m}$  (B) Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis of trefoil factor 3 (Tff3) and mucin 2 (Muc2) was performed on total RNA extracts from 4-month-old mice.  $n = 5-10$ . (C) Lysozyme immunodetection was performed on ileum tissue sections of 4-month-old mice. Nuclei were stained in blue with Dapi. Representative micrographs and statistical analyses of the number of positive cells per crypt.  $n = 3-4$ ; average of 35 crypts per animal. Bar =  $20\mu\text{m}$  (D) qRT-PCR analysis of lysozyme was performed on total RNA extracts from 4-month-old mice.  $n = 5-10$ . (E) Electron microscopic analysis of 4-month-old mice ileum sections. Bar =  $10\mu\text{m}$ . \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$



**B**

Gene	controls	Hnf1 $\alpha$ KO
<i>Neurog3</i>	1.00 +/- 0.04	1.00 +/- 0.11
<i>Neurod1</i>	1.00 +/- 0.15	0.95 +/- 0.16
<i>Pax6</i>	1.00 +/- 0.12	0.73 +/- 0.06 *
<i>Chga</i>	1.00 +/- 0.01	0.82 +/- 0.08 *
<i>Sst</i>	1.00 +/- 0.14	0.52 +/- 0.05 **
<i>Gip</i>	1.00 +/- 0.17	0.51 +/- 0.07 **
<i>GLP1</i>	1.00 +/- 0.12	0.83 +/- 0.09
<i>Ghrl</i>	1.00 +/- 0.19	4.13 +/- 0.54 **

**Figure 7: Loss of *Hnf1 $\alpha$*  leads to deregulation of enteroendocrine cell production: (A)** Chromogranin A immunodetection was performed on ileum tissue sections. Representative micrographs and statistical analyses of the number of positive labeled-cells per crypt-villus axis. n = 3-4; average of 40 crypt-villus axis per mouse. **(B)** qRT-PCR analysis performed on total RNA extracts from 4-month-old mice (means +/- SEM). n = 5-10. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

## DISCUSSION

Although *Hnfl* $\alpha$  was demonstrated to regulate several intestinal epithelial specific genes *in vitro*, the general assumption was that *Hnfl* $\alpha$  loss of function did not significantly influence intestinal homeostasis<sup>8,31</sup>. Our analysis demonstrates a fundamental role for *Hnfl* $\alpha$  in regulating adult intestinal epithelium functions including enterocyte barrier and metabolic functions, enteroendocrine cell specification and Paneth cell maturation. Recent findings suggest that *Hnfl* $\alpha$  and *Hnfl* $\beta$  were both needed to be inactivated in order to significantly affect intestinal epithelial functions<sup>8</sup>. We provide here the important conclusion that abrogation of *Hnfl* $\alpha$  alone is important to maintain intestinal epithelium basic functions during adulthood. One possible explanation for our divergent conclusions is that these authors restrained their analyses to young adult mice at a moment when the defects noted in our analysis are just in the beginning process of being manifested.

During post-natal intestinal growth, most new crypts will emerge from a process of crypt fission that is highly active in a short postnatal period to decline drastically after weaning<sup>32</sup>. The manifestation of this phenotype correlates well with the profile of *Hnfl* $\alpha$  protein distribution during post-natal development. Indeed, *Hnfl* $\alpha$  protein expression is shut down during early intestinal post-natal development to become reexpressed at the suckling-weaning transition<sup>15,31</sup>. Thus, *Hnfl* $\alpha$  down-modulation during early post-natal intestinal development could result in a molecular cascade that no longer restricts intestinal crypt proliferation and tissue growth, a process that is overly persisting in adult *Hnfl* $\alpha$  mutant mice. One important component that governs intestinal crypt proliferation is the APC/ $\beta$ -catenin pathway<sup>21</sup>. Loss of *Hnfl* $\alpha$  function did not influence intestinal epithelial  $\beta$ -catenin activity based on  $\beta$ -catenin phosphorylation status, nuclear localization and expression assessments of direct  $\beta$ -catenin dependent transcriptional targets. The mTOR signalling

pathway, whose activation has been functionally linked to the development of many cancers including colonic adenomas<sup>33</sup>, was found to be up-regulated in *Hnflα* null intestinal epithelium and could be responsible for the amplification of crypt proliferation and intestinal growth.

We have recently reported that deletion of intestinal epithelial *Pten* led to intestinalomegaly<sup>19</sup>, an observation that was consistent to what seen in many other organs<sup>34</sup>. In addition, branching of villi and multiplication of crypts units were similarly observed in absence of epithelial *Pten*<sup>19</sup>. It has been well described that *Pten*, through inactivation of *Akt*, can negatively control translation mechanisms through its regulation of mTOR/S6K signalling, thus influencing cell growth and protein synthesis<sup>26</sup>. Our data highlight the sustained activation of the mTOR signalling pathway in the intestinal epithelium of *Hnflα* mutant mice correlating with the activation of a subset of genes involved in translational regulation (Supplementary Table 4). However, the mTOR interacting components influenced by the loss of *Hnflα* are more likely to be independent of *Pten* signalling since *Akt* remained unchanged in the intestinal epithelium of *Hnflα* null and control mice. AMPK, an energy sensor kinase that directly phosphorylates *TSC2* to promote its activity for inhibition of mTOR<sup>35</sup>, was not significantly altered in the intestinal mucosa of *Hnflα* mutant mice under our experimental conditions. *Ddit4l/REDD2* induction of expression was observed in the small intestine during the suckling-weaning transition in normal mice, a process that was inhibited in *Hnflα* null mice. However, it remains unclear whether *Ddit4l/REDD2* is directly targeted by *Hnflα* during this transition.

Similar analogies can be made between our observations and the megaintestine phenotype that was reported to occur in claudin-15 deficient mice<sup>36</sup>. The lack of claudin-15 was shown to decrease paracellular ion conductance in gut epithelial cells resulting in hyperproliferation<sup>36</sup>, fluid accumulation and the formation of multiple lumens in the



zebrafish gut<sup>37</sup>. Although claudin-15 gene transcript was not found to be modulated in the jejunum of *Hnflα* null mice (Supplementary Table 2), the findings that electric conductance and several solute carrier transporter genes were significantly impaired in the intestine of *Hnflα* null mice are common to the claudin-15 null mice phenotype and thus could contribute to the increase in epithelial cell proliferation and the manifestation of the megaintestine phenotype as observed in our mouse model.

Total body energy homeostasis is importantly challenged in *Hnflα* mutant mice<sup>38 11</sup>  
<sup>13</sup>. We found an important number of direct *Hnflα* gene targets related to carbohydrate and lipid metabolism to be down modulated in the intestinal epithelium of adult *Hnflα* mutant mice. The small intestine is the primary organ for lipids and glucose uptake, nutrients processing and then delivery to the circulating system. A defect in the expression of several lipids and glucose transporters as well as intestinal lumen-to-blood glucose delivery from epithelial cells could suggest an alteration in nutrient absorption that might also contribute to the wasting syndrome driven by the loss of *Hnflα*<sup>11</sup>.

Loss of *Hnflα* impacts on the production of chromogranin A positive cells already at birth implicating a novel and direct role for this regulator in the differentiation of this cell lineage. Since Neurogenin 3 and NeuroD1 expression was not significantly modulated in the intestine of *Hnflα* mutant mice, *Hnflα* must act downstream of Neurogenin 3 and furthermore, independently of NeuroD1, to influence differentiation of chromogranin A cell subtypes. Paneth cells are crucial entities to protect the gut epithelium from bacterial invasions. A strong phenotypic parallel can be made with altered Paneth cell maturation that we observed in *Hnflα* null mice and Paneth cell defect that occurs in mice deficient for the autophagy gene *Atg16l1*<sup>39, 40</sup>. ATG16L1-deficient Paneth cells exhibited abnormalities in the granule exocytosis pathway, a feature that was common to Crohn's disease patients that were homozygous for the *ATG16L1* disease risk allele. ATG1 kinase plays a pivotal role in

the positive control of autophagy<sup>41</sup>. mTOR activation blocks ATG1 kinase activity resulting in inhibition of autophagy<sup>42</sup>. These phenotypic similarities suggest that Hnfl $\alpha$  could be functionally linked to molecular components that participate to the regulation of autophagy.

In summary, we have identified Hnfl $\alpha$  as a critical regulator of adult intestinal epithelial cell basic functions. We also showed that Hnfl $\alpha$  was potent to regulate intestinal epithelium growth in restricting activation of the mTOR signalling pathway specifically during the post-weaning period. These observations imply a critical and unsuspected role for Hnfl $\alpha$  in adult intestinal maintenance.



## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Ying-Hue Lee (Institute of Molecular Biology, Taiwan) for providing the *Hnfl $\alpha$*  knockout mouse model, Denis Martel and Charles Bertrand for assistance in electron microscopy procedures, and the Microarray Platform Lab from McGill University and Génome Québec Innovation Centre for generation of the cDNA arrays. We thank Ms. Jennifer Jury for her technical expertise in intestinal permeability measurements.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Supplementary Table 1. Antibodies**

Antibody name	Species	Company	Number
BrdU-fluorescein	mouse	Roche Applied Science	11202693001
Lysozyme	rabbit	Dako	N1515
Chromogranin A	rabbit	Immunostar	20085
HNF1 $\alpha$	goat	Santa Cruz Biotechnology	SC-6547
Actin	goat	Santa Cruz Biotechnology	SC-1615
phospho-AMPK $\alpha$ Thr172	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	SC-33524
phospho- $\beta$ -catenin Ser552	rabbit	Cell Signaling	9566
S6 ribosomal protein	rabbit	Cell Signaling	2217
phospho-S6 ribosomal protein Ser235/236	rabbit	Cell Signaling	4858
Tuberin/TSC2	rabbit	Cell Signaling	3612
AMPK $\alpha$	rabbit	Cell Signaling	2532
AKT	rabbit	Cell Signaling	9272
phospho-AKT Ser473	rabbit	Cell Signaling	9271
active- $\beta$ -catenin dephosphorylated on Ser37 or Thr41	mouse	Millipore	05-665
$\beta$ -catenin	mouse	BD Biosciences	610154

**Supplementary Table 2. Genes that display a modulation of their expression of 2 fold or more ( $p \leq 0.05$ ).**

<b>Up-regulated</b>			
Gene Title	Gene Symbol	Fold change	P-value
2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1	Oasl1	2.19	4.47E-05
abhydrolase domain containing 3	Abhd3	2.45	1.47E-04
actin, alpha 1, skeletal muscle	Acta1	2.15	5.43E-03
acyl-CoA thioesterase 12	Acot12	2.53	8.77E-06
adenylosuccinate lyase 1	Adsl	2.08	2.83E-03
aldo-keto reductase family 1, member B8	Akr1b8	4.99	1.27E-04
aldo-keto reductase family 1, member C14	Akr1c14	3.13	5.43E-03
aldolase 3, C isoform	Aldoc	2.72	6.73E-06
amphiregulin	Areg	4.10	1.46E-02
ankyrin repeat domain 37	Ankrd37	2.91	1.84E-03
ankyrin repeat domain 56	Ankrd56	2.75	9.29E-05
arginase 1, liver	Arg1	2.01	4.28E-02
Arrestin domain containing 3	Arrdc3	3.01	4.35E-02
asparagine synthetase	Asns	2.45	3.51E-04
ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	Abca1	2.14	5.93E-04
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	Abcb1a	4.34	6.68E-06
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	Abcc3	2.74	7.72E-06
camello-like 5	Cml5	3.56	1.21E-04
carbonic anhydrase 13	Car13	2.89	2.91E-04
carboxylesterase 6	Ces6	2.99	3.83E-05
CD38 antigen	Cd38	4.18	6.38E-08
chemokine (C-C motif) ligand 20	Ccl20	2.29	3.57E-02
chemokine (C-C motif) ligand 28	Ccl28	2.80	2.73E-05
cysteine-rich hydrophobic domain 1	Chic1	2.42	4.99E-03
cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 4	Cyp2a4	6.03	1.39E-02
cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 10	Cyp2d10	3.25	3.30E-03
cytochrome P450, family 2, subfamily j, polypeptide 13	Cyp2j13	2.20	9.10E-03
cytochrome P450, family 2, subfamily u, polypeptide 1	Cyp2u1	2.15	2.29E-04
cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13	Cyp3a13	2.84	9.64E-07
cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 16	Cyp4f16	3.62	2.81E-04
cytochrome P450, family 51	Cyp51	2.77	8.71E-05
D site albumin promoter binding protein	Dbp	2.20	1.08E-04
D-amino acid oxidase 1	Dao1	3.12	6.17E-04
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 56	Ddx56	2.49	1.23E-05
defensin related cryptdin, related sequence 12	Defcr-rs12	6.05	2.20E-03
defensin related cryptdin, related sequence 2	Defcr-rs2	4.59	2.19E-02
defensin related cryptdin, related sequence 7	Defcr-rs7	5.45	2.13E-02

dentin matrix protein 1	Dmp1	2.66	1.40E-02
diacylglycerol kinase, delta	Dgkd	2.05	1.48E-03
DNA segment, Chr 17, human D6S56E 5	D17H6S56E-5	2.49	7.67E-04
DNA-damage-inducible transcript 4	Ddit4	2.30	5.88E-04
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 3	Dnajb3	2.05	4.81E-03
dynamitin 1-like	Dnm11	2.48	1.94E-02
EGL nine homolog 3 (C. elegans)	Egln3	2.15	3.77E-03
endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor 7	Edg7	3.68	1.00E-05
epoxide hydrolase 1, microsomal	Ephx1	2.46	6.86E-03
farnesyl diphosphate synthetase	Fdps	2.07	5.95E-03
fatty acid binding protein 6, ileal (gastrotropin)	Fabp6	6.54	1.21E-02
fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	Flrt2	4.07	8.28E-04
forkhead box A1	Foxa1	2.03	1.46E-05
G protein-coupled receptor 108	Gpr108	2.37	1.54E-06
gastric intrinsic factor	Gif	5.76	5.43E-04
ghrelin	Ghrl	3.93	3.83E-05
glia maturation factor, beta	Gmfb	2.08	2.92E-03
glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type	Gcnt3	2.24	1.87E-06
glutathione S-transferase, alpha 1 (Ya)	Gsta1	4.09	5.46E-03
glutathione S-transferase, alpha 4	Gsta4	2.81	2.69E-03
glutathione S-transferase, mu 3	Gstm3	2.80	4.44E-04
haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 3	Hdhd3	3.02	1.62E-04
heat shock protein 1A	Hspa1a	2.77	6.18E-03
heat shock protein 1B	Hspa1b	2.46	1.25E-02
heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1	Hs3st1	2.41	4.52E-06
histocompatibility 2, Q region locus 10	H2-Q10	2.28	1.99E-02
histone cluster 3, H2a	Hist3h2a	2.29	9.55E-04
HLA-B-associated transcript 1A	Bat1a	3.05	2.48E-03
hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM)	Hmmr	2.03	6.52E-04
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13	Hsd17b13	31.16	2.40E-07
Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide)	Ighg	2.20	9.39E-03
Immunoglobulin kappa chain variable 1 (V1)	Igk-V1	3.31	9.83E-03
isopentenyl-diphosphate delta isomerase	Idi1	2.04	3.87E-03
kalirin, RhoGEF kinase	Kalrn	2.41	2.85E-04
lactamase, beta 2	Lactb2	2.15	2.53E-04
mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme C (putative)	Mgat4c	4.92	2.91E-04
membrane targeting (tandem) C2 domain containing 1	Mtac2d1	2.35	1.09E-03
methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NAD+ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	Mthfd2	2.44	4.72E-03
MOCO sulphurase C-terminal domain containing 1	Mosc1	2.51	2.91E-03
NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	Nqo1	2.34	1.32E-03

open reading frame 9	ORF9	2.35	2.98E-04
otopetrin 3	Otop3	2.95	2.04E-03
paired related homeobox 1	Prrx1	2.01	2.18E-04
palmitoyl-protein thioesterase 1	Ppt1	2.48	1.26E-05
period homolog 1 (Drosophila)	Per1	2.06	1.57E-03
period homolog 2 (Drosophila)	Per2	2.75	2.70E-04
peroxisome proliferator activated receptor gamma	Pparg	2.58	7.61E-03
phospholipase A2, group V	Pla2g5	3.80	7.62E-04
phosphoserine aminotransferase 1	Psat1	3.01	1.11E-03
pipecolic acid oxidase	Pipox	2.72	6.65E-05
pirin	Pir	3.20	3.92E-05
pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) member 1	Plekhhl1	2.11	2.07E-02
protease, serine, 12 neurotrypsin (motopsin)	Prss12	2.38	1.04E-04
PTK6 protein tyrosine kinase 6	Ptk6	2.42	3.09E-04
RAB37, member of RAS oncogene family	Rab37	3.26	1.95E-03
regenerating islet-derived 3 gamma	Reg3g	2.24	2.84E-03
rhomboid, veinlet-like 2 (Drosophila)	Rhbdl2	2.23	1.83E-03
Rho-related BTB domain containing 3	Rhobtb3	2.90	1.33E-05
ribosomal protein L21	Rpl21	2.07	1.67E-04
serum amyloid A 1	Saa1	2.76	9.99E-05
similar to inward rectifier potassium channel Kir7.1		2.06	7.27E-03
six transmembrane epithelial antigen of prostate 2	Steap2	2.35	1.11E-04
six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	Steap1	4.96	6.78E-06
solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 6	Slc16a6	2.06	1.08E-02
solute carrier family 19 (sodium/hydrogen exchanger), member 3	Slc19a3	4.65	3.58E-07
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Aralar), member 12	Slc25a12	2.59	1.02E-05
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	Slc7a1	2.02	9.67E-04
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	Slc7a5	2.16	1.15E-03
squalene epoxidase	Sqle	2.69	5.90E-04
suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	2.40	5.51E-03
synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	Syncrip	2.06	4.77E-05
thioredoxin interacting protein	Txnip	2.65	5.06E-03
transcription factor 23	Tcf23	2.02	9.14E-04
transferrin receptor	Tfrc	3.33	5.65E-04
transmembrane phosphoinositide 3-phosphatase and tensin homolog 2	Tpte2	2.19	1.60E-04
transmembrane protein 116	Tmem116	2.49	6.47E-04
tripartite motif protein 16	Trim16	2.18	1.56E-05
ubiquitin D	Ubd	4.03	4.85E-02
ubiquitin specific peptidase 12	Usp12	2.03	2.09E-03
ubiquitin specific peptidase 2	Usp2	2.56	4.70E-05
WD repeat domain 18	Wdr18	2.57	1.18E-03

X-linked myotubular myopathy gene 1	Mtm1	2.39	3.20E-04
zinc finger protein 33B	Zfp33b	2.55	3.40E-05
zinc finger protein 711	Zfp711	2.03	4.39E-04

---

### Down-regulated

---

Gene Title	Gene Symbol	Fold change	P-value
2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	Cnp	0.46	9.47E-06
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	Hmgcs2	0.44	4.60E-03
5' nucleotidase, ecto	Nt5e	0.13	2.25E-04
acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	Acsl3	0.48	3.31E-05
adrenergic receptor, alpha 2a	Adra2a	0.46	5.91E-03
alanyl (membrane) aminopeptidase	Anpep	0.49	8.01E-05
aldo-keto reductase family 1, member C12	Akr1c12	0.05	1.17E-07
aldo-keto reductase family 1, member C13	Akr1c13	0.04	2.68E-06
aldo-keto reductase family 1, member C19	Akr1c19	0.13	1.81E-03
alpha fetoprotein	Afp	0.01	5.16E-09
amnionless	Amn	0.12	6.17E-08
amphiphysin	Amph	0.44	3.43E-03
amyloid beta (A4) precursor-like protein 1	Aplp1	0.21	2.93E-04
ankyrin 3, epithelial	Ank3	0.48	9.78E-04
annexin A13	Anxa13	0.30	5.78E-06
anterior gradient homolog 3 ( <i>Xenopus laevis</i> )	Agr3	0.43	2.57E-03
apolipoprotein A-IV	Apoa4	0.43	1.29E-03
apolipoprotein C-II	Apoc2	0.24	3.09E-06
aquaporin 1	Aqp1	0.30	3.11E-06
aquaporin 7	Aqp7	0.29	9.37E-06
arginase type II	Arg2	0.43	3.32E-07
arylacetamide deacetylase (esterase)	Aadac	0.05	1.67E-06
ataxin 1	Atxn1	0.21	1.71E-02
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8	Abcg8	0.28	2.05E-06
B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	Bcl11a	0.50	2.99E-02
Bcl-2-related ovarian killer protein	Bok	0.43	4.62E-03
blocked early in transport 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	Bet1	0.49	2.48E-06
bone morphogenetic protein 8a	Bmp8a	0.44	3.43E-03
camello-like 1	Cml1	0.36	4.48E-05
carboxypeptidase B2 (plasma)	Cpb2	0.22	2.31E-04
carboxypeptidase M	Cpm	0.44	7.37E-05
catalase	Cat	0.49	2.61E-04
cathepsin C	Ctsc	0.34	1.66E-04
chemokine (C-C motif) ligand 24	Ccl24	0.48	9.31E-05
Chemokine (C-C motif) receptor 9	Ccr9	0.25	4.99E-06

chloride channel calcium activated 3	Clca3	0.46	3.57E-04
chloride intracellular channel 6	Clic6	0.48	1.40E-03
choline kinase alpha	Chka	0.48	1.84E-05
c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	Mertk	0.47	4.72E-04
complement component 4 binding protein	C4bp	0.35	3.33E-04
creatine kinase, brain	Ckb	0.24	1.40E-03
crystallin, zeta	Cryz	0.48	1.38E-02
CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like	Ctdspl	0.25	6.60E-06
cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	Cubn	0.23	4.15E-04
cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 55	Cyp2c55	0.16	7.63E-06
cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 688	Cyp2c68	0.06	5.60E-08
cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 26	Cyp2d26	0.21	2.59E-05
cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 11	Cyp3a11	0.22	1.43E-03
cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 25	Cyp3a25	0.23	3.37E-05
cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 41A	Cyp3a41a	0.48	1.46E-03
DEP domain containing 6	Depdc6	0.47	1.55E-02
dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	Ddah1	0.32	6.06E-05
dipeptidase 1 (renal)	Dpep1	0.18	2.82E-05
dipeptidylpeptidase 4	Dpp4	0.35	9.15E-06
disabled homolog 1 (Drosophila)	Dab1	0.48	8.37E-05
dopa decarboxylase	Ddc	0.06	1.11E-06
endothelin 1	Edn1	0.36	3.67E-04
esterase 1	Es1	0.46	5.14E-04
estrogen-related receptor gamma	Esrrg	0.45	2.80E-03
eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	Eef1a2	0.44	1.21E-05
exophilin 5	Exph5	0.34	7.41E-06
fatty acid binding protein 1, liver	Fabp1	0.06	1.68E-07
Fc receptor, IgG, alpha chain transporter	Fcgrt	0.19	2.95E-05
FERM, RhoGEF and pleckstrin domain protein 2	Farp2	0.33	1.57E-06
fibroblast growth factor 1	Fgfl	0.34	1.78E-06
flavin containing monooxygenase 5	Fmo5	0.47	2.84E-04
Fraser syndrome 1 homolog (human)	Fras1	0.28	9.07E-05
G protein-coupled receptor 39	Gpr39	0.44	4.06E-04
gamma-glutamyltransferase 1	Ggt1	0.06	2.58E-05
gap junction membrane channel protein beta 1	Gjb1	0.42	9.13E-06
gene model 566, (NCBI)	Gm566	0.31	2.19E-02
glucose-6-phosphatase, catalytic	G6pc	0.32	1.65E-04
glutamate dehydrogenase 1	Glud1	0.21	2.24E-08
glutathione S-transferase, theta 1	Gstt1	0.30	4.56E-04
glycerol kinase	Gyk	0.48	6.65E-04
golgi integral membrane protein 4	Golim4	0.45	1.16E-04
golgi transport 1 homolog A (S. cerevisiae)	Golt1a	0.11	2.38E-07

growth arrest specific 6	Gas6	0.45	7.88E-03
growth factor receptor bound protein 14	Grb14	0.38	5.78E-03
growth factor receptor bound protein 7	Grb7	0.48	9.44E-06
guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	Gng11	0.39	7.11E-06
guanylate cyclase activator 2a (guanylin)	Guca2a	0.09	2.35E-05
guanylate cyclase activator 2b (retina)	Guca2b	0.04	4.47E-07
H2A histone family, member V	H2afv	0.41	7.63E-06
hepatocyte growth factor activator	Hgfac	0.38	1.49E-04
huntingtin interacting protein 1 related	Hip1r	0.41	3.04E-06
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13	Hsd17b13	0.49	3.59E-02
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6	Hsd17b6	0.08	2.40E-09
inositol hexaphosphate kinase 2	Ihpk2	0.47	4.24E-05
insulin-like growth factor binding protein 3	Igfbp3	0.41	7.07E-03
interleukin 15	Il15	0.49	1.05E-04
islet amyloid polypeptide	Iapp	0.42	1.85E-03
lactase	Lct	0.13	1.46E-04
lactate dehydrogenase B	Ldhb	0.44	2.04E-02
leukocyte cell-derived chemotaxin 2	Lect2	0.37	8.05E-04
lipin 2	Lpin2	0.47	1.60E-05
major facilitator superfamily domain containing 2	Mfsd2	0.47	2.72E-04
similar to NADP-dependent malic enzyme (NADP-ME) (Malic enzyme 1)	Mod1	0.47	2.66E-04
mannose binding lectin (C)	Mbl2	0.15	2.35E-03
mast cell protease 1	Mcpt1	0.38	2.00E-02
mast cell protease 2	Mcpt2	0.41	1.01E-02
meprin 1 alpha	Mep1a	0.21	9.13E-06
metaxin 3	Mtx3	0.46	5.20E-06
metaxin 3	Mtx3	0.44	2.12E-04
methyltransferase like 7A	Mettl7a	0.35	3.57E-06
mitochondrial carrier homolog 2 (C. elegans)	Mtch2	0.43	5.11E-03
mucolipin 3	Mcoln3	0.41	1.10E-03
myeloid ecotropic viral integration site-related gene 1	Mrg1	0.48	5.77E-03
myotubularin related protein 11	Mtmr11	0.03	1.96E-10
N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 1	Naalad11	0.28	7.45E-05
NLR family, apoptosis inhibitory protein 5	Naip5	0.33	1.57E-03
N-myc downstream regulated gene 1	Ndrg1	0.15	1.91E-06
nuclear factor, interleukin 3, regulated	Nfil3	0.37	3.10E-03
organic solute transporter beta	Ostb	0.22	5.40E-06
oxysterol binding protein-like 1A	Osbpl1a	0.21	2.60E-05
oxysterol binding protein-like 3	Osbpl3	0.47	6.02E-06
paired box gene 8	Pax8	0.34	4.77E-05
PDZ domain containing 3	Pdzd3	0.33	2.17E-07
phenazine biosynthesis-like protein domain containing	Pbld	0.34	6.81E-04



phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 2	Plcxd2	0.37	5.81E-06
phosphodiesterase 7A	Pde7a	0.49	9.99E-04
phospholipase B1	Plb1	0.27	4.88E-02
Phospholipid scramblase 1	Plscr1	0.45	2.23E-03
pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein	Pscdbp	0.20	4.88E-06
predicted gene, EG226654	EG226654	0.42	4.34E-05
predicted gene, EG622976	EG622976	0.46	1.03E-03
prolactin receptor	Prlr	0.18	2.26E-08
pterin 4 alpha carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1) 1	Pcbd1	0.46	8.23E-05
purine-nucleoside phosphorylase	Pnp	0.49	6.69E-05
pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	Pdk4	0.38	2.46E-03
Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2	Ralgps2	0.49	1.30E-06
regenerating islet-derived 1	Reg1	0.22	6.05E-05
regucalcin	Rgn	0.12	2.37E-05
reticulon 4 receptor-like 1	Rtn4r1l	0.30	2.46E-05
retinol binding protein 2, cellular	Rbp2	0.49	4.19E-05
S100 calcium binding protein G	S100g	0.49	4.58E-05
sclerostin	Sost	0.21	3.74E-02
serine peptidase inhibitor, Kazal type 3	Spink3	0.06	1.90E-06
serum/glucocorticoid regulated kinase	Sgk	0.32	5.47E-03
serum/glucocorticoid regulated kinase 2	Sgk2	0.42	9.55E-04
short coiled-coil protein	Scoc	0.46	7.09E-04
similar to p47 protein	LOC547150	0.45	1.11E-04
small muscle protein, X-linked	Smpx	0.34	4.77E-04
solute carrier family 13 (sodium/sulphate symporters), member 1	Slc13a1	0.04	7.50E-07
solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1	Slc22a1	0.34	1.10E-06
solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 1	Slc23a1	0.09	2.80E-06
solute carrier family 25, member 36	Slc25a36	0.20	5.60E-07
solute carrier family 25, member 45	Slc25a45	0.04	2.99E-08
solute carrier family 26, member 3	Slc26a3	0.40	8.23E-06
solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2	Slc34a2	0.33	1.96E-02
solute carrier family 35, member A5	Slc35a5	0.41	3.64E-03
solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 4	Slc37a4	0.29	3.90E-06
solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 5	Slc39a5	0.48	1.82E-05
solute carrier family 41, member 2	Slc41a2	0.28	7.38E-06
solute carrier family 47, member 1	Slc47a1	0.30	1.93E-05
solute carrier family 5 (neutral amino acid transporters, system A), member 4b	Slc5a4b	0.06	1.52E-06
solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 12	Slc5a12	0.13	3.27E-03
solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 9	Slc5a9	0.07	4.73E-09
solute carrier family 5, member 4a	Slc5a4a	0.26	2.27E-04
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 9	Slc7a9	0.39	1.65E-04

solute carrier organic anion transporter family, member 2a1	Slco2a1	0.50	1.33E-04
somatostatin	Sst	0.43	3.55E-03
sorcini	Sri	0.46	1.51E-04
sphingomyelin synthase 2	Sgms2	0.45	1.52E-06
sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	Sgpp1	0.49	1.88E-04
splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 4	Spsb4	0.37	4.12E-04
sprouty homolog 3 (Drosophila)	Spry3	0.18	1.28E-05
SRY-box containing gene 13	Sox13	0.29	3.96E-05
SRY-box containing gene 6	Sox6	0.11	2.34E-06
sterol regulatory element binding factor 1	Srebf1	0.47	5.21E-03
succinate receptor 1	Sucnr1	0.31	3.54E-04
sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	Sult1c2	0.49	1.85E-02
synaptosomal-associated protein	Snap29	0.50	7.46E-06
TBC1 domain family, member 5	Tbc1d5	0.48	1.01E-04
tissue factor pathway inhibitor 2	Tfpi2	0.22	8.79E-07
transcription elongation factor A (SII), 3	Tcea3	0.27	2.74E-06
transmembrane 4 superfamily member 4	Tm4sf4	0.08	1.85E-06
transmembrane emp24 protein transport domain containing 6	Tmed6	0.03	1.29E-08
transmembrane protein 117	Tmem117	0.33	2.61E-03
transmembrane protein 140	Tmem140	0.41	3.67E-05
transmembrane protein 144	Tmem144	0.39	1.10E-06
transmembrane protein 37	Tmem37	0.48	1.49E-03
trimethyllysine hydroxylase, epsilon	Tmlhe	0.45	4.45E-05
troponin T2, cardiac	Tnnt2	0.46	1.36E-02
tubulointerstitial nephritis antigen	Tinag	0.02	6.11E-11
UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide A3	Ugt2a3	0.02	9.03E-09
UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B34	Ugt2b34	0.29	2.45E-07
UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B35	Ugt2b35	0.20	5.12E-04
UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B36	Ugt2b36	0.04	3.22E-07
UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B5	Ugt2b5	0.01	3.07E-07
ureidopropionase, beta	Upb1	0.35	6.00E-04
vanin 1	Vnn1	0.49	8.95E-04
von Willebrand factor A domain containing 1	Vwa1	0.11	5.89E-07
X transporter protein 3 similar 1 gene	Xtrp3s1	0.40	5.87E-06
yippee-like 2 (Drosophila)	Ypel2	0.41	5.66E-05
zinc finger with KRAB and SCAN domains 1	Zkscan1	0.22	1.28E-05

**Supplementary Table 3. Most important gene networks predicted to be down-modulated in the *Hnf1a* mutant small intestine.**

Gene Title	Gene Symbol	Fold change	P-value
<b><u>Molecular transport</u></b>			
aquaporin 1 (Colton blood group)	AQP1	-3.32	3.1E-06
aquaporin 7	AQP7	-3.49	9.4E-06
cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	CYP3A4	-4.48	1.4E-03
gap junction protein, beta 1, 32kDa	GJB1	-2.37	9.1E-06
guanylate cyclase activator 2A (guanylin)	GUCA2A	-11.31	2.4E-05
solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 1	SLC13A1	-24.76	7.5E-07
solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1	SLC22A1	-2.94	1.1E-06
solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2	SLC34A2	-3.02	2.0E-02
solute carrier family 47, member 1	SLC47A1	-3.35	1.9E-05
solute carrier organic anion transporter family, member 2A1	SLCO2A1	-2.09	1.3E-04
<b><u>Glucose metabolism and transport</u></b>			
glucose-6-phosphatase, catalytic subunit	G6PC	-3.10	1.7E-04
glucose-6-phosphate transporter	SLC37A4	-3.42	3.9E-06
lactase	LCT	-7.73	1.5E-04
pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	PDK4	-2.64	2.5E-03
<b><u>Lipid metabolism and transport</u></b>			
alpha-fetoprotein	AFP	-101.1	5.2E-09
apolipoprotein A-IV	APOA4	-2.32	1.3E-03
apolipoprotein C-II	APOC2	-4.22	3.1E-06
apolipoprotein L 7c	APOL7C	-2.32	9.5E-05
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8	ABCG8	-3.51	2.1E-06
fatty acid binding protein 1, liver	FABP1	-15.86	1.7E-07
<b><u>Enteroendocrine cells functions</u></b>			
chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)	CHGA	-1.62	6.3E-03
chromogranin B (secretogranin 1)	CHGB	-1.99	1.7E-03
dipeptidyl-peptidase 4	DPP4	-2.86	9.2E-06
gastric inhibitory polypeptide	GIP	-1.83	5.5E-03
ghrelin/obestatin prepropeptide	GHRL	3,935	3,8E-05
neurotensin	NTS	-1.99	6,1E-04
peptide YY	PYY	-1.65	1.3E-03
somatostatin	SST	-2.34	3.6E-03

**Supplementary Table 4. Activation of genes involved in translational regulation in the *Hnfla* mutant small intestine**

Gene title	Gene Symbol	Fold Change	p-value
<b><u>Protein synthesis</u></b>			
eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1	EIF2AK1	-1.62	7.59E-04
eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 alpha, 26kDa	EIF2B1	1.60	1.15E-04
eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa	EIF2S3	1.96	4.75E-02
glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1	GFPT1	1.85	1.28E-04
mitochondrial translational initiation factor 2	MTIF2	1.60	2.20E-02
myotubularin related protein 2	MTMR2	1.55	4.03E-04
ribonucleotide reductase M1	RRM1	1.53	7.17E-03
ribonucleotide reductase M2 polypeptide	RRM2	1.77	1.49E-03
transglutaminase 2	TGM2	1.84	1.61E-04
<b><u>Aminoacyl-tRNA biosynthesis</u></b>			
asparaginyl-tRNA synthetase	NARS	1.74	1.24E-03
cysteinyl-tRNA synthetase	CARS	1.64	4.39E-02
isoleucyl-tRNA synthetase	IARS	1.71	5.76E-03
isoleucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	IARS2	1.75	4.49E-04
methionyl-tRNA synthetase	MARS	1.78	3.42E-03
tyrosyl-tRNA synthetase	YARS	1.58	2.17E-02

## REFERENCES

1. Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* 2006;7:349-59.
2. Scoville DH, Sato T, He XC, Li L. Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* 2008;134:849-64.
3. Traber PG, Wu GD. Intestinal Development and Differentiation. In: Rustgi AK, ed. *Gastrointestinal Cancers: Biology, Diagnosis, and Therapy* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1995:21-43.
4. Menard D, Beaulieu JF, Boudreau F, Perreault N, Rivard N, Vachon PH. Gastrointestinal tract. In: Unsicker K, Kriegstein K, eds. *Cell signaling and growth factors in development: from molecules to organogenesis*: Wiley-VCH, 2006:755-90.
5. Battle MA, Bondow BJ, Iverson MA, Adams SJ, Jandacek RJ, Tso P, Duncan SA. GATA4 is essential for jejunal function in mice. *Gastroenterology* 2008;135:1676-1686 e1.
6. Gao N, White P, Kaestner KH. Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev Cell* 2009;16:588-99.
7. Babeu JP, Darsigny M, Lussier CR, Boudreau F. Hepatocyte nuclear factor 4{alpha} contributes to an intestinal epithelial phenotype in vitro and plays a partial role in mouse intestinal epithelium differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;297:G124-34.
8. D'Angelo A, Bluteau O, Garcia-Gonzalez MA, Gresh L, Doyen A, Garbay S, Robine S, Pontoglio M. Hepatocyte nuclear factor 1alpha and beta control terminal differentiation and cell fate commitment in the gut epithelium. *Development*;137:1573-82.
9. Baumhueter S, Mendel DB, Conley PB, Kuo CJ, Turk C, Graves MK, Edwards CA, Courtois G, Crabtree GR. HNF-1 shares three sequence motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and APF. *Genes Dev* 1990;4:372-9.
10. Blumenfeld M, Maury M, Chouard T, Yaniv M, Condamine H. Hepatic nuclear factor 1 (HNF1) shows a wider distribution than products of its known target genes in developing mouse. *Development* 1991;113:589-99.
11. Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Bach JP, Babinet C, Yaniv M. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* 1996;84:575-85.
12. Lee YH, Sauer B, Gonzalez FJ. Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1alpha knockout mouse. *Mol Cell Biol* 1998;18:3059-68.
13. Pontoglio M, Sreenan S, Roe M, Pugh W, Ostrega D, Doyen A, Pick AJ, Baldwin A, Velho G, Froguel P, Levisetti M, Bonner-Weir S, Bell GI, Yaniv M, Polonsky KS. Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. *J Clin Invest* 1998;101:2215-22.
14. Bosse T, Fialkovich JJ, Piaseckiy CM, Beuling E, Broekman H, Grand RJ, Montgomery RK, Krasinski SD. Gata4 and Hnf1 {alpha} are partially required for the expression of specific intestinal genes during development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007.
15. Boudreau F, Rings EH, van Wering HM, Kim RK, Swain GP, Krasinski SD, Moffett J, Grand RJ, Suh ER, Traber PG. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *J Biol Chem* 2002;277:31909-17.

16. Darsigny M, Babeu JP, Dupuis AA, Furth EE, Seidman EG, Levy E, Verdu EF, Gendron FP, Boudreau F. Loss of hepatocyte-nuclear-factor-4alpha affects colonic ion transport and causes chronic inflammation resembling inflammatory bowel disease in mice. *PLoS One* 2009;4:e7609.
17. Lussier CR, Babeu JP, Auclair BA, Perreault N, Boudreau F. Hepatocyte nuclear factor-4alpha promotes differentiation of intestinal epithelial cells in a coculture system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G418-28.
18. Novak JP, Sladek R, Hudson TJ. Characterization of variability in large-scale gene expression data: implications for study design. *Genomics* 2002;79:104-13.
19. Langlois MJ, Roy SA, Auclair BA, Jones C, Boudreau F, Carrier JC, Rivard N, Perreault N. Epithelial phosphatase and tensin homolog regulates intestinal architecture and secretory cell commitment and acts as a modifier gene in neoplasia. *Faseb J* 2009;23:1835-44.
20. Boudreau F, Lussier CR, Mongrain S, Darsigny M, Drouin JL, Doyon G, Ran Suh E, Beaulieu JF, Rivard N, Perreault N. Loss of cathepsin L activity promotes claudin-1 overexpression and intestinal neoplasia. *Faseb J* 2007.
21. Wasan HS, Park HS, Liu KC, Mandir NK, Winnett A, Sasieni P, Bodmer WF, Goodlad RA, Wright NA. APC in the regulation of intestinal crypt fission. *J Pathol* 1998;185:246-55.
22. He XC, Yin T, Grindley JC, Tian Q, Sato T, Tao WA, Dirisina R, Porter-Westpfahl KS, Hembree M, Johnson T, Wiedemann LM, Barrett TA, Hood L, Wu H, Li L. PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet* 2007;39:189-98.
23. Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2002;22:1172-83.
24. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007;449:1003-7.
25. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006;124:471-84.
26. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 2006;25:6416-22.
27. DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev* 2008;22:239-51.
28. Semenza G, Kessler M, Schmidt U, Venter JC, Fraser CM. The small-intestinal sodium-glucose cotransporter(s). *Ann N Y Acad Sci* 1985;456:83-96.
29. Gautier-Stein A, Zitoun C, Lalli E, Mithieux G, Rajas F. Transcriptional regulation of the glucose-6-phosphatase gene by cAMP/vasoactive intestinal peptide in the intestine. Role of HNF4alpha, CREM, HNF1alpha, and C/EBPalpha. *J Biol Chem* 2006;281:31268-78.
30. Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, Akiyama TE, Gonzalez FJ, Chou JY. A molecular link between the common phenotypes of type 1 glycogen storage disease and HNF1alpha-null mice. *J Biol Chem* 2001;276:7963-7.
31. Bossé T, van Wering HM, Gielen M, Dowling LN, Fialkovich JJ, Piaseckyj CM, Gonzalez FJ, Akiyama TE, Montgomery RK, Grand RJ, Krasinski SD. Hepatocyte nuclear factor-1alpha is required for expression but dispensable for histone

- acetylation of the lactase-phlorizin hydrolase gene in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1016-24.
32. Cheng H, Bjerknes M. Whole population cell kinetics and postnatal development of the mouse intestinal epithelium. *Anat Rec* 1985;211:420-6.
  33. Fujishita T, Aoki K, Lane HA, Aoki M, Taketo MM. Inhibition of the mTORC1 pathway suppresses intestinal polyp formation and reduces mortality in *ApcDelta716* mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13544-9.
  34. Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000;100:387-90.
  35. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003;115:577-90.
  36. Tamura A, Kitano Y, Hata M, Katsuno T, Moriwaki K, Sasaki H, Hayashi H, Suzuki Y, Noda T, Furuse M, Tsukita S, Tsukita S. Megaintestine in claudin-15-deficient mice. *Gastroenterology* 2008;134:523-34.
  37. Bagnat M, Cheung ID, Mostov KE, Stainier DY. Genetic control of single lumen formation in the zebrafish gut. *Nat Cell Biol* 2007;9:954-60.
  38. Shih DQ, Bussen M, Sehayek E, Ananthanarayanan M, Shneider BL, Suchy FJ, Shefer S, Bollileni JS, Gonzalez FJ, Breslow JL, Stoffel M. Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nat Genet* 2001;27:375-82.
  39. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, Xavier RJ, Sleckman BP, Li E, Mizushima N, Stappenbeck TS, Virgin HW. A key role for autophagy and the autophagy gene *Atg16l1* in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 2008;456:259-63.
  40. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. Loss of the autophagy protein *Atg16L1* enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* 2008;456:264-8.
  41. Scott SV, Hefner-Gravink A, Morano KA, Noda T, Ohsumi Y, Klionsky DJ. Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:12304-8.
  42. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an *Apg1* protein kinase complex. *J Cell Biol* 2000;150:1507-13.

## **2.4. La double invalidation de *Hnf-1 $\alpha$* et *Hnf-4 $\alpha$***

### **2.4.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### ***Modèles murins et génotypages***

Les lignées de souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle d'un fragment de 12,4Kb du promoteur de la *Villine* (*Villin-Cre*; MADISON *et al.*, 2002) et sous le contrôle d'un fragment de 8,5Kb du promoteur de *CYP1A1* (*CYP1A1-Cre*; IRELAND *et al.*, 2004) ont été gracieusement offertes par la Dre. Deborah L. Gumucio (University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI) et le Dr. Alan R. Clarke (University of Cardiff, Cardiff, UK), respectivement. La lignée reporteur B6;129S4-*Gt(ROSA)26SortmSor/J* (*ROSA26R*; SORIANO, 1999; no.3474) et les souris *Hnf4 $\alpha$ <sup>tm1.1Gonz</sup>* (*Hnf4 $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup>*; HAYHURST *et al.*, 2001; no.4665) ont été achetées chez Jackson Laboratory ([www.jax.org](http://www.jax.org)). Les souris invalidées pour *Hnf1 $\alpha$*  (*Hnf1 $\alpha$  KO*; LEE *et al.*, 1998) ont été gracieusement offertes par le Dr. Ying-Hue Lee (Institute of Molecular Biology, Taiwan). Les souris ont été génotypées par des analyses PCRs effectuées sur des extraits d'ADN préparés avec le « Spin Doctor Genomic DNA Isolation kit » (Gerard Biotech, [www.gerardbiotech.com](http://www.gerardbiotech.com)), selon les protocoles spécifiés par les fournisseurs. Les souris ont été traitées tel que prévu par le protocole révisé et approuvé par le Comité Institutionnel de Recherche sur les Animaux de l'Université de Sherbrooke et en conformité avec les lignes directrices du Conseil Canadien pour la Protection des Animaux.

#### ***Induction du promoteur *CYP1A1* par la $\beta$ -naphthoflavone via la voie orale***

La  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF; no.N3633; Sigma-Aldrich, [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)) a été dissoute à une concentration de 10 mg/ml dans de l'huile de maïs (no.C8267; Sigma-Aldrich) préchauffée à 100 °C dans un erlenmeyer opaque (la  $\beta$ NF est photosensible). Les aliquots ont



été congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans des contenants opaques. Pour les souris contrôles, de l'huile de maïs a été chauffée en parallèle et aliquotée dans les mêmes conditions. Le jour de l'expérience, la solution de  $\beta\text{NF}$  a été décongelée dans un bain marie et les croquettes pour souris (nourriture régulière) y ont été immergées pour une période d'environ 4 heures (2 croquettes/souris/jour; des demi croquettes ont été utilisées pour favoriser la surface de contact). Suite à la fermeture des lumières à l'animalerie (entre 19 et 20 heures), les croquettes huileuses ont été placées dans de petits récipients accessibles aux souris, toute autre source de nourriture ayant été éliminée. Les souris ont été nourries 4 soirs consécutifs avec les croquettes imbibées de  $\beta\text{NF}$ , remises à leur diète régulière pendant 24 heures et sacrifiées entre 10 et 12 heures le 5<sup>e</sup> jour suivant le 1<sup>er</sup> traitement.

#### ***Coloration des tissus avec le XGal***

Les souris ont été sacrifiées, puis les tissus ont été rincés dans le PBS 1X et immergés pendant 60 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$  dans la solution de fixation (1% formaldéhyde, 0,2% glutaraldéhyde, 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 5mM EGTA pH 8, 0,02% NP-40, dans du PBS 1X). Suite à 3 lavages dans le PBS 1X, les tissus ont été incubés pendant 2 heures à  $37^{\circ}\text{C}$  dans la solution de coloration (5mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 5mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,01% sodium déoxycholate, 0,02% NP-40, 1 mg/ml XGal, dans du PBS 1X). Les tissus ont par la suite été rincés au PBS 1X, avant d'être observés à la binoculaire. Tous les produits utilisés provenaient de chez Sigma-Aldrich.

#### ***Colorations histologiques, microscopie électronique, immunofluorescences indirectes***

La préparation des tissus, les colorations histologiques, les analyses par microscopie électronique et les immunofluorescences indirectes ont été effectuées exactement comme décrit dans les manuscrits 1 et 3 présentés dans les sections précédentes. Un anticorps

polyclonal dirigé envers HNF-4 $\alpha$  et purifié par affinité a été utilisé (no.SC-6556; Santa Cruz Biotechnology, [www.scbt.com](http://www.scbt.com)).

### ***Préparation d'ARN et RT-PCR quantitatifs***

Les extraits d'ARN, les réactions de transcription inverse et les RT-PCR quantitatifs (RT-PCRq) ont été effectués exactement comme décrit dans le manuscrit faisant l'objet de la seconde section des résultats de cette thèse. Les résultats ont été individuellement calibrés en comparaison avec l'expression des gènes TATA box binding protein (TBP) et Hypoxanthine-Guanine-Phospho-Ribosyl-Transferase (HPRT).

### ***Analyses statistiques***

Les analyses statistiques (Mann Whitney et Unpaired *t* test) ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 2.4.2. RÉSULTATS

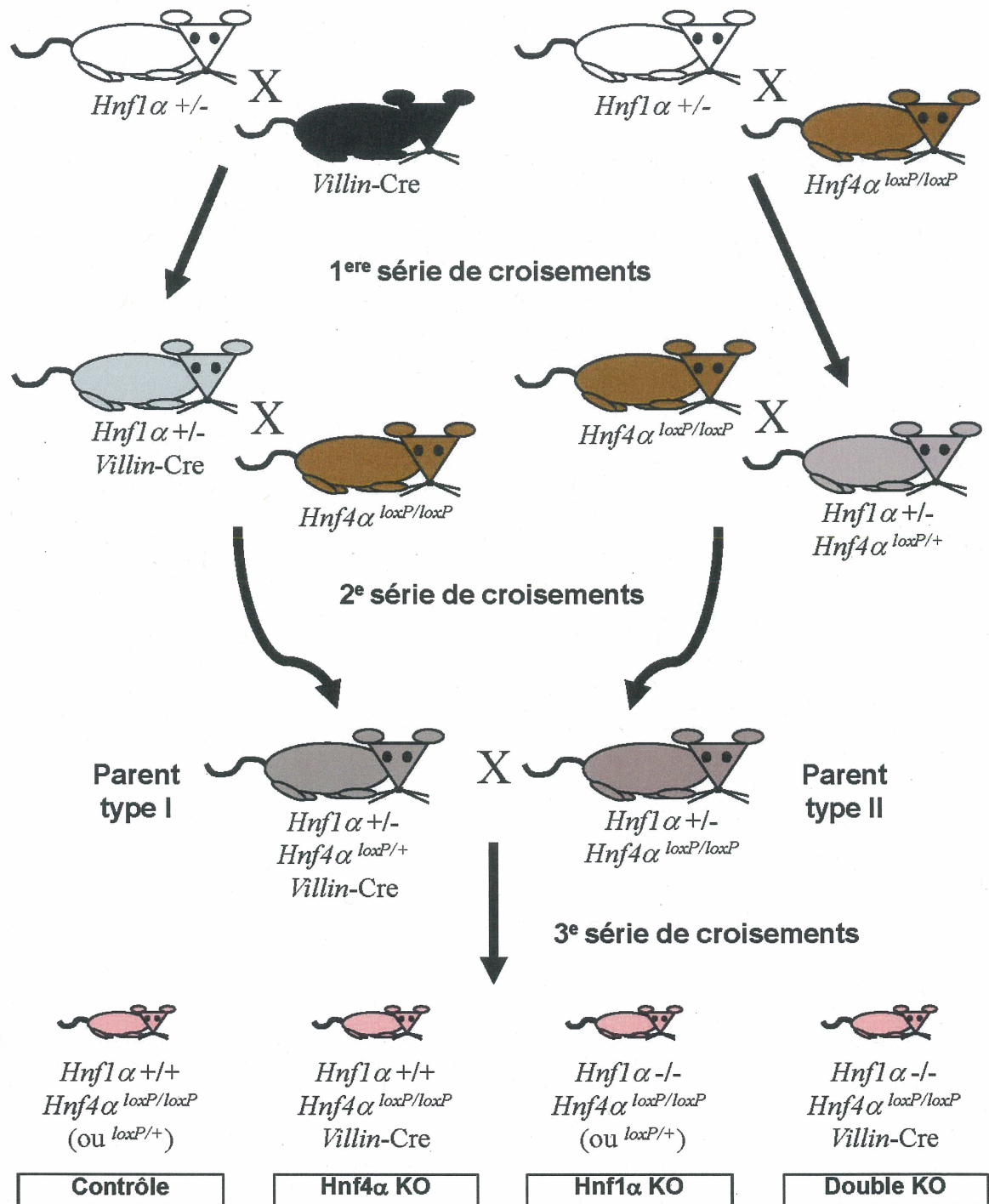
### 2.4.2.1. Les souris doublement invalidées dès la période embryonnaire (Double KO-Villine)

*Les souris double KO-Villine meurent dans les premières 36 heures suivant leur naissance*

Afin de déterminer l'impact de la perte de l'expression de *Hnf1 $\alpha$*  et *Hnf4 $\alpha$*  sur le développement fonctionnel de l'épithélium intestinal, des souris invalidées pour *Hnf1 $\alpha$*  au niveau de tous leurs tissus (*Hnf1 $\alpha$*  KO; LEE *et al.*, 1998) et invalidées pour *Hnf4 $\alpha$*  spécifiquement au niveau de leur épithélium intestinal après le jour embryonnaire 14,5 (*Hnf4 $\alpha$*  KO; BABEU *et al.*, 2009) ont été générées (Double KO-Villine; Figure 8). Au cours d'une première série de croisements, les génotypages routiniers, effectués au 7<sup>e</sup> jour suivant la naissance, n'ont pas permis d'identifier la présence de double KO. Un suivi serré des naissances a permis d'observer la présence d'une vague de mortalité importante dans les premières 36 heures suivant la naissance des souriceaux. Les souriceaux morts qui ont pu être récupérés et génotypés étaient des *Hnf1 $\alpha$*  KO ou des doubles KO-Villine (Tableau 1). Ces résultats indiquent qu'environ 75% des souris *Hnf1 $\alpha$*  KO survivent aux premières 36 heures suivant leur naissance, alors que tous les doubles KO-Villine meurent au cours de cette période.

**Tableau 1.** Suivi des naissances – Génotypes obtenus en comparaison aux prévisions de Mendel

Génotypes	Mendel		Obtenus			
	%	# / 78	vivants	morts jr1	morts jr2	total
Hnf4 $\alpha$ KO	18,75	<b>14,6</b>	15			<b>15</b>
Hnf1 $\alpha$ KO	18,75	<b>14,6</b>	11	1	1	<b>13</b>
Double KO	6,25	<b>4,9</b>		1	2	<b>3</b>
Autres	56,25	<b>43,9</b>	41			<b>41</b>
Disparus					6	6



**Figure 8. Stratégie de croisements pour obtenir les souris doubles KO.** (Coin supérieur gauche) Une souris hétérozygote pour l'allèle invalidée de *Hnfl* $\alpha$  (*Hnfl* $\alpha$  +/-) est croisée avec une souris transgénique exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle d'un fragment du promoteur de la *Villine* (*Villin-Cre*), afin d'obtenir une souris *Hnfl* $\alpha$  +/- et *Villin-Cre* positive. Cette souris sera ensuite croisée avec une souris dont les deux allèles codant pour *Hnf4* $\alpha$  sont floxés (*Hnf4* $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup>) afin d'obtenir une souris *Hnfl* $\alpha$  +/-, *Villin-Cre* positive et hétérozygote pour l'allèle floxé de *Hnf4* $\alpha$  (*Hnf4* $\alpha$ <sup>loxP/+</sup>; parent de type I). De façon parallèle (coin supérieur droit), une souris *Hnfl* $\alpha$  +/- est croisée avec une souris *Hnf4* $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup>, pour obtenir une souris *Hnfl* $\alpha$  +/- et *Hnf4* $\alpha$ <sup>loxP/+</sup>. Cette souris est à nouveau croisée avec une souris *Hnf4* $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup>, afin de générer une souris *Hnfl* $\alpha$  +/- et *Hnf4* $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup> (parent de type II). Les parents de type I et II sont ensuite croisés entre eux pour obtenir les 4 groupes de souris désirées, soit la souris Contrôle (phénotype de type sauvage), la souris invalidée uniquement pour *Hnf4* $\alpha$  au niveau intestinal (*Hnf4* $\alpha$  KO), la souris invalidée pour *Hnfl* $\alpha$  (*Hnfl* $\alpha$  KO) et la souris présentant la double invalidation (Double KO).

### ***L'invalidation de Hnf4 $\alpha$ est effective à jour 1 post-natal***

Une seconde vague de croisements a été entreprise afin de récolter les souris doubles KO-Villine au premier matin suivant leur naissance (P1). Au total, les tissus de 92 souriceaux, issus de 11 portées différentes, ont été récoltés pour effectuer les génotypages. Il est à noter que 5 étaient morts, dont 2 *Hnfl* $\alpha$  KO et 2 doubles KO-Villine, leurs tissus ont été exclus des analyses subséquentes. Les résultats des 3 différents génotypages sont compilés dans le tableau 2, en parallèle avec les prévisions de la loi de Mendel. Il est à noter que le transgène encodant le promoteur villine – recombinaise Cre (*Villin-Cre*), ainsi que le double allèle floxé de *Hnf4* $\alpha$ , ont été transmis avec des ratios réels respectifs de 39% et 20% supérieurs aux ratios attendus. Cet évènement a donc mené à l'obtention d'un nombre plus élevé que prévu de souris présentant les génotypes *Hnf4* $\alpha$  KO et double KO-Villine (Tableau 3).

**Tableau 2.** Récolte à P1 - Géotypes détaillés des souris obtenues en comparaison aux prédictions de la loi de Mendel

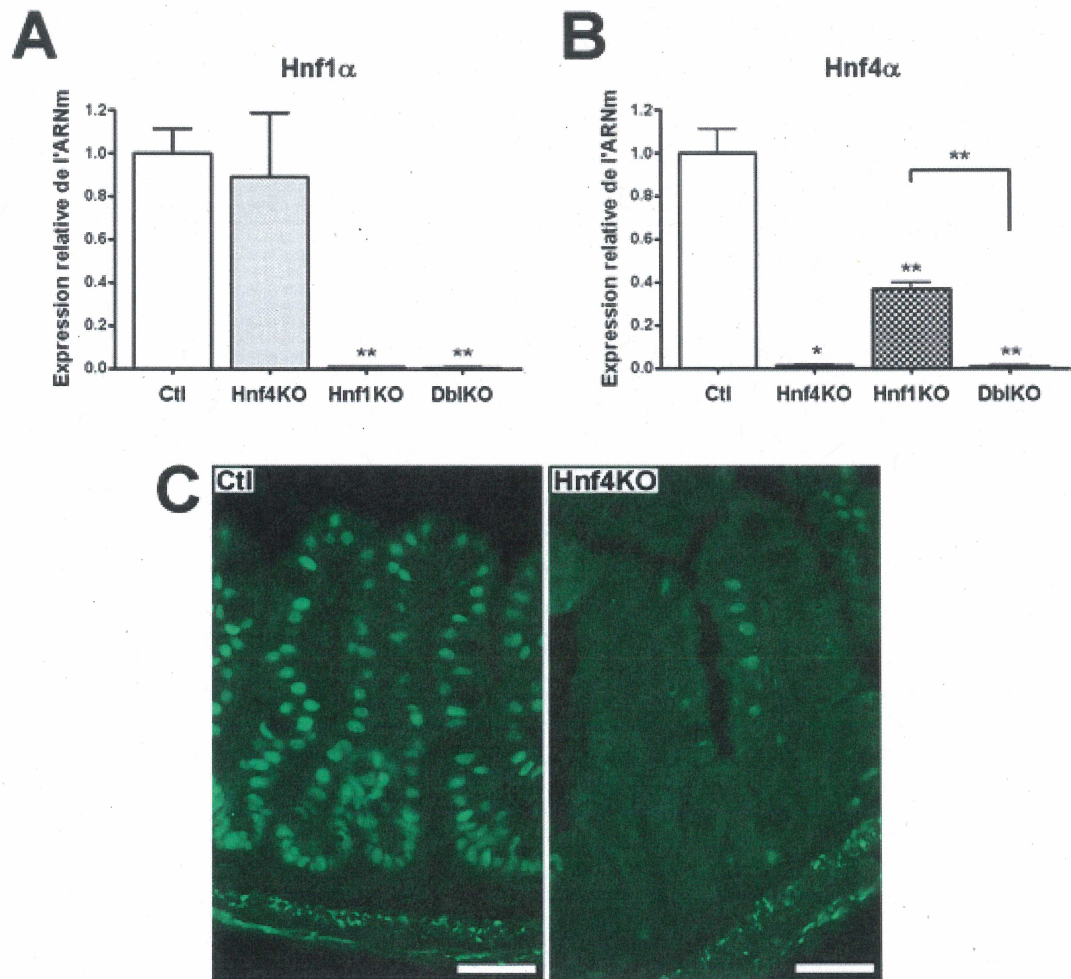
Géotypes (PCR détaillés)		Mendel	obtenus	
		%	# / 92	%
<i>Hnf4α</i>	loxp/+	50	37	40,2
	loxp/loxp	<b>50</b>	55	<b>59,8</b>
<i>Villin-Cre</i>	+	<b>50</b>	64	<b>69,6</b>
	-	50	28	30,4
<i>Hnf1α</i>	+/+	25	23	25
	+/-	50	43	46,7
	-/-	25	26	28,3

**Tableau 3.** Récolte à P1 – Géotypes obtenus en comparaison aux prévisions de Mendel

Géotypes	Mendel	obtenus	
	%	# / 92	%
<i>Hnf1α</i> KO	18,75	17	18,48
<i>Hnf4α</i> KO	18,75	32	34,78
Double KO	6,25	9	9,78
Autres	56,25	34	36,96

Afin de confirmer l'invalidation de *Hnf1α* et *Hnf4α* dans les tissus utilisés, leur niveau d'expression respectif a été analysé dans l'intestin grêle des souris par des RT-PCR effectués à partir d'extraits d'ARNs totaux (Figure 9). Le transcrite de *Hnf1α* est diminué de plus de 99% dans les souris *Hnf1α* KO et doubles KO-Villine en comparaison aux souris contrôles, alors que son expression n'est pas modulée de façon significative dans les souris *Hnf4α* KO (Figure 9A). Le transcrite de *Hnf4α* est, quant à lui, diminué de plus de 95% dans les souris *Hnf4α* KO et les doubles KO-Villine en comparaison aux souris contrôles (Figure 9B) et, de façon inattendue, son expression est diminuée significativement de 60% dans les souris *Hnf1α* KO (Figure 9B). Ce résultat a été confirmé par l'utilisation de 3 ensembles d'amorces différentes. Des immunofluorescences indirectes ont également permis de démontrer qu'au niveau de la protéine, l'expression de *Hnf4α* est restreinte à quelques rares

cellules par axe crypte-villosité chez les souris *Hnf4α*KO (Figure 9C). Ces résultats indiquent que l'inactivation de *Hnf4α* a été effective avant la naissance des souris et que les souris *Hnf1α* KO à P1 présentent une réduction significative de l'expression de *Hnf4α*.

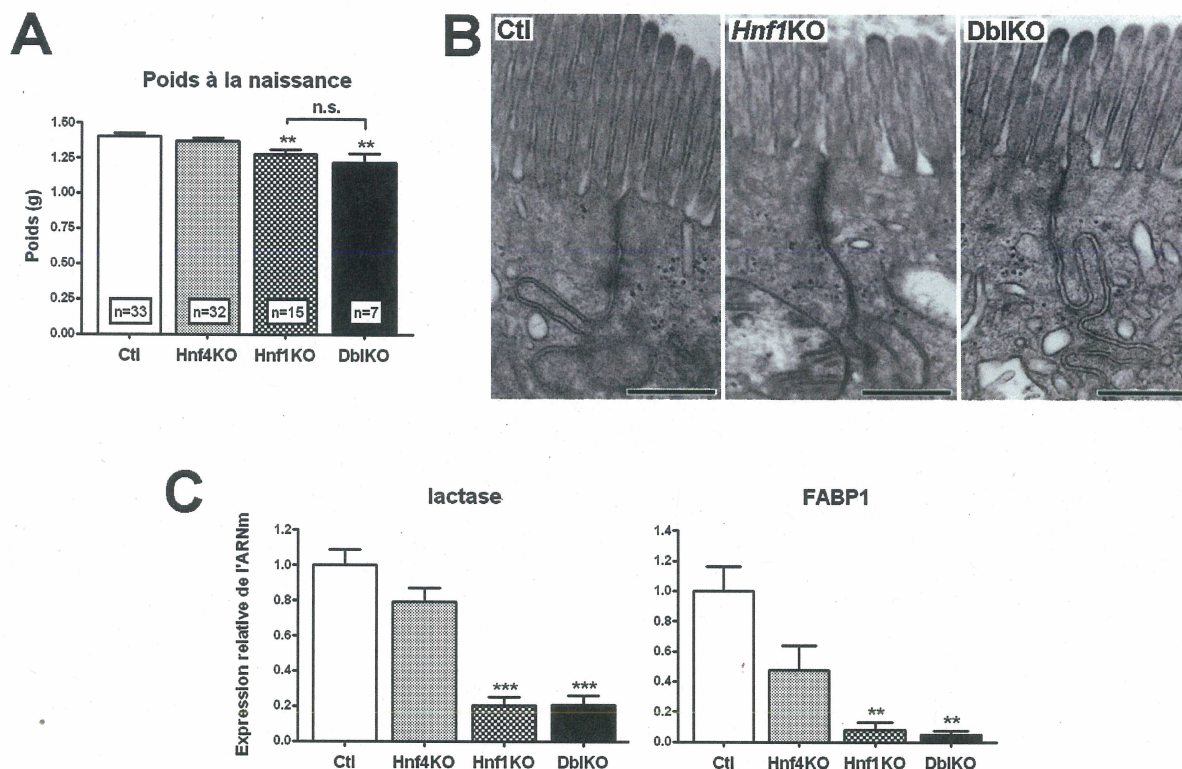


**Figure 9. Confirmation de la double invalidation dans l'intestin grêle des souris récoltées.** Analyses par RT-PCR quantitatifs des niveaux d'expression de *Hnf1α* (A) et *Hnf4α* (B) dans des extraits d'ARN totaux d'intestin grêle. n = 4-6. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ . (C) Micrographies représentatives d'une immunodétection de *Hnf4α* (en vert) effectuée sur des coupes d'intestin grêle. Barre = 50 $\mu$ m. Ctl = contrôle; DbIKO = Double KO-Villine.

***Le phénotype des souris doubles KO-Villine est très similaire à celui des souris Hnf1 $\alpha$  KO***

La compilation des poids des souris a confirmé une diminution significative du poids des *Hnf1 $\alpha$  KO* à P1 (Figure 10A; LEE *et al.*, 1998). Cette diminution n'est pas accentuée par la perte de l'expression de *Hnf4 $\alpha$*  chez les souris double KO-Villine (Figure 10A). L'analyse de coupes de jéjunum, colorées à l'haematoxyline et à l'éosine, a permis d'observer que certains *Hnf1 $\alpha$  KO* présentent un niveau élevé de vascularisation, phénomène qui fut également observé chez certains doubles KO, ce phénomène nécessitera cependant une caractérisation plus approfondie dans le futur. L'examen par microscopie électronique n'a permis de noter aucun changement majeur au niveau de la polarisation, des microvillosités et des jonctions de l'épithélium du jéjunum chez les *Hnf1 $\alpha$  KO* ou doubles KO en comparaison aux contrôles (Figure 10B). Des extraits d'ARNs totaux ont ensuite été préparés afin d'effectuer des analyses par RT-PCRq de l'expression de gènes encodant pour des molécules essentielles au métabolisme chez les nouveaux-nés. Il s'avère que l'expression de la *lactase* (enzyme qui hydrolyse le lactose) et de *FABP1* (molécule de transport d'acide gras) est réduite de 79% et de 92%, respectivement, dans les *Hnf1 $\alpha$  KO*, et les doubles KO présentent exactement les mêmes tendances (Figure 10C). L'ensemble de ces résultats suggère que le phénotype des souris doublement invalidées pour *Hnf1 $\alpha$*  et *Hnf4 $\alpha$*  au niveau de leur muqueuse intestinale dès la période embryonnaire est similaire au phénotype des souris *Hnf1 $\alpha$  KO*. Par contre, une certaine subtilité doit subsister, puisque la mortalité périnatale est généralisée chez les doubles KO-Villine alors que la grande majorité des *Hnf1 $\alpha$  KO* survivent (tableau 1).





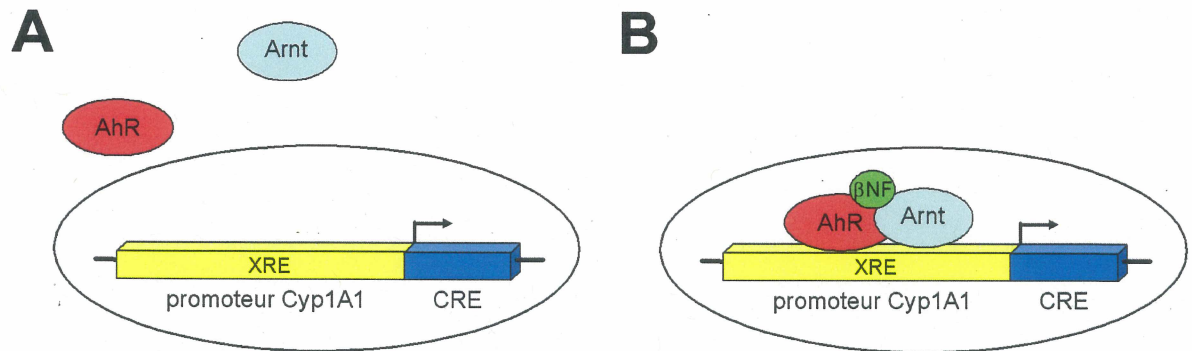
**Figure 10.** Les souris double KO-Villine présentent sensiblement le même phénotype que les souris *Hnf1α* KO. (A) Analyse statistique des poids totaux des souris récoltées à P1. (B) Micrographies représentatives d'une analyse par microscopie électronique. Barre = 10µm. (C) Analyses par RT-PCR quantitatifs des niveaux d'expression de la *lactase* et de *FABP1* dans des extraits d'ARN totaux d'intestin grêle. n = 4-6. \*\**P* < 0,01. \*\*\**P* < 0,001. Ctl = contrôle; DbIKO = Double KO-Villine.

#### 2.4.2.2. Les souris doublement invalidées à l'âge adulte (Double KO-CYP1A1)

##### Validation de l'induction du promoteur *CYP1A1* via la voie orale

Afin de déterminer l'impact d'une double invalidation de *Hnf1α* et *Hnf4α* sur le maintien des fonctions de l'épithélium intestinal adulte, les souris *Hnf1α* KO et *Hnf4α*<sup>loxp/loxp</sup> ont à nouveau été croisées tel que présenté à la figure 8, mais cette fois avec une lignée

transgénique permettant l'expression de la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur inducible de CYP1A1 (*CYP1A1*-Cre; Figure 11; CAMPBELL *et al.*, 1996).



**Figure 11. Le promoteur inducible CYP1A1.** (A) Généralement le récepteur d'aryl hydrocarbure (AhR) est localisé dans le cytoplasme et le promoteur CYP1A1 est inactif. (B) Lorsque la  $\beta$ -naphtoflavone ( $\beta$ NF) pénètre dans la cellule, elle se lie au AhR ce qui cause son association avec le translocateur du récepteur d'aryl hydrocarbure (Arnt). Les deux molécules transloquent alors au noyau, où elles se lient à la séquence de reconnaissance des xénobiotiques (XRE) dans le promoteur CYP1A1 activant ainsi sa transcription.

L'ingestion de la  $\beta$ -naphtoflavone permet l'induction spécifique du promoteur CYP1A1 au niveau de l'épithélium intestinal (IRELAND *et al.*, 2004). Cette approche a tout d'abord été validée via l'utilisation de souris CYP1A1-Cre croisées avec des souris ROSA26R (Figure 12A; SORIANO, 1999). Les souris CYP1A1-Cre / ROSA26R ont été nourries avec de la nourriture imbibée de  $\beta$ -naphtoflavone ( $\beta$ NF) ou avec la solution contrôle, tel que décrit dans la section « matériel et méthodes ». Par la suite, les tissus ont été récoltés et incubés en présence de XGal afin de confirmer l'induction du promoteur CYP1A1 via l'activité du gène rapporteur LacZ. En comparaison à la souris contrôle, la souris nourrie avec la  $\beta$ NF a montré une induction marquée de l'activité du promoteur CYP1A1 au niveau de tous les segments de l'intestin grêle (Figure 12B). L'observation avec une binoculaire des tissus colorés a

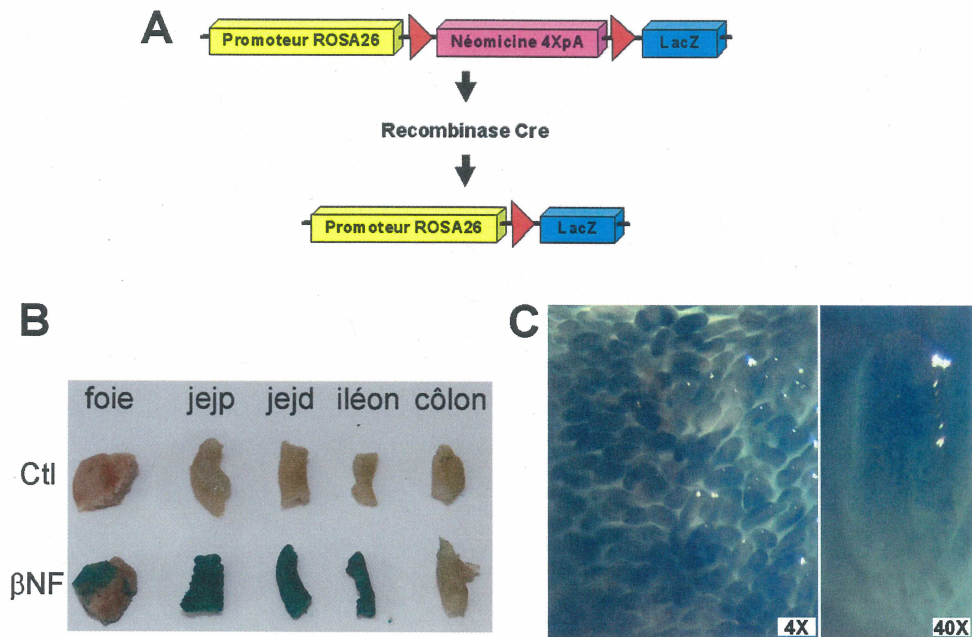
cependant montré que cette induction est mosaïque, puisque certaines villosités demeurent non colorées au contact du Xgal (Figure 12C, panneau de gauche). De plus, l'induction est plus fortement effective au niveau des cellules recouvrant la surface villositaire, soit les cellules différenciées et fonctionnelles (Figure 12C, panneau de droite). Il a également été possible de confirmer que le promoteur n'a pas été induit dans le foie, dont l'intérieur de cet organe n'a pas été coloré bleu au contact du XGal (Figure 12B).

***L'invalidation de Hnf4α dans l'intestin des souris Hnf1α KO adultes entraîne une mort rapide des souris***

Des souris âgées de 35 à 40 jours provenant de chacun des 4 groupes de génotypes présentés à la figure 1 ont été nourries avec de la nourriture imbibée de βNF. Au total, 29 souris ont reçu les traitements, le nombre de souris traitées dans chacun des groupes est présenté dans le tableau 4. Au cours du traitement, les souris double KO-CYP1A1, ainsi que les souris *Hnf1α* KO hétérozygotes pour *Hnf4α* (*Hnf1α* <sup>-/-</sup>; *Hnf4α* <sup>Loxp/+</sup>; CYP1A1 positives), dépérissent rapidement et meurent ou sont extrêmement faibles le jour du sacrifice (Tableau 5; Figure 13A). Lors du sacrifice, ces souris ont également un poids significativement plus léger que les souris *Hnf1α* KO (Figure 13B).

**Tableau 4.** Nombre de souris traitées à la βNF pour chaque génotype

	Contrôles	<i>Hnf4α</i> KO	<i>Hnf1α</i> KO	<i>Hnf1α</i> KO <i>Hnf4α</i> hétéro	Double KO
Nombre	9	11	4	2	3

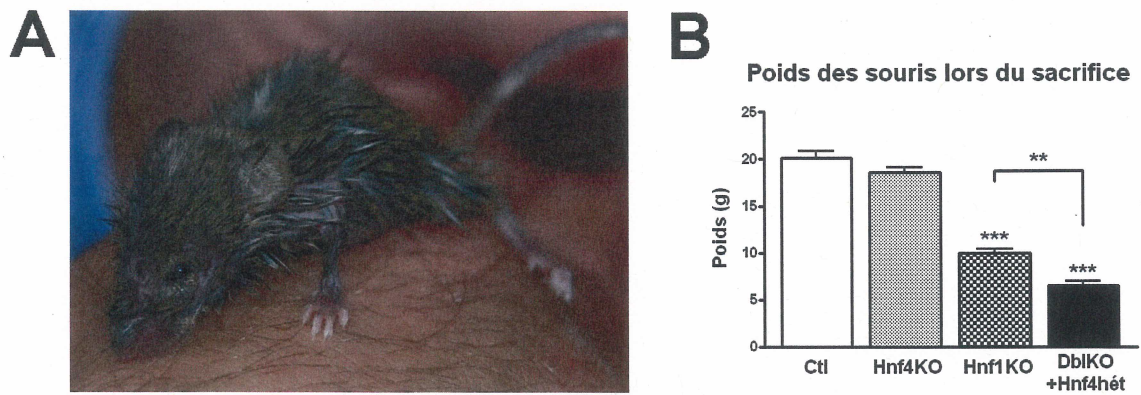


**Figure 12. Validation de l'induction du promoteur CYP1A via la voie orale.** (A) Les souris ROSA26R possèdent un transgène permettant l'expression constitutive du rapporteur LacZ, mais en amont duquel a été inséré le gène codant pour la néomycine, suivi de 4 séquences de polyadénylation, le tout flanqué de 2 séquences LoxP (triangles rouges). La présence de la recombinaison Cre permet la recombinaison des séquences LoxP et l'expression du gène rapporteur LacZ. (B-C) Tissus incubés en présence de XGal. (B) Photographie de fragments provenant du foie, de l'intestin grêle et du côlon. Ctl = souris nourries avec la solution contrôle;  $\beta$ NF = souris nourries avec la solution de  $\beta$ NF. (C) Vue de surface de la paroi intestinale des souris nourries avec la  $\beta$ NF. Micrographies prises avec une binoculaire.

**Tableau 5.** Observations détaillées - Double KO et *Hnf1 $\alpha$* KO hétérozygotes pour *Hnf4 $\alpha$*

Génotypes	Observations	Poids (g)
Double KO 1	Faible le jour du sacrifice	7,2
Double KO 2	Faible le jour du sacrifice	7,3
Double KO 3	Faible le jour du sacrifice	5,5
<i>Hnf1<math>\alpha</math></i> KO; <i>Hnf4<math>\alpha</math></i> hétéro 1	Sacrifiée au 4 <sup>e</sup> jour du traitement	6,0
<i>Hnf1<math>\alpha</math></i> KO; <i>Hnf4<math>\alpha</math></i> hétéro 2	Morte au 2 <sup>e</sup> jour du traitement	----

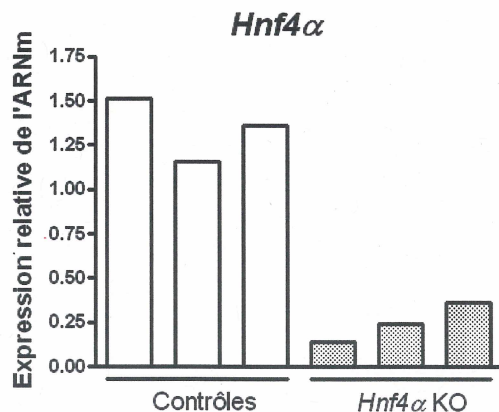




**Figure 13. Les souris double KO et *Hnf1α* KO hétérozygotes pour *Hnf4α* survivent difficilement au traitement à la βNF. (A) Photographie d'une souris double KO-CYP1A1 traitée à la βNF. (B) Analyse statistique des poids des souris traitées à la βNF lors du sacrifice. \*\* $P < 0,01$ . \*\*\* $P < 0,001$ . Ctl = contrôle; DbIKO = Double KO-CYP1A1; Hnf4hét = *Hnf1α*  $-/-$ ; *Hnf4α*  $^{Loxp/+}$ ; CYP1A1 positives. Les n pour chaque catégorie sont détaillés dans le tableau 4.**

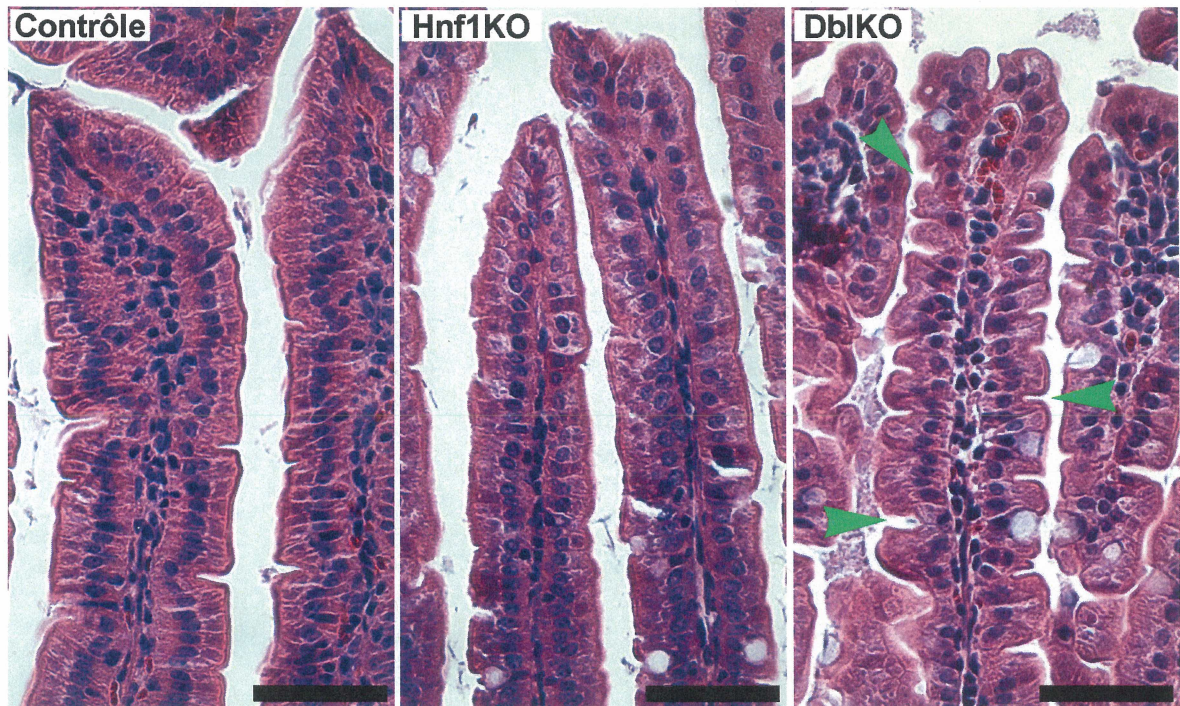
#### *L'épithélium des souris double KO-CYP1A1 présente des irrégularités morphologiques*

L'invalidation de *Hnf4α* suite au traitement à la βNF a été confirmée dans l'intestin grêle des souris par des RT-PCRq effectués à partir d'extraits d'ARNs totaux de jéjunum. En moyenne, le niveau d'expression de *Hnf4α* est réduit de 81,6% ( $P = 0,0008$ ) dans les souris *Hnf4α* KO en comparaison aux souris contrôles (Figure 14).



**Figure 14. *Hnf4α* est invalidé suite aux traitements à la βNF. Analyses par RT-PCR quantitatifs du niveau d'expression de *Hnf4α* dans des extraits d'ARN totaux d'intestin grêle.**

L'examen de coupes de jéjunum (2 animaux par catégorie) a permis d'observer plusieurs espaces vides dans la monocouche épithéliale (Figure 15). Ses irrégularités semblent être dues à la présence de nombreuses cellules non polarisées, des analyses plus approfondies devront être effectuées.



**Figure 15. La morphologie épithéliale semble affectée dans les double KO-CYP1A1.** Micrographies représentatives d'une coloration H&E effectuée sur des coupes de jéjunum. DbiKO : double KO-CYP1A1. Flèche verte = cellules non polarisées. Barre = 50µm.

### **3. DISCUSSION**

#### ***3.1. La cathepsine L dans le maintien de l'homéostasie épithéliale intestinale***

##### ***3.1.1. La cathepsine L serait induite au cours de la détermination cellulaire***

Nous avons identifié une augmentation rapide de l'expression de la cathepsine L lors de l'induction de Cdx2 dans les cellules IEC-6/L1. Cette dernière s'accumule au niveau des organelles et du noyau, et ce, majoritairement sous sa forme active. L'inhibition de l'activité intracellulaire de la cathepsine L entraîne des défauts de polarisation et de différenciation. Mais à quel moment exactement la cathepsine L intervient-elle au cours de la maturation de l'épithélium intestinal ? La lignée cellulaire IEC-6 est un modèle indifférencié, qui n'a pas la capacité de se différencier en culture, et ce, même lorsqu'elle est cultivée en présence de cellules mésenchymateuses (manuscrit 2). Lors de leur immortalisation spontanée en culture (QUARONI *et al.*, 1979), ces cellules ont probablement perdu l'expression de certains gènes dont les produits sont essentiels à la perception des signaux environnementaux nécessaires à l'induction de leur différenciation. L'induction de Cdx2 dans ces cellules (IEC-6/L1) permet ainsi, dans un premier temps, de moduler l'expression génique, afin d'établir les voies moléculaires essentielles à leur différenciation subséquente (SUH et TRABER, 1996), un processus qui s'associe à la détermination cellulaire vers un devenir épithélial intestinal. L'expression intracellulaire de la cathepsine L est fortement induite dans les 5 jours suivant l'induction de Cdx2, une période au cours de laquelle les cellules ralentissent leur prolifération et ne présentent encore aucun signe de différenciation. Ces observations suggèrent un rôle au cours de la détermination et/ou de l'arrêt progressif de la prolifération, plutôt que de la différenciation terminale.

Afin de vérifier si la cathepsine L pourrait intervenir au cours de la détermination cellulaire, il serait pertinent d'identifier précisément dans quelles cellules le long de l'axe

crypte-villosité elle est exprimée, ainsi qu'au niveau de quels compartiments cellulaires. De plus, le modèle IEC-6/L1 pourrait être utilisé afin de vérifier si l'expression de cette protéase est restreinte à une sous population cellulaire particulière, à court et à long terme, lors de l'induction de Cdx2.

### ***3.1.2. La cathepsine L et l'intégrité de l'épithélium intestinal***

#### ***3.1.2.1. Une fonction endosomale***

Nous avons démontré que la perte de l'activité de la cathepsine L chez les souris *APC*<sup>MIN</sup> cause une augmentation de la multiplicité tumorale. Un parallèle très intéressant peut être établi entre cette observation et la fonction de la cathepsine L dans la prolifération des kératinocytes. Effectivement, l'invalidation de la *cathepsine L* cause une hyperplasie de l'épiderme qui est due à une hyperprolifération des kératinocytes (ROTH *et al.*, 2000). Il a récemment été démontré que les kératinocytes qui sont défaillants pour l'activité de la cathepsine L présentent un taux de recyclage plus élevé du récepteur du facteur de croissance épithélial (EGFR), causant ainsi une augmentation de la prolifération induite par l'EGF. Ces observations suggèrent une fonction de la cathepsine L dans le contrôle du recyclage d'un récepteur dont l'activité induit une signalisation qui mène à la prolifération cellulaire (REINHECKEL *et al.*, 2005). La régulation de la prolifération étant étroitement liée à la détermination et la différenciation cellulaire, la cathepsine L pourrait avoir une fonction similaire au niveau de l'épithélium intestinal. À l'opposé des kératinocytes, lors de la perte de la cathepsine L dans les CEI, il pourrait y avoir une compensation de cette fonction par une autre cystéine protéase, telle la cathepsine B, qui a été impliquée dans la dégradation du EGF dans les hépatocytes (AUTHIER *et al.*, 1999). Par contre, cette fonction pourrait être nécessaire dans le cas où une hyperprolifération est enclenchée, comme dans le cas de la perte d'hétérozygocité d'APC chez les souris *APC*<sup>Min</sup>. Une amplification de la multiplicité



tumorale a récemment été observée chez ces souris lorsque l'expression de « phosphatase and tensin homolog » (PTEN) y est invalidée au niveau des CEI (LANGLOIS *et al.*, 2009). Hors, la fonction de cette phosphatase est d'inhiber la signalisation passant par l'activité de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), dont l'activation découle, entre autre, des récepteurs de facteurs de croissance, tel que le EGFR. Ainsi, comme PTEN, la cathepsine L pourrait réguler la signalisation induite par certains de ces récepteurs, mais via le contrôle de leur recyclage. Cette hypothèse est également appuyée par une comparaison avec une étude au cours de laquelle l'expression constitutive de MEK-1 (MEKca) a été induite dans le modèle cellulaire IEC-6 (BOUCHER *et al.*, 2004). Rappelons que l'activation du EGFR mène, entre autre, à l'activation de MEK et de la voie des MAPK. L'expression de MEKca transforme les cellules IEC-6, ce qui est caractérisé par l'apparition de foyers de cellules prolifératives et non cohésives, qui ont la capacité de croître en absence d'ancrage (BOUCHER *et al.*, 2004). Hors, la ressemblance structurelle entre ces foyers et les amas cellulaires que nous observons lors des traitements avec l'inhibiteur de la cathepsine L (Z-Phe) est frappante. Ceci suggère que les voies moléculaires activées lors de l'inhibition de la cathepsine L soient, totalement ou en partie, les mêmes que celles enclenchées par l'activation constitutive de la signalisation dépendante d'un récepteur de facteurs de croissance.

Il serait fort intéressant de vérifier le statut de EGFR lors de l'inhibition de l'activité de la cathepsine L dans les cellules IEC-6/L1, ainsi que les niveaux d'activation des différentes voies de signalisation qui en découlent.

### ***3.1.2.2. Une fonction nucléaire***

Dans l'épithélium de l'intestin grêle, la  $\beta$ -caténine est localisée au niveau du noyau des cellules de Paneth, ainsi que de ceux de quelques rares cellules difficilement identifiables, probablement les cellules souches et nouvellement progénitrices. Cette

expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine, ainsi que son niveau d'activité, sont perdus avec la détermination progressive des cellules progénitrices (SCOVILLE *et al.*, 2008). L'expression nucléaire de la cathepsine L au cours de la détermination pourrait permettre de dégrader certaines molécules dont la localisation nucléaire pourrait être causée par la forte activité de la  $\beta$ -caténine, ou l'environnement de la cellule souche, et qui n'ont plus raison d'y être. Ce « nettoyage » du noyau pourrait permettre d'accélérer la détermination et la différenciation subséquente en favorisant la mise en place de certaines voies de signalisation, ou pourrait permettre d'éliminer des molécules dont l'expression nucléaire serait dommageable pour la cellule en dehors du contexte environnemental et génétique de la cellule souche. Ceci pourrait être le cas avec la claudine-1, pour laquelle une forte expression exogène ainsi qu'une localisation nucléaire ont été reliées à la croissance tumorale (DHAWAN *et al.*, 2005). Puisque la forte activité nucléaire de la  $\beta$ -caténine qui est induite dans les souris  $APC^{Min}$  cause une localisation nucléaire de la claudine-1, il est possible que cette dernière soit localisée au niveau du noyau des cellules qui expriment fortement de la  $\beta$ -caténine nucléaire dans les tissus sains. La claudine-1 pourrait avoir un rôle à jouer dans la prolifération des cellules souches et, au cours de la détermination, elle pourrait être dégradée par la cathepsine L. Cette dernière pourrait ainsi aider à combattre un éventuel déséquilibre prolifératif causé par une expression nucléaire de la claudine-1 dans les cellules en voie de se différencier.

Afin de déterminer la fonction nucléaire de la cathepsine L dans l'homéostasie des CEI, il sera primordial d'identifier précisément au niveau de quelles cellules cette protéase se localise dans le noyau *in vivo*. De plus, l'expression constitutive d'une forme nucléaire de la cathepsine L dans un modèle cellulaire comme les IEC-6 serait fort utile afin d'élucider l'impact de cette localisation nucléaire.

### 3.1.2.3. *Les souris furless vs les souris invalidées pour la cathepsine L*

Indépendamment de la localisation intracellulaire de la cathepsine L, il est important de souligner que la mutation ponctuelle qui est présente dans le gène de la *cathepsine L* chez les souris *furless* permet l'expression d'une protéine (ROTH *et al.*, 2000). Bien que catalytiquement inactive, cette cathepsine L pourrait conserver une capacité de liaison à certaines de ces cibles protéolytiques. Ainsi, ces dernières ne seraient pas clivées par la protéase, mais cette interaction pourrait causer un changement conformationnel ou une inhibition alostérique qui modifierait tout de même leur fonction.

Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi les CEI des souris *furless* ne présentent pas un désordre prolifératif tel qu'observé au niveau des kératinocytes des souris invalidées pour la *cathepsine L* (ROTH *et al.*, 2000; REINHECKEL *et al.*, 2005). Il est à noter que le phénomène d'hyperprolifération des kératinocytes qui est observé chez les souris invalidées pour la *cathepsine L* n'a pas été démontré expérimentalement chez les souris *furless* (ROTH *et al.*, 2000).

L'analyse du phénotype intestinal des souris invalidées pour la *cathepsine L* permettrait de vérifier cette hypothèse.

## **3.2. La co-culture des cellules IEC-6/L1 avec des cellules mésenchymateuses**

### **3.2.1. Notre modèle de co-culture dans le contexte actuel**

Tel que suspecté depuis plusieurs années, il a récemment été confirmé que Cdx2 est un régulateur central pour l'établissement de l'identité de l'épithélium intestinal (GAO *et al.*, 2009). L'inactivation conditionnelle de ce facteur de transcription dans l'endoderme murin résulte en un remplacement de l'épithélium intestinal par une population de kératinocytes. Ce phénomène découle d'une activation ectopique du programme de différenciation de l'épithélium du tube digestif proximal (oesophage, dont l'épithélium chez la souris est constitué de kératinocytes). Ainsi, Cdx2, dont l'expression est spécifique à l'intestin grêle et au côlon chez l'adulte, serait un antagoniste du programme de différenciation de l'endoderme proximal. Cette fonction s'effectue principalement via l'induction de facteurs de transcription pro-intestinaux, dont Hnf1 $\alpha$  et Hnf4 $\alpha$ . De plus, les auteurs ont montré que l'inactivation endodermique de Cdx2 affecte les interactions épithélio-mésenchymateuses, causant une augmentation de l'expression de Wnts et de leurs cibles, ainsi qu'une baisse de l'activité engendrée par les Hedgehogs. Ceci suggère que Cdx2 puisse moduler la nature du dialogue épithélio-mésenchymateux menant à la différenciation de l'épithélium intestinal.

Notre modèle de co-culture corrobore ces observations. Nous avons effectivement montré que l'expression de Cdx2 est essentielle à la différenciation des cellules IEC-6 en co-culture. Dans ce contexte, il est fort probable que Cdx2 permette de moduler la maturation appropriée du mésenchyme via l'induction d'une signalisation spécifique de l'épithélium vers les cellules mésenchymateuses. Ces dernières pouvant en retour soutenir la différenciation des cellules épithéliales. Nous avons également démontré que la présence de Cdx2 permet l'induction de facteurs de transcription intestinaux, tels que Hnf1 $\alpha$  et Hnf4 $\alpha$ , dans le compartiment épithélial au cours de la co-culture. Ainsi, notre modèle s'avère être

parfaitement approprié pour l'étude la différenciation épithéliale intestinale, et plus particulièrement des interactions épithélio-mésenchymateuses qui y sont impliquées.

D'autre part, puisque Cdx2 semble être un antagoniste du devenir de kératinocyte chez les cellules endodermiques, le fait que les cellules IEC-6 n'expriment pas Cdx2 soulève une toute nouvelle question : se pourrait-il que ces cellules aient « par défaut » un devenir de kératinocyte? Ainsi, lorsque l'on cultive les cellules IEC-6 en présence de cellules mésenchymateuses, elles pourraient être induites à se différencier en kératinocytes. Comme nous avons restreint nos analyses à la capacité de polarisation, d'expression de marqueurs des fonctions entérocytaires et d'expression de Hnf1 $\alpha$  et Hnf4 $\alpha$ , une différenciation en kératinocytes des IEC-6 dans ce contexte pourrait nous avoir complètement échappée.

### ***3.2.2. Cdx2 : antagoniste d'un facteur endodermique proximal***

Cdx2 est à l'origine du premier événement de différenciation cellulaire qui se produit au cours de l'embryogenèse chez les mammifères. Il est induit dans toutes les cellules de l'embryon au stade de 8 cellules, puis la division cellulaire subséquente entraîne une restriction de son expression dans les 8 cellules externes qui formeront le trophoectoderme. Il a été démontré que lors de la différenciation du trophoectoderme, la fonction première de Cdx2 est de réprimer l'activité d'un autre facteur de transcription, soit Oct3/4 (NIWA *et al.*, 2005). Ainsi, l'activation de Cdx2, ou la répression de Oct3/4, permet la différenciation de ce type cellulaire. De façon particulière, il a été démontré que lorsque Oct3/4 s'attache à un promoteur au niveau de son site de reconnaissance spécifique, il induit la transcription du gène cible. En opposition, lorsque Cdx2 interagit avec Oct3/4 par une association protéine-protéine, le même promoteur est réprimé. L'inverse est également vrai pour les cibles de Cdx2. De plus, ces deux facteurs de transcription ont la capacité de transactiver leur propre transcription, ainsi un débalancement en faveur de l'expression de Cdx2 mène directement à

l'inhibition de la transcription de Oct3/4, et vice versa. L'avènement des divisions asymétriques lors du passage de l'embryon de 8 à 16 cellules, permet d'obtenir des cellules internes présentant une concentration plus élevée de Oct3/4 et des cellules externes avec plus de Cdx2. Ceci permet l'inhibition réciproque de l'activité de Cdx2 et de Oct3/4 dans chacun de ces feuilletts cellulaires.

Un principe semblable pourrait s'appliquer à la différenciation de l'épithélium intestinal. Ainsi, il pourrait y avoir un facteur endodermique proximal (FEP), exprimé très tôt au cours du développement embryonnaire et qui par défaut, déterminerait les cellules souches d'origine endodermique à un devenir de kératinocyte. L'induction de Cdx2 dans la portion distale du tube digestif pourrait venir antagoniser la fonction de ce FEP, afin de permettre un devenir épithélial intestinal. Plusieurs études ont démontré une faible expression de Cdx2, ainsi qu'une régulation négative de son activité dans les CEI souches et fortement prolifératives (BOULANGER *et al.*, 2005; RINGS *et al.*, 2001). Il serait ainsi possible que ce processus d'inhibition soit également en jeu au cours de la différenciation cellulaire le long de l'axe crypte-villosité.

Les cellules IEC-6 pourraient exprimer ce FEP, celui-ci étant alors responsable de l'inhibition de la transcription de *Cdx2*, et avoir perdu la capacité d'activer les voies moléculaires essentielles à la transactivation de Cdx2 au cours de leur immortalisation en culture. Lors de l'induction exogène de Cdx2 dans les IEC-6/L1, ce dernier pourrait s'associer au promoteur de certains de ses gènes cibles et les transactiver (SUH et TRABER, 1996). Par contre, la co-expression du FEP dans ces cellules viendrait antagoniser, de façon partielle ou totale, l'activité de Cdx2, ce qui pourrait être en cause lors de la vague de prolifération excessive et l'empilement cellulaire qui font suite au ralentissement de la prolifération premièrement observé (SUH et TRABER, 1996). Dans le tissu normal, la co-expression de Cdx2 et de ce FEP ne se ferait jamais à force égale, vu leur inhibition

réci-proque et la régulation appropriée de l'expression de Cdx2 par la signalisation épithélio-mésenchymateuse.

Dans le contexte de la co-culture, la signalisation en provenance du mésenchyme est rétablie. Ceci permet probablement la ségrégation entre une population cellulaire de type « souche », qui pourrait exprimer plus fortement le FEP, et une population cellulaire en voie de différenciation vers un devenir épithélial intestinal, dans laquelle l'expression de Cdx2 serait progressivement stabilisée. Des analyses par immunolocalisation ont effectivement montré que l'augmentation protéique de Cdx2 se produit dans les îlots de cellules polarisées uniquement (résultat non présenté). L'équilibre entre les deux populations cellulaires semble avoir une grande importance, puisqu'une population stable de cellules IEC-6 infectées avec un vecteur lentiviral permettant une forte expression de Cdx2, ne se différencie pas dans les conditions de co-culture (résultat non présenté).

Une caractérisation plus approfondie du modèle de co-culture pourra permettre de mieux comprendre les événements moléculaires qui mènent à la différenciation des CEI. Le profilage de l'expression génique mésenchymateux qui a récemment été entrepris permettra d'éclaircir la nature des interactions épithélio-mésenchymateuses qui entre en jeu. Il serait particulièrement intéressant de vérifier la nature de cette signalisation à très court terme (entre jour 1 et 3, par exemple), afin de déterminer la modulation de l'expression génique mésenchymateuse qui est induite par la présence de Cdx2 dans le compartiment épithélial.

### **3.2.3. *Hnf4 $\alpha$* et la différenciation épithéliale intestinale**

Le profilage progressif de l'expression génique au cours de la co-culture a démontré que l'induction de *Hnf4 $\alpha$*  se produit légèrement avant (entre le jour 3 et 5) la modulation de la majorité des marqueurs fonctionnels des CEI (entre le jour 5 et 8). Cette activation

s'effectue de façon dépendante des interactions épithélio-mésenchymateuses induites par la présence de Cdx2. De plus, l'expression exogène de Hnf4 $\alpha$  dans le modèle IEC-6 cause l'activation de plusieurs molécules distinctives des CEI matures. Toutefois, cette régulation transcriptionnelle engendrée par Hnf4 $\alpha$  s'effectue majoritairement de façon indépendante de Cdx2. En effet, les gènes induits, dont *Hnf1 $\alpha$* , étaient modulés tant en présence qu'en absence de Cdx2 (IEC-6 et IEC-6/L1; résultats non présentés). Donc, l'expression de Hnf4 $\alpha$  est dépendante de Cdx2, ce qui a également été observé *in vivo* (GAO *et al.*, 2009), mais Hnf4 $\alpha$  régule la transcription génique de façon indépendante de Cdx2. Où Hnf4 $\alpha$  s'insère-t-il dans la régulation fonctionnelle des CEI ?

Cdx2 est le régulateur central (master gene) du devenir épithélial intestinal (GAO *et al.*, 2009). Sans Cdx2, une cellule souche d'origine endodermique distale est guidée vers un devenir proximal, et suivant son induction, une cellule souche d'origine endodermique proximale est instruite à un devenir intestinal (BECK *et al.*, 1999; SILBERG *et al.*, 2002). Toutefois, une étude bioinformatique, basée sur l'analyse des promoteurs des gènes les plus fortement activés au cours de la différenciation des CEI, a suggéré que Hnf4 $\alpha$  soit le régulateur le plus important pour l'expression génique des CEI différenciées, et plus particulièrement au niveau du métabolisme lipidique (STEGMANN *et al.*, 2006). Cette importante fonction de Hnf4 $\alpha$  n'est toutefois pas exclusive à l'intestin. En effet, Hnf4 $\alpha$  a également été identifié comme un régulateur central des fonctions métaboliques du pancréas et du foie. Une étude à l'échelle génomique a effectivement démontré que ce facteur de transcription occupe le promoteur de près de la moitié des gènes transcriptionnellement actifs dans ces deux organes (ODOM *et al.*, 2004). Ainsi, Hnf4 $\alpha$  n'est pas un régulateur du devenir épithélial intestinal, il est le régulateur central de fonctions métaboliques partagées par plusieurs épithéliums, tels le foie, le pancréas et l'intestin.



### **3.3. Invalidation de *Hnf1α* : Impact au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle**

#### **3.3.1. L'intestinalomégalie des souris *Hnf1α* KO**

##### **3.3.1.1. La dérégulation de mTOR via une perte de l'activité de l'AMPK**

Les souris invalidées pour *Hnf1α* présentent une intestinalomégalie caractérisée par une augmentation de l'activité de mTOR, qui est, de toute évidence, causée par une diminution de l'expression protéique de TSC2. Lors de nos différentes analyses visant à déterminer la signalisation impliquée dans la dégradation de TSC2 chez les souris *Hnf1α* KO, nous avons déterminé qu'une inactivation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK) n'était pas en cause. Cette conclusion s'avère peut-être fausse.

L'AMPK est une sérine/thréonine kinase qui joue un rôle très important dans la régulation de l'homéostasie énergétique cellulaire et systémique. En effet, cette kinase permet l'adaptation cellulaire aux variations environnementales et nutritionnelles qui induisent une diminution du niveau de l'ATP intracellulaire. Dans une situation où les niveaux d'énergie (ATP) sont faibles, elle est activée par une interaction directe avec l'AMP (activation allostérique) combinée à une phosphorylation réversible de la sous-unité AMPK $\alpha$  sur la Thr172. La présence de l'AMP associée à l'AMPK empêche sa déphosphorylation, et donc son inactivation (VIOLLET *et al.*, 2009). En général, l'activation de l'AMPK amène une inactivation des voies anaboliques, telles la biosynthèse des acides gras et du cholestérol, afin de favoriser les voies cataboliques qui produisent de l'ATP, telles l'oxydation des acides gras, l'entrée de glucose et la glycolyse. L'AMPK a la capacité de moduler la croissance cellulaire via une stabilisation de TSC2 par phosphorylation, ce qui consolide le complexe TSC1/TSC2 et inhibe l'activation de mTOR (HARDIE, 2004). L'inhibition de mTOR par l'AMPK constitue ainsi un frein à la croissance cellulaire induite par une signalisation dépendante des facteurs de croissance. Ces derniers sont connus pour causer une

déstabilisation du complexe TSC1/TSC2 par une phosphorylation inhibitrice de TSC2 par AKT (SHAW, 2006). En plus de son activité sur mTOR, l'AMPK a également la capacité d'induire un arrêt du cycle cellulaire via la phosphorylation de p53. Elle agit ainsi comme un point de contrôle qui va permettre d'arrêter le cycle cellulaire avant qu'il n'y ait plus d'énergie pour supporter la viabilité de la cellule et de l'organe (JONES *et al.*, 2005).

Une concentration élevée de glucose intracellulaire est directement liée à une production d'énergie sous forme d'ATP. Ainsi, de fortes concentrations de glucose mènent à l'inactivation de l'AMPK. Lors de l'entrée du glucose dans l'entérocyte, ce dernier peut prendre deux voies différentes avant d'être largué dans la circulation sanguine : il peut traverser directement la cellule ou être transformé en glucose-6-phosphate (G6P), cette seconde option nécessitera alors une reconversion en glucose avant sa sortie de la cellule (STÜMPEL *et al.*, 2001). Le glucose-6-phosphate transporteur (G6PT; *SLC37A4*) est responsable du transport du G6P du cytoplasme à la lumière du réticulum endoplasmique où il sera hydrolysé en glucose et phosphate, par la glucose-6-phosphatase (G6Pase). Nous avons montré chez les souris *Hnf1α* KO que l'assimilation du glucose par la circulation sanguine se fait à un rythme beaucoup moins élevé que dans les souris contrôles. Ce qui pourrait se traduire par un transport ralenti du glucose à l'intérieur des entérocytes. Ce phénomène est d'autant plus probable, que l'expression des ARNm de la G6Pase et du G6PT sont diminuées de plus de 3 fois dans les souris mutantes. Ainsi, dans les souris *Hnf1α* KO, le glucose qui est phosphorylé se retrouverait coincé sous la forme de G6P dans les entérocytes, causant ainsi un délai de sa libération dans la circulation sanguine. Un phénomène semblable a été décrit récemment dans les souris invalidées pour le récepteur nucléaire FXR, qui présentent une diminution de l'expression de la G6Pase au niveau de l'épithélium intestinal (VAN DIJK *et al.*, 2009). De plus, la sortie du glucose vers la

circulation sanguine se fait, en majeure partie, via une diffusion facilitée, dépendante du gradient de glucose entre le cytoplasme et la circulation sanguine. Il est donc fort à parier que la sortie du glucose chez les personnes diabétiques soit également ralentie par les concentrations sanguines élevées de ce dernier. L'ensemble de ces observations indique qu'il y a probablement une rétention importante de glucose dans les entérocytes des souris *Hnfl $\alpha$*  KO lorsqu'elles s'alimentent, et ce sous la forme de G6P, qui est de surcroît la source de départ de la glycolyse et de la production d'ATP. Ceci suggère fortement une inhibition prolongée de l'activité de l'AMPK dans l'épithélium de l'intestin grêle des souris *Hnfl $\alpha$*  KO suite à la prise de nourriture. De plus, ces souris sont polyphages (PONTOGLIO *et al.*, 1996), ce qui laisse croire à de fréquentes périodes où l'activité de l'AMPK serait inhibée. De façon similaire, il a été démontré que les personnes diabétiques développent une hypertrophie des reins qui est due à une augmentation de l'activité de mTOR au niveau de l'épithélium des tubules rénaux. Cette dernière est causée par une inhibition de l'AMPK par une concentration élevée de glucose intracellulaire (LEE *et al.*, 2007).

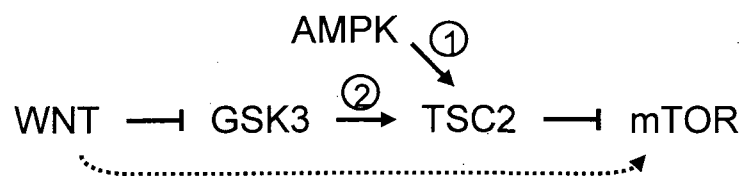
À un mois, l'intestin grêle des souris *Hnfl $\alpha$*  KO présentent une augmentation significative de la prolifération cellulaire et de sa longueur, mais pas encore une augmentation significative du taux de fission cryptale, du poids par mm et de l'activité de mTOR (phospho S6). Cela suggère que la dérégulation de l'épithélium commence à prendre place autour de cette période. Nous avons démontré qu'à 21 jours, moment où l'on sépare les souriceaux de leur mère, il y a une tendance vers une diminution de l'expression de TSC2 dans les souris *Hnfl $\alpha$*  KO, cette baisse d'expression protéique devenant significative suite à la première semaine suivant le sevrage. Nous avons également montré que l'inactivation de *Hnfl $\alpha$*  mène à une diminution significative de près de 80% du messenger de la *lactase* chez les souris nouveau-nés (résultats section IV). Ceci indique que la digestion du lactose est

probablement défaillante chez ces souris, et donc l'absorption du glucose par les entérocytes doit être très faible avant le sevrage. Malgré les études démontrant l'implication de *Hnfl $\alpha$*  dans la régulation transcriptionnelle de la sucrase-isomaltase (BOUDREAU *et al.*, 2001; 2002), son expression n'est pas modulée dans les souris *Hnfl $\alpha$*  KO (BOSSE *et al.*, 2006). Ainsi, l'absorption du glucose doit se faire adéquatement à partir du moment du sevrage, lorsque la diète permet un apport de sucrose, causant alors l'inactivation de l'AMPK de façon inappropriée, ce qui pourrait venir amplifier le phénotype intestinal de ces souris.

L'entrée de nourriture dans le système digestif induit le relâchement d'une panoplie d'enzymes digestives en provenance du pancréas, ce qui rend difficile l'obtention d'extraits protéiques stables, surtout en ce qui a trait à leur statut de phosphorylation. Nous avons donc choisi d'effectuer nos analyses westerns avec des protéines extraites à partir de tissus de souris privées de nourriture depuis plus de 16 heures. Malencontreusement, le jeûne cause une activation de l'AMPK. Donc, lorsque nous avons effectué nos extraits protéiques, les niveaux de phosphorylation de l'AMPK étaient élevés, tant chez les souris *Hnfl $\alpha$*  KO que les souris contrôles. Afin de maintenir l'équilibre énergétique de l'entérocyte, l'activité de l'AMPK est probablement inhibée et activée selon un cycle parallèle à la prise alimentaire. Ce qui rend l'analyse de son niveau d'activité dans un groupe d'animaux assez complexe. Afin de visualiser une inhibition prolongée de l'activité de l'AMPK chez les souris *Hnfl $\alpha$*  KO en comparaison aux souris contrôles, nous pourrions refaire une expérience de gavage au glucose sur des souris à jeûne et récolter les tissus à différents moments suivant le traitement. Puisque des extraits protéiques stables seraient difficiles à obtenir dans ces conditions, la visualisation de l'activité de l'AMPK pourrait se faire par immunolocalisation sur des coupes de tissus. D'autre part, il faudrait valider par immunobuvardage ou immunolocalisation la diminution de l'expression de la G6Pase et du G6PT.

### 3.3.1.2. L'AMPK et la voie de signalisation des Wnts

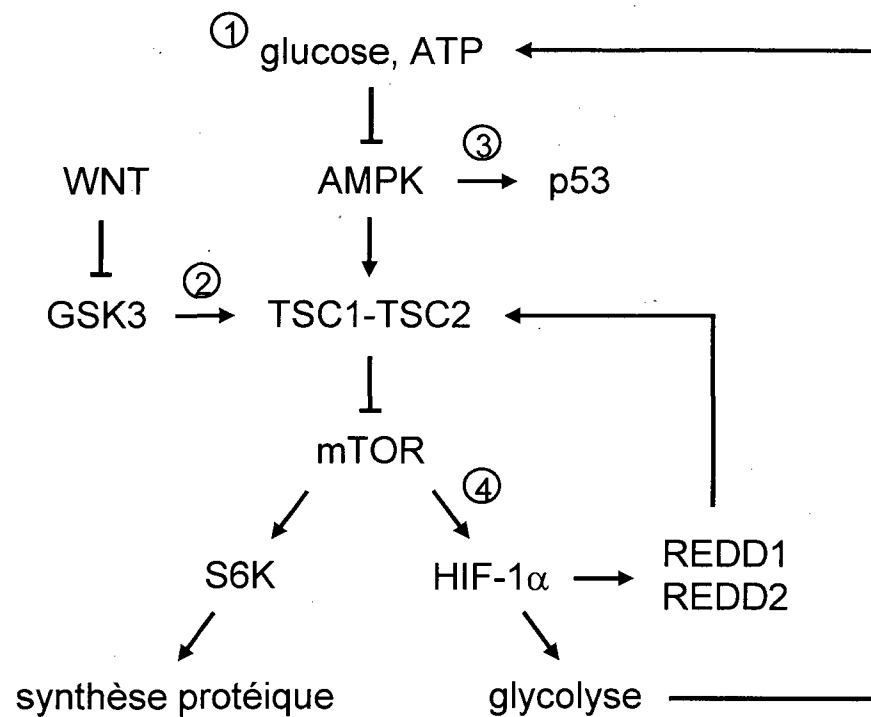
Au niveau de l'intestin grêle, un phénotype caractérisé par une augmentation du nombre de cellules de Paneth, de la prolifération cellulaire et du taux de fission cryptale (donc augmentation du nombre de cellules souches), suggère une augmentation de la signalisation via la voie de signalisation des Wnts (ANDREU *et al.*, 2005; 2008). Nous avons cependant démontré qu'il n'y a pas d'augmentation de la signalisation canonique des Wnts dans les souris *Hnfl $\alpha$*  KO. Au cours des dernières années, il a été démontré que les Wnts peuvent induire l'activité de mTOR via une inhibition de la GSK3 (INOKI *et al.*, 2006). Au cours de cette même étude, il a été montré que la stabilisation de TSC2 par la phosphorylation de la GSK3 nécessite une phosphorylation préalable de TSC2 par l'AMPK (Figure 16). Ainsi, si la phosphorylation de TSC2 par l'AMPK est inhibée dans les entérocytes des souris *Hnfl $\alpha$*  KO, la phosphorylation de TSC2 par la GSK3 est également inhibée. Cela correspond exactement au même résultat que nous observerions si une augmentation de la signalisation des Wnts viendrait bloquer l'activité de la GSK3 sur TSC2. Il est donc possible que les modifications phénotypiques que nous observons, et qui sont généralement attribuées à une augmentation de la signalisation engendrée par les Wnts, correspondent à cette voie de signalisation qui passe par la GSK3 et TSC2.



**Figure 16. Induction de mTOR par les Wnts.** Une augmentation de la signalisation par les Wnts induit une inhibition de la GSK3, ce qui mène à une activation de mTOR (trait pointillé). La GSK3 stabilise TSC2 via une phosphorylation. La phosphorylation de TSC2 par l'AMPK (1) est préalable et essentielle à la phosphorylation de TSC2 par la GSK3 (2).

### 3.3.1.3. *REDD2* et la régulation de mTOR

« Hypoxia-induced-factor-1 » (HIF-1) est un complexe protéique composé d'une sous-unité  $\beta$  constitutive et d'une sous-unité  $\alpha$  stabilisée par l'hypoxie. Ce facteur de transcription s'attache au « hypoxia-responsive-element » (HRE) retrouvé sur les promoteurs de ses gènes cibles. À l'origine, il a été caractérisé comme un stimulateur de l'angiogenèse, mais il est également reconnu comme un important promoteur de la glycolyse. Il a été démontré que l'activation de mTOR induit la traduction de HIF-1 $\alpha$ , ce dernier permettant alors la transactivation de *REDD1* et *REDD2* (SHAW *et al.*, 2006). L'expression de ces deux molécules crée une boucle de rétro-inhibition de mTOR, via une stabilisation de TSC2. L'expression de l'ARNm de *REDD1* est augmentée de façon significative dans l'intestin grêle des souris *Hnfl $\alpha$  KO*, à partir de l'âge de 1 mois (50%; RT-PCRq; résultat non présenté). Toutefois, l'expression de *REDD2* est diminuée de près de 75%. Les études effectuées jusqu'à maintenant ont démontré des fonctions très similaires pour *REDD1* et *REDD2*, mais il n'y a pas d'anticorps spécifique disponible permettant l'étude de *REDD2* uniquement. Puisque l'expression de *REDD2* augmente de façon importante au moment du sevrage chez la souris, il est probable qu'il ait un rôle à jouer au niveau des changements qui surviennent au cours de cette période de transition dans l'épithélium intestinal. Vu son rôle d'inhibiteur de mTOR, il pourrait être important pour réguler l'arrêt naturel de la croissance intestinale suite au sevrage. Son expression pourrait donc être induite à ce moment par *Hnfl $\alpha$* . Ainsi, l'importante diminution de *REDD2* dans l'épithélium des souris *Hnfl $\alpha$  KO* pourrait être directement impliquée dans l'augmentation de l'activité de mTOR, tel que proposé dans la discussion du manuscrit 3. D'autre part, s'il y a vraiment une diminution de l'AMPK dans cet épithélium, la diminution de *REDD2* pourrait également empêcher la rétro-inhibition induite par HIF-1 et amplifier l'activation de mTOR (Figure 17).



**Figure 17. Inactivation de l'AMPK dans les souris *Hnf1α* KO.** 1) Une augmentation de la fréquence et de la période de transit du glucose dans les entérocytes mènerait à une inhibition prolongée de l'AMPK. Ceci causerait la déstabilisation protéique de TSC2 et une activation de mTOR. 2) La diminution de la phosphorylation de TSC2 par l'AMPK inhiberait l'activité de la GSK3, causant ainsi un phénotype semblable à une augmentation de la signalisation des Wnts. 3) L'inactivation de l'AMPK causerait une perte de l'activation de P53, ce qui pourrait être directement lié à l'augmentation de la prolifération cellulaire. 4) La diminution de l'expression de REDD2, pourrait empêcher une rétro-inhibition efficace de mTOR induite par la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ , ce qui prolongerait sa période d'activation.

### 3.3.2. *Hnf1 $\alpha$* et le devenir des cellules entéroendocrines dans l'intestin grêle

#### 3.3.2.1. L'épithélium intestinal et le diabète de type MODY-3

Lors de la prise alimentaire, le glucose assimilé par les entérocytes est relâché dans la circulation sanguine. Les cellules  $\beta$  du pancréas réagissent à cette augmentation du glucose circulant par la sécrétion de l'insuline. Cette hormone, qui agit de façon à diminuer la glycémie, a une fonction centrale dans le contrôle de l'homéostasie du glucose. Elle agit majoritairement au niveau des muscles squelettiques et du tissu adipeux, où elle accentue son absorption, ainsi qu'au niveau du foie, où elle bloque sa production et favorise la synthèse de glycogène (SESTI, 2006). Lorsque l'insuline ne peut effectuer ses fonctions, le glucose n'est plus métabolisé, ce qui cause une hyperglycémie soutenue et donc l'apparition du diabète.

Le MODY (maturity onset diabetes of the young) est une forme de diabète de type 2 qui se développe chez les enfants ou les jeunes adultes et qui est associée à une dysfonction de la sécrétion de l'insuline. Le diabète de type MODY-3 est dû à des mutations au niveau du gène encodant pour *HNF1A*. Le MODY-3 est l'un des 2 types de MODY les plus fréquents et constitue l'une des formes des plus sévères (VELHO *et al.*, 2003). L'inactivation de *Hnf1 $\alpha$*  chez la souris cause une hyperglycémie liée à un problème de sécrétion de l'insuline, tel qu'observé chez l'humain. Ceci en fait un très bon modèle pour l'étude du MODY-3 (LEE *et al.*, 1998; PONTOGLIO *et al.*, 1998). Il a été démontré que ces souris ne présentent pas de défauts majeurs au niveau des îlots de Langerhans, dont les cellules  $\beta$  synthétisent de l'insuline et la sécrètent lorsqu'elles sont induites via une dépolarisation membranaire (DUKES *et al.*, 1998). De plus, lorsque l'on gavage les souris avec une solution de glucose, la glycémie forcée décroît au même rythme chez les souris *Hnf1 $\alpha$*  KO que les contrôles (manuscrit 3; LEE *et al.*, 1998), indiquant une libération fonctionnelle d'insuline. Ceci suggère que c'est le seuil de tolérance au glucose des cellules



$\beta$  qui est plus élevé chez les souris *Hnfl $\alpha$  KO*, un phénomène étroitement lié au diabète de type 2. Cette défaillance dans la sécrétion de l'insuline est en partie expliquée par la perte de l'expression du transporteur GLUT2 au niveau des îlots pancréatiques. GLUT2 est localisé à la membrane des cellules  $\beta$ , et il maintient l'équilibre entre les niveaux intracellulaire et extracellulaire du glucose. Il est le principal responsable de l'entrée massive du glucose dans les cellules  $\beta$  lorsque les niveaux sanguins sont élevés, et c'est cette augmentation du glucose intracellulaire qui va mener à la sécrétion de l'insuline. Cependant, la réintroduction de *Hnfl $\alpha$*  spécifiquement au niveau du pancréas de ces souris permet d'augmenter leur sécrétion d'insuline (effet très variable entre les individus), sans toutefois diminuer leur glycémie (LIN *et al.*, 2008). Ceci indique qu'il y a d'autres tissus qui sont impliqués dans le phénotype diabétique de ces souris, ce qui pourrait être également le cas chez les sujets humains.

L'existence de stimulants biochimiques des fonctions pancréatiques d'une origine gastro-intestinale est suspectée depuis plus de 100 ans (MOORE *et al.*, 1906). L'observation que l'administration de glucose via la voie orale induit une plus grande sécrétion d'insuline qu'une injection intraveineuse a confirmé qu'il y a une connexion entre le tractus gastro-intestinal et les cellules  $\beta$  du pancréas (MCINTYRE *et al.*, 1964). Les incrétines sont des médiateurs endocriniens produits par des cellules entéroendocrines du tractus gastro-intestinal en réponse aux nutriments, et qui induisent la sécrétion de l'insuline par le pancréas. Ils sont deux, soit le polypeptide insulino-tropique glucose-dépendant (GIP) et le peptide glucagon-like 1 (GLP-1). Le gène encodant pour le *GIP* est exprimé par les cellules K alors que le GLP-1 est produit par les cellules L, suite à la conversion du peptide encodé par le gène du proglucagon. Ces deux molécules sont sécrétées lors de la prise alimentaire et, lorsqu'il y a augmentation du glucose sanguin, elles induisent la sécrétion d'insuline avec

une efficacité comparable. L'invalidation du GIP ou du GLP-1 chez la souris cause l'apparition d'un diabète, et les personnes atteintes d'un diabète de type 2 présentent des niveaux très bas d'incrétines, ainsi qu'une résistance à l'action du GIP. Des agonistes de GLP-1 sont actuellement utilisés pour traiter le diabète de type 2 (RANGANATH, 2008). À l'inverse, une seule hormone gastro-intestinale a la capacité d'inhiber la sécrétion d'insuline chez l'humain et la souris, la ghréline. Au cours du développement embryonnaire, la ghréline est également sécrétée par certaines cellules des îlots de Langerhans, mais cette expression est progressivement perdue au cours des deux premières semaines suivant la naissance des souriceaux. L'administration chronique d'agoniste de la ghréline chez des personnes saines cause une hyperglycémie et une résistance à l'insuline. De façon opposée, l'ablation de la signalisation dérivée de la ghréline dans des souris diabétiques améliore la tolérance au glucose et augmente la sécrétion de l'insuline (CAMILLERI *et al.*, 2009).

Nous avons montré que les souris invalidées pour *Hnf1 $\alpha$*  ont un nombre réduit de cellules entéroendocrines exprimant la chromogranine A, ainsi qu'une dérégulation de l'expression de plusieurs hormones produites par ces cellules. Parmi ces hormones, le GIP (incrétine) est diminué et la ghréline est augmentée, et ce, de façon significative dès la première journée suivant leur naissance. Ceci indique que dès leur naissance, un niveau élevé de ghréline pourrait être sécrété dans le sang des souriceaux *Hnf1 $\alpha$*  KO, et agir au niveau du pancréas pour réduire la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ . En parallèle, les niveaux réduits d'incrétines ne pourraient contre-balancer l'activité inhibitrice de la ghréline sur la sécrétion d'insuline. Cette fonction intestinale très précoce de *Hnf1 $\alpha$*  dans le contrôle de la sécrétion de l'insuline pourrait expliquer pourquoi les patients atteints du diabète de type MODY-3 présentent une diminution de la sécrétion de l'insuline avant même l'apparition de signes cliniques de la maladie (BYRNE *et al.*, 1996).

Quelques expériences pourront confirmer l'implication d'une augmentation de la sécrétion de ghréline dans le diabète des souris *Hnf1α* KO. Tout d'abord, il faudra s'assurer qu'il y a effectivement plus de ghréline et moins d'incrétines (GIP et GLP-1) sous leur forme active dans la circulation sanguine des souris KO. Il est à noter que les incrétines sont rapidement inactivées par la protéase dipeptidyl-peptidase-IV suite à leur sécrétion (KIEFFER *et al.*, 1995). Ainsi, la diminution de l'expression de ces molécules pourrait être compensée par une activité prolongée dans la circulation sanguine. Ultimement, il faudrait vérifier si l'administration d'inhibiteurs de la ghréline permettrait de réduire la glycémie des souris *Hnf1α* KO. Cette démonstration serait sans équivoque.

### **3.3.2.2. *Hnf1α* et la régulation de l'expression de la ghréline**

L'épithélium de l'intestin grêle contient plus de dix différents types de cellules entéroendocrines, classifiées selon le ou les types d'hormones qu'elles sécrètent. Les études effectuées jusqu'à présent indiquent que ces cellules sont toutes dérivées d'un même précurseur multipotent, exprimant le facteur de transcription neurogenine 3 (JENNY *et al.*, 2002). La différenciation de ce précurseur en une cellule spécialisée dans la synthèse et la sécrétion d'une hormone particulière (ou de certaines) sera subséquentement orchestrée par un ensemble de facteurs de transcription, dont l'expression sera transitoire ou maintenue dans la cellule mature. Ces facteurs ne sont pas tous identifiés et la nature de leurs interactions est loin d'être élucidée. Toutefois, les études d'inactivation chez la souris ont permis d'élargir nos connaissances. Ainsi, l'inactivation du gène *Neurod1/BETA2* a démontré que ce dernier est essentiel pour l'expression de la cholécystokinine (CCK) et de la sécrétine (NAYA *et al.*, 1997). Le tableau 6 présente une compilation des gènes modulés dans l'intestin grêle des souris lors de l'inactivation de *Pax4* (LARSSON *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2008), *Pax6*

(HILL *et al.*, 1999; LARSSON *et al.*, 1998), *Nkx2.2* (DESAI *et al.*, 2008) et *Hnf1 $\alpha$*  (manuscrit 3).

**Tableau 6.** Modulation de l'expression des hormones et facteurs de transcription impliqués dans le devenir des cellules entéroendocrines dans différents modèles de souris knockout

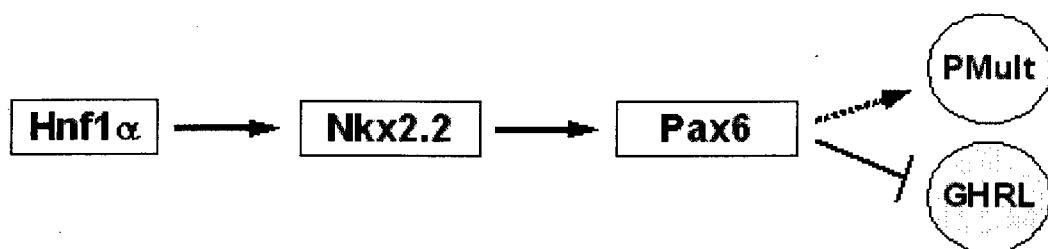
Hormones	<i>Pax4</i> KO	<i>Pax6</i> KO	<i>Nkx2.2</i> KO	<i>Hnf1<math>\alpha</math></i> KO
Ghréline	↑	?	↑	↑
GIP	↓	↓	↓	↓
CCK	↓	=	↓	=*
Secretine	↓	=	=	↓*
Neurotensine	?	?	↓	↓
Somatostatine	↓	↓	↓	↓
PYY	↓ <sup>p</sup>	=	=	↓*
Glucagon	=	↓	↓	=*
Facteurs de transcription	<i>Pax4</i> KO	<i>Pax6</i> KO	<i>Nkx2.2</i> KO	<i>Hnf1<math>\alpha</math></i> KO
Neurog3	=	=	=	=
NeuroD1	=	=	↓	=
<i>Pax4</i>	KO	=	=	=*
<i>Pax6</i>	=	KO	↓	↓
<i>Nkx2.2</i>	?	=	KO	↓*
<i>Hnf1<math>\alpha</math></i>	?	?	?	KO

= : pas de modification d'expression; ↑: augmentation et ↓: diminution de l'expression  
 \* données significatives dans l'analyse par micropuce à ADN, non validées par RT-PCRq  
<sup>p</sup> dans le duodénum et le jéjunum, cette modulation n'est pas observée dans l'iléon

Il y a quelques autres facteurs de transcription qui ont été impliqués dans la différenciation des cellules entéroendocrines. Ceux présentés dans le tableau 6 sont d'un intérêt particulier puisque leur invalidation a mené, tout comme pour *Hnf1 $\alpha$* , à une augmentation de l'expression de la *ghréline*. L'invalidation de *Pax4* cause une perte d'expression de pratiquement toutes les hormones endocrines exprimées au niveau du duodénum, au profit de l'expression de la *ghréline* (LARSSON *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2008). *Pax4* ayant été démontré comme répresseur direct du promoteur de la *ghréline* (WANG *et al.*, 2008), il est suggéré que sa fonction première soit de réprimer cette dernière, afin de donner un environnement cellulaire « permissif » à la différenciation du précurseur en un autre type de

cellule entéroendocrine. Ainsi, lorsque *Pax4* est invalidé, la ghréline est produite et les autres hormones demeurent réprimées. Il a été démontré que *Hnf1 $\alpha$*  peut collaborer avec la neurogénine 3 afin d'induire l'expression de *Pax4* (SMITH *et al.*, 2003). Cependant, l'expression de *Pax4* n'est pas modulée dans le jéjunum des souris *Hnf1 $\alpha$*  KO dans nos analyses par micropuces à ADN. Toutefois, l'expression du messager de *Pax6* est réduite significativement de plus de 25% ( $P < 0.05$ ; RT-PCRq) dans les nouveaux nés, et les adultes de 1 et 4 mois invalidés pour *Hnf1 $\alpha$* . Les domaines de liaison à l'ADN de *Pax4* sont à plus de 65% identiques à ceux de *Pax6*, avec lequel il partage la même séquence consensus de reconnaissance sur l'ADN (INOUE *et al.*, 1998). L'invalidation de *Pax6* chez la souris cause la perte d'un nombre plus restreint d'hormones endocriniennes dans l'intestin grêle que la perte de *Pax4* (HILL *et al.*, 1999; LARSSON *et al.*, 1998). Toutefois, leurs actions spécifiques semblent complémentaires selon l'axe proximo-distal, puisque *Pax4* est impliqué dans la régulation spécifique des hormones proximales (CCK, Sécrétine, PYY dans le duodénum) alors que *Pax6* régulent des hormones plus distales (Glucagon-like peptides : GLP-1 et GLP-2). Il a été démontré que la perte de *Pax6* dans le pancréas cause l'augmentation du nombre de cellules exprimant la ghréline (cellules  $\epsilon$ ) au détriment des cellules exprimant le glucagon (cellules  $\alpha$ ). Ceci suggère que *Pax6* pourrait être également un répresseur de la ghréline (HELLER *et al.*, 2005). Ainsi, même si une augmentation de l'expression de cette hormone n'a pas encore été rapportée dans l'intestin grêle des souris *Pax6* KO (l'intérêt pour la ghréline n'est que très récent), il y a de forte chance pour que ce soit le cas. L'invalidation du facteur de transcription *Nkx2.2* a été rapporté récemment (WANG *et al.*, 2004) et l'impact de sa perte sur la régulation des cellules endocrines ressemble fortement à celui des souris *Hnf1 $\alpha$*  KO (tableau 6; DESAI *et al.*, 2008). Les auteurs suggèrent que l'augmentation de l'expression de la ghréline dans ces souris soit due à

la perte de l'expression de Pax6. Il est intéressant de noter que l'expression de *Nkx2.2* est réduite significativement de 20% dans les souris *Hnf1α* KO dans l'analyse par micropuce à ADN. De plus, un site de liaison pour *Hnf1α* est présent dans le promoteur de *Nkx2.2* chez l'humain, le rat et la souris, indiquant que *Hnf1α* pourrait être en partie responsable de son expression. Toutes ces observations permettent de suggérer que la régulation de l'expression de la ghréline dans les cellules entéroendocrines de l'épithélium digestif par *Hnf1α* pourrait dépendre d'une cascade de régulation impliquant *Nkx2.2* et Pax6 (Figure 18). Il faut cependant préciser que nos analyses de micropuces à ADN ont été effectuées avec des tissus provenant du jéjunum distal, région où Pax4 n'est pas fortement impliqué dans la régulation des hormones entéroendocrines. Ainsi, nos résultats n'excluent pas la possibilité d'une modulation de Pax4 dans le duodénum des souris invalidées pour *Hnf1α* KO. Des analyses par RT-PCRq devront être effectuées dans les différentes régions de l'intestin grêle le long de l'axe proximo-distal afin de confirmer la modulation de l'expression de *Nkx2.2*, Pax6 et Pax4.



**Figure 18. Régulation de l'expression de la ghréline par *Hnf1α*.** *Hnf1α* est exprimé dans le précurseur des cellules entéroendocrines de l'intestin grêle où il participerait à l'induction de l'expression de *Nkx2.2*. Ce dernier induit l'expression de *Pax6*, qui réprime l'expression de la ghréline (*GHRL*) afin de permettre au précurseur multipotent (PMult) de se différencier en une cellule qui sécrète un autre type d'hormone que la ghréline.

### 3.4. *Hnf4 $\alpha$* et *Hnf1 $\alpha$* dans la muqueuse de l'intestin grêle

#### 3.4.1. *Hnf4 $\alpha$* , *Hnf1 $\alpha$* et la barrière épithéliale

Au cours du développement embryonnaire, lors de la période de cytodifférenciation de l'intestin grêle (E14,5-E16,5), l'endoderme pseudostratifié sera transformé en un épithélium simple cylindrique qui, en plus de ces fonctions digestives, aura une importante fonction de barrière. Cette barrière sera à la fois étanche et sélectivement perméable aux nutriments et solutés (GROSCWITZ et HOGAN, 2009).

Nous avons montré que l'expression de *Hnf4 $\alpha$*  et de *Hnf1 $\alpha$*  est induite de façon coordonnée avec la polarisation des cellules IEC-6/L1, lorsqu'elles sont cultivées sur une monocouche de cellules mésenchymateuses. De plus, l'introduction de *Hnf4 $\alpha$*  dans les cellules IEC-6/L1 a permis une induction rapide de *Hnf1 $\alpha$* , ainsi que l'obtention d'une barrière épithéliale étanche et effectuant du transport vectoriel dans les conditions de co-culture. L'expression unique de *Hnf1 $\alpha$*  n'a toutefois pas permis d'induire l'expression de *Hnf4 $\alpha$*  et de modifier la dynamique de la co-culture (Manuscrit 2). En plus de son implication classique dans la régulation de gènes impliqués dans les fonctions métaboliques, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont également montré que *Hnf4 $\alpha$*  a la capacité de réguler l'expression, ou la localisation appropriée, de molécules des jonctions cellulaires (BATTLE *et al.*, 2006; CHIBA *et al.*, 2003; PARVIZ *et al.*, 2003). Ainsi, sa réintroduction dans des fibroblastes mène à une épithélialisation, caractérisée par l'expression de la E-cadhérine et de la ZO-1, et leur localisation membranaire dans les zones de contact cellule-cellule (PARVIZ *et al.*, 2003). Dans l'ensemble, ces observations suggèrent un rôle pour *Hnf4 $\alpha$*  dans la promotion et le maintien de la barrière épithéliale intestinale, ainsi que dans l'induction de l'expression de *Hnf1 $\alpha$*  au cours de ces processus.

Malgré toutes ces évidences, l'invalidation de *Hnf4 $\alpha$*  spécifiquement au niveau de la muqueuse intestinale chez la souris, ne mène pas à une désorganisation majeure de l'épithélium de l'intestin grêle (BABEU *et al.*, 2009). De plus, l'expression de *Hnf1 $\alpha$*  (protéine et ARN), ainsi que la perméabilité et le transport ionique, ne sont pas affectées dans l'intestin grêle de ces souris (résultats non publiés de notre laboratoire). D'autre part, nous avons montré que l'épithélium de l'intestin grêle des souris invalidées pour *Hnf1 $\alpha$*  présente une augmentation de la perméabilité et une diminution de la conductance ionique (manuscrit 3). Ces phénomènes sont associés à la modulation de l'expression d'une multitude de molécules d'adhésion, de jonction et de transport, tel que révélé par une analyse affymetrix. De plus, nous avons observé une diminution significative de 73% du niveau protéique de *Hnf4 $\alpha$*  dans l'intestin grêle de ces souris adultes. Cette réduction est due à des modifications post-transcriptionnelles puisque le niveau de l'ARNm de *Hnf4 $\alpha$*  n'est pas modulé dans ces conditions (manuscrit 3). Ces résultats suggèrent que *in vivo*, *Hnf1 $\alpha$*  est le principal régulateur des rôles de la barrière épithéliale de l'intestin grêle.

Par contre, l'induction unique de *Hnf1 $\alpha$*  dans les IEC-6/L1 ne permet pas d'induire la formation d'une monocouche épithéliale fonctionnelle en co-culture. Cela suggère que *Hnf4 $\alpha$*  soit essentiel pour la mise en place d'une barrière étanche et effectuant un transport vectoriel. À première vue, les évidences obtenues *in vitro* et *in vivo* sont en opposition. Il est cependant possible que, tout comme *Cdx2*, *Hnf1 $\alpha$*  ait besoin d'être exprimé à un faible niveau dans les IEC-6/L1 pour permettre une ségrégation de son expression entre les cellules de « type souche » et les cellules en voie de se différencier. Par ailleurs, l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de la *villine* n'est effective que vers E14,5 (BABEU *et al.*, 2009; MADISON *et al.*, 2002). Ceci indique que l'invalidation de *Hnf4 $\alpha$*  dans notre modèle de souris se produit suite au début de la cytodifférenciation épithéliale



intestinale, et non pas avant. Ainsi, Hnf4 $\alpha$  pourrait être essentiel au remodelage de la chromatine et à la modulation de l'expression génique (induction de Hnf1 $\alpha$ , entre autres) lors de l'initiation de la cytodifférenciation et de la polarisation de l'épithélium intestinal, sans être absolument nécessaire pour leur maintien par la suite. Un phénomène similaire a été observé dans le foie, où une invalidation embryonnaire de Hnf4 $\alpha$  cause une destruction de la cohésion cellulaire dû à la perte de l'expression de plusieurs molécules de jonctions et de polarisation, ainsi que celle de Hnf1 $\alpha$  (BATTLE *et al.*, 2006; PARVIZ *et al.*, 2003), alors que son invalidation chez l'adulte n'induit pas de défaut majeur dans la cohésion du tissu hépatique (HAYHURST *et al.*, 2001). L'approche la plus appropriée pour confirmer un rôle inducteur de Hnf4 $\alpha$  lors de l'établissement de la barrière épithéliale de l'intestin grêle, *in vivo*, serait d'effectuer une invalidation plus tôt au cours du développement embryonnaire. Pour le moment, aucun modèle n'est disponible pour exprimer la Cre de façon plus précoce que le promoteur de la *villine* au niveau de cet organe.

D'autre part, l'importante diminution de la protéine Hnf4 $\alpha$  dans les souris invalidées pour Hnf1 $\alpha$ , ainsi que la coexpression des deux facteurs lors des expériences de co-culture, ne nous permettent pas d'exclure la collaboration (ensemble ou de façon parallèle) des deux facteurs dans la régulation de la cohésion et de l'étanchéité de la barrière épithéliale. Cette collaboration pourrait être étudiée via l'utilisation du modèle de co-culture. En effet, il serait possible d'utiliser une approche lentivirale pour infecter les cellules IEC-6/L1-Hnf4 $\alpha$  avec des shARNs dirigés envers Hnf1 $\alpha$  et de déterminer l'impact de l'absence de Hnf1 $\alpha$  sur la formation des structures en dômes lors de l'ensemencement sur des cellules mésenchymateuses. Ceci pourrait permettre de déterminer si Hnf1 $\alpha$  est important, en plus de Hnf4 $\alpha$ , pour l'établissement de la barrière épithéliale. Une approche similaire, mais où l'on effectuerait l'infection avec les shARNs au moment où les dômes seraient déjà formés,

permettrait de confirmer si la présence de Hnf1 $\alpha$  est essentielle au maintien de l'étanchéité (affaissement) et de la polarité de l'épithélium intestinal.

Si l'expression de Hnf4 $\alpha$  était réduite au niveau transcriptionnelle dans les souris Hnf1 $\alpha$  KO, il serait possible de la rétablir via le croisement des souris Hnf1 $\alpha$  KO avec des souris exprimant un transgène pour Hnf4 $\alpha$ . Cela permettrait de déterminer si la perte de Hnf4 $\alpha$  est en partie responsable de la déstabilisation des fonctions de la barrière de l'épithélium chez ces souris. Par contre, l'expression de celui-ci étant affectée de façon post-transcriptionnelle chez l'adulte, cette approche risque fortement d'être inefficace. Ainsi, à moins de déterminer via quelle régulation post-transcriptionnelle Hnf4 $\alpha$  est diminué dans les souris Hnf1 $\alpha$  KO, et d'être capable d'y contrevenir, il y aura toujours un doute qui persistera au sujet d'une collaboration possible entre Hnf1 $\alpha$  et Hnf4 $\alpha$  *in vivo* pour le maintien de la barrière épithéliale intestinale.

### **3.4.2. Mortalité des souris double KO : quelques hypothèses**

#### **3.4.2.1. Les souris double KO-villine**

Nos observations suggèrent que l'invalidation intestinale de Hnf4 $\alpha$  au cours du développement embryonnaire dans les souris invalidées pour Hnf1 $\alpha$  de façon classique entraîne rapidement leur mort. Il a été soulevé dans une section précédente que l'invalidation de Hnf1 $\alpha$  mène à une diminution significative de près de 80% du messager de la *lactase* chez les souris nouveau-nés (résultats, section 2.4). Ceci suggère que l'assimilation de glucose soit très faible avant le sevrage, les nouveaux-nés ayant probablement à s'adapter à un apport énergétique majoritairement lipidique. Hors, la régulation du métabolisme lipidique étant fortement attribuée à Hnf4 $\alpha$ , sa présence pourrait être essentielle afin de permettre l'assimilation appropriée des lipides et d'ainsi palier à la perte d'expression de Hnf1 $\alpha$ . Cette

hypothèse pourrait expliquer la mortalité d'environ 25% des souriceaux *Hnf1α* KO, en plus de celle des doubles KO. Effectivement, l'expression de *Hnf4α* étant réduite d'environ 60% chez les souris *Hnf1α* KO nouveaux-nés, les individus qui ne survivent pas à la période périnatale pourraient présenter une réduction de *Hnf4α* sous le seuil limite acceptable pour leur survie.

D'autre part, la complémentarité entre la régulation métabolique effectuée par *Hnf1α* et *Hnf4α* pourrait être essentielle dans les jours qui suivent la naissance. Rappelons que la localisation nucléaire de *Hnf1α* est perdue entre la naissance et le moment du sevrage. La régulation transcriptionnelle de certains gènes indispensables à l'équilibre métabolique pourrait alors dépendre de l'expression de *Hnf4α* au cours de cette période. L'invalidation des deux molécules pourrait donc entraîner la mort par une défaillance métabolique.

Afin de publier cette étude, il est nécessaire d'identifier les dérégulations transcriptionnelles qui sont à l'origine de la mortalité des souris double KO-*villine* en comparaison aux souris invalidées pour *Hnf1α* uniquement. L'approche la plus appropriée serait d'effectuer une analyse d'expression génique chez des embryons de jour E18,5. Ainsi, les modulations observées ne seraient pas affectées par l'apport de nourriture et les sécrétions des autres organes invalidées pour *Hnf1α*.

#### **3.4.2.2. Les souris double KO-CYP1A1**

Nos résultats indiquent que les souris doubles KO et *Hnf1α* <sup>-/-</sup>; *Hnf4α*<sup>loxP/+</sup>; *CYP1A1*<sup>+</sup> meurent très rapidement suite au traitement visant à induire la transactivation du promoteur *CYP1A1*. Certaines observations soulèvent un doute quant à l'utilisation de ce modèle et de l'approche que nous avons développé pour permettre l'induction du promoteur *CYP1A1*. Premièrement, les souris doubles KO et *Hnf1α* <sup>-/-</sup>; *Hnf4α*<sup>loxP/+</sup>; *CYP1A1*<sup>+</sup>

présentent un poids plus léger et un aspect légèrement différent (plus courbé) de celui des souris *Hnf1α* KO, et ce avant même le début du traitement. De plus, la mortalité de certaines de ces souris en cours de traitement, dont l'une deux jours après le début de celui-ci, semble être trop drastique pour être induite dû à la perte de l'expression de *Hnf4α*. D'autre part, nous avons démontré que l'expression protéique de *Hnf4α* dans les souris *Hnf1α* KO adultes est réduite de plus de 70% (résultat non présenté). Puisque les niveaux d'ARNm de *Hnf4α* sont stables, cela suggère que ce soit une diminution de la traduction ou une déstabilisation protéique qui soit en cause. Ainsi, une diminution de la transcription pourrait rapidement avoir un impact majeur sur le maintien d'un seuil protéique fonctionnel acceptable pour *Hnf4α*. Ce qui expliquerait pourquoi l'inactivation monoallélique de *Hnf4α* chez les souris *Hnf1α* KO cause un phénotype semblable à son invalidation complète.

Ces observations suggèrent que l'inactivation de *Hnf4α* soit effective avant même le début du traitement. Deux explications sont possibles : Le promoteur *CYP1A1* pourrait ne pas être complètement inactif en l'absence d'agent inducteur 1) dans le contexte de l'épithélium intestinal en général, ou 2) dans le contexte de l'inactivation de *Hnf1α*, ce qui semble le plus plausible. Toutefois, l'analyse d'expression génique effectuée sur les souris *Hnf1α* KO âgées de 4 mois a révélé une diminution du transcrit de *CYP1A1*, ce qui laisse croire que le promoteur exogène ne soit pas activé. Il sera cependant important de valider l'expression protéique de *Hnf4α* dans les souris *Hnf4α* KO et les double KO avant les traitements à la  $\beta$ NF, ainsi qu'une fois traitées avec de l'huile uniquement. Pour l'instant, toutes les validations ont été effectuées suite au traitement.

L'hypothèse que les souris double KO soient invalidées pour *Hnf4α* de façon naturelle demeure intéressante. Ainsi, la différence de phénotype entre les souris *Hnf1α* KO et double KO pourrait être plus facilement caractérisée dans une condition où l'impact

possible des traitements à l'huile de maïs serait éliminé. De plus, les analyses pourraient s'étendre plus facilement à des aspects fonctionnels, tels des tests de perméabilité et de transport ionique. Dans ce cas, il serait cependant important de déterminer à quel moment du développement l'inactivation de *Hnf4α* s'effectue. D'autre part, si les souris double KO sont complètement invalidées pour *Hnf4α* avant les traitements inducteurs et que seulement l'ingestion massive de triglycérides (huile de maïs) cause leur mort, la caractérisation de ce phénotype serait fort pertinente afin de comprendre la fonction collaborative de *Hnf1α* et de *Hnf4α* dans le contrôle du métabolisme des lipides.

## **4. CONCLUSIONS**

### ***4.1. La cathepsine L participe au maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal***

Les protéases sont des enzymes protéolytiques qui présentent une sélectivité de clivage leur permettant d'influencer de nombreux processus cellulaires. Les cystéines protéases, dont la cathepsine L, sont sécrétées dans le milieu extracellulaire tumoral et favorisent l'invasion tissulaire et les métastases via une dégradation de la matrice extracellulaire (LOPEZ-OTIN et MATRISIAN, 2007). Nos observations supportent un rôle insoupçonné pour la cathepsine L intracellulaire au cours de la différenciation et de la résistance à l'initiation tumorale dans l'épithélium intestinal.

Nous avons identifié que la cathepsine L s'accumule, non seulement au niveau des organelles, mais également dans les noyaux des CEI. Ceci constitue la première démonstration d'une localisation nucléaire pour cette cystéine protéase dans un épithélium *in vivo*. Une immunolocalisation de cette forme nucléaire de la cathepsine L *in vivo*, ainsi que son expression forcée dans les cellules IEC-6/L1 permettront de cerner son implication fonctionnelle au cours de la différenciation des CEI.

Nos résultats démontrent que la perte de l'activité de la cathepsine L cause une augmentation de la multiplicité tumorale dans l'intestin de souris *APC<sup>Min</sup>*. Il a également été observé que les souris invalidées pour la cathepsine L sont plus susceptibles de développer rapidement des tumeurs sous l'action d'agents carcinogènes (REINHECKEL *et al.*, 2005). La cathepsine L pourrait ainsi contrevenir à l'initiation tumorale dans plusieurs épithéliums. L'analyse de ses cibles moléculaires, ainsi que la régulation de son expression pourrait ainsi être d'un intérêt général dans la lutte contre le cancer.

#### **4.2. *Hnf4 $\alpha$* promeut la différenciation des CEI dans un modèle de co-culture**

La différenciation de CEI non transformées en culture est ardue. Nous avons établi et caractérisé un modèle de co-culture de CEI indifférenciées de rat avec des cellules mésenchymateuses fœtales humaines. Une caractérisation morphologique et fonctionnelle a permis de démontrer que ce modèle récapitule la différenciation des CEI. La nature hétérologue des compartiments épithélial et mésenchymateux confère à ce modèle une caractéristique particulièrement intéressante pour la caractérisation des interactions épithélio-mésenchymateuses qui régulent la différenciation épithéliale intestinale.

Hnf4 $\alpha$  est un facteur de transcription essentiel aux fonctions hépatiques (LI *et al.*, 2000; PARVIZ *et al.*, 2003; BATTLE *et al.*, 2006). Il y régule l'expression de nombreux intervenants métaboliques et structuraux qui sont également localisés dans les CEI. L'expression forcée de Hnf4 $\alpha$  dans les CEI indifférenciées induit des marqueurs des fonctions intestinales, ainsi qu'une différenciation fonctionnelle en co-culture. Nos observations démontrent pour la première fois, l'implication fonctionnelle de Hnf4 $\alpha$  au cours de la différenciation des CEI *in vitro*. Puisque Hnf1 $\alpha$  est induit par Hnf4 $\alpha$  dans ce système, il serait pertinent d'invalider Hnf1 $\alpha$  afin de déterminer si la collaboration entre les deux facteurs de transcription est essentielle à la différenciation fonctionnelle des CEI.

#### **4.3. *L'invalidation de Hnf1 $\alpha$ chez la souris cause une intestinalomégalie, ainsi que des irrégularités dans la cytodifférenciation***

De nombreuses études ont démontré que Hnf1 $\alpha$  est un important régulateurs des fonctions intestinales *in vitro* (BOUDREAU *et al.*, 2001; 2002; BOSSE *et al.*, 2006; 2007). L'invalidation classique de Hnf1 $\alpha$  chez la souris entraîne de nombreuses conséquences systémiques, dont une hyperglycémie liée à une défectuosité de la sécrétion de l'insuline

(LEE *et al.*, 1998; PONTOGLIO *et al.*, 1998). Nous avons démontré que la perte de Hnf1 $\alpha$  cause une intestinalomégalie qui prend progressivement place suite au sevrage des animaux et qui est caractérisée par une augmentation de l'activité de mTOR. De plus, nous avons montré que la cytodifférenciation des CEI est altérée par l'invalidation de Hnf1 $\alpha$ . Nos observations démontrent une fonction insoupçonnée pour Hnf1 $\alpha$  dans la régulation de la taille de l'intestin grêle, et suggèrent que le système entéroendocrinien pourrait être en cause dans le diabète de ces souris.

Il sera fort intéressant de vérifier si Hnf1 $\alpha$  a la capacité de moduler directement l'activité de mTOR dans les CEI et ce, via quelle voie moléculaire. Une caractérisation approfondie du phénotype des cellules entéroendocrines, ainsi que l'injection d'inhibiteurs de la ghréline dans les souris invalidées pour Hnf1 $\alpha$  permettront d'évaluer l'implication systémique de l'absence d'expression intestinale de Hnf1 $\alpha$ .

#### ***4.4. La double invalidation de Hnf1 $\alpha$ et de Hnf4 $\alpha$ est néfaste pour la survie des animaux***

Hnf1 $\alpha$  et Hnf4 $\alpha$  sont d'importants régulateurs des fonctions métaboliques. L'invalidation de Hnf4 $\alpha$  spécifiquement au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle n'affecte que très légèrement l'homéostasie épithéliale (BABEU *et al.*, 2009) et l'invalidation de Hnf1 $\alpha$  n'affecte pas de façon vitale les fonctions métaboliques de l'intestin grêle (manuscrit 3). Nous avons entrepris de produire des souris doublement invalidées pour Hnf1 $\alpha$  et Hnf4 $\alpha$  dans la muqueuse de l'intestin grêle. Nos résultats démontrent que la double invalidation de ces facteurs de transcription cause des défaillances fonctionnelles ayant des répercussions néfastes sur la survie des souris. Les analyses phénotypiques devront être approfondies afin de déterminer ce qui empêche la survie des souris. Une analyse



d'expression génique dans l'intestin des embryons double KO-villine à jour E18,5 serait particulièrement pertinente.

L'homéostasie de l'épithélium intestinal est finement régulée via la communication de la CEI avec son environnement, ainsi que par les facteurs de transcription intrinsèques. Mes travaux ont permis de démontrer l'implication fonctionnelle de la cathepsine L, ainsi que des facteurs de transcriptions Hnf1 $\alpha$  et Hnf4 $\alpha$  dans la régulation de cet équilibre. Les analyses futures permettront d'établir les mécanismes d'action de ces intervenants moléculaires.

## REMERCIEMENTS

« If I have seen farther than others, it is because I was standing on the shoulders of giants. »

*Isaac Newton*

J'aimerais dire...

À François:

Merci pour ta confiance, ta patience, ta présence, ton temps, tes conseils, ton écoute, ton soutien, ton optimisme, ton humanité, ton respect, les discussions scientifiques et personnelles. Merci d'avoir enduré mon mauvais caractère et mes sauts d'humeurs. Merci d'avoir accepté ma maternité.

Tu es un mentor exceptionnel ainsi qu'un exemple de courage et de persévérance, tant au plan professionnel que personnel. Tu m'as partagé ta vision de la science, ta méthode de travail et de gestion des étudiants, tes expériences et aventures en tant que jeune chercheur... C'est une richesse exceptionnelle pour les années à venir!

Au cours de ces nombreuses années, et plus particulièrement au cours de la dernière, tu as été mon phare, tu m'as donné la force d'avancer, de continuer et de ne pas lâcher.

MERCI

À Nathalie Perreault :

Merci de m'avoir intercepté dans un corridor en 1998, alors que j'étais en quête d'un stage, et de m'avoir présenté à Jean-François. Merci de m'avoir suggéré de rencontrer François en 2003, alors que j'étais venue te voir pour t'offrir d'être ton assistante de recherche. Tu as joué un rôle très important dans mon parcours professionnel, je t'en serai toujours reconnaissante.

À Jean-François Beaulieu :

Merci de m'avoir pris sous ton aile au cours de mes stages et de ma maîtrise. C'est grâce à toi que j'ai développé mon intérêt et mes connaissances de l'intestin.

À ma mère :

Merci maman pour ta confiance sans faille en mes capacités, ainsi que pour ton soutien moral au cours de cette interminable année 2009. Tes nombreux petits plats m'ont permis de survivre, et tes (trop) nombreuses journées aux côtés de Benjamin m'ont permis de travailler l'esprit tranquille.

À Benoît :

Merci d'être resté à mes côtés au cours de cette dernière année difficile. Merci pour ta compréhension et ton soutien. Je suis désolée pour le peu de temps que j'ai consacré à notre relation au cours de la dernière année. C'est terminé!

À Benjamin :

Merci d'être là mon petit trésor, j'ai puisé en toi toute l'énergie que j'ai mise dans mon travail. Tu as été le soleil dans cette année ombrageuse. Mon ange, maman a beaucoup travaillé dernièrement, mais là, elle revient à la maison.

À François Brial :

Merci pour ton bon humeur, ton enthousiasme et ton sourire. Tu as été d'un soutien incroyable, tant psychologiquement que techniquement, au cours de cette dernière année difficile. J'ai confiance en tes aptitudes, tout arrive à temps à qui sait attendre!

Au « Team Boudreau » :

Vous avez été tous et chacun des collègues de travail exceptionnels. Merci pour toutes ces années partagées! J'espère avoir régulièrement de vos nouvelles et qui sait, on sera peut-être à nouveau des collègues dans le futur!

À ma famille, mes amis et tous ceux qui ont cru en moi : MERCI!

## LISTE DES RÉFÉRENCES

1. **Andreu P, Colnot S, Godard C, Gad S, Chafey P, Niwa-Kawakita M, Laurent-Puig P, Kahn A, Robine S, Perret C, and Romagnolo B.** Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development* 132: 1443-1451, 2005.
2. **Andreu P, Peignon G, Slomianny C, Taketo MM, Colnot S, Robine S, Lamarque D, Laurent-Puig P, Perret C, and Romagnolo B.** A genetic study of the role of the Wnt/beta-catenin signalling in Paneth cell differentiation. *Dev Biol* 324: 288-296, 2008.
3. **Auclair BA, Benoit YD, Rivard N, Mishina Y, and Perreault N.** Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage. *Gastroenterology* 133: 887-896, 2007.
4. **Authier F, Metioui M, Bell AW, and Mort JS.** Negative regulation of epidermal growth factor signaling by selective proteolytic mechanisms in the endosome mediated by cathepsin B. *J Biol Chem* 274: 33723-33731, 1999.
5. **Babeu JP, Darsigny M, Lussier CR, and Boudreau F.** Hepatocyte nuclear factor 4alpha contributes to an intestinal epithelial phenotype in vitro and plays a partial role in mouse intestinal epithelium differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297: G124-134, 2009.
6. **Battle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, and Clevers H.** Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111: 251-263, 2002.
7. **Battle MA, Konopka G, Parviz F, Gagli AL, Yang C, Sladek FM, and Duncan SA.** 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, 2006.
8. **Baumhueter S, Mendel DB, Conley PB, Kuo CJ, Turk C, Graves MK, Edwards CA, Courtois G, and Crabtree GR.** HNF-1 shares three sequence motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and APF. *Genes Dev* 4: 372-379, 1990.
9. **Beck F, Erler T, Russell A, and James R.** Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev Dyn* 204: 219-227, 1995.

10. **Beck F, Chawengsaksophak K, Waring P, Playford RJ, and Furness JB.** Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7318-7323, 1999.
11. **Blumenfeld M, Maury M, Chouard T, Yaniv M, and Condamine H.** Hepatic nuclear factor 1 (HNF1) shows a wider distribution than products of its known target genes in developing mouse. *Development* 113: 589-599, 1991.
12. **Bosse T, van Wering HM, Gielen M, Dowling LN, Fialkovich JJ, Piaseckyj CM, Gonzalez FJ, Akiyama TE, Montgomery RK, Grand RJ, and Krasinski SD.** Hepatocyte nuclear factor-1alpha is required for expression but dispensable for histone acetylation of the lactase-phlorizin hydrolase gene in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G1016-1024, 2006.
13. **Bosse T, Fialkovich JJ, Piaseckyj CM, Beuling E, Broekman H, Grand RJ, Montgomery RK, and Krasinski SD.** Gata4 and Hnf1alpha are partially required for the expression of specific intestinal genes during development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G1302-1314, 2007.
14. **Boucher MJ, Jean D, Vezina A, and Rivard N.** Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G736-746, 2004.
15. **Boudreau F, Zhu Y, and Traber PG.** Sucrase-isomaltase gene transcription requires the hepatocyte nuclear factor-1 (HNF-1) regulatory element and is regulated by the ratio of HNF-1 alpha to HNF-1 beta. *J Biol Chem* 276: 32122-32128, 2001.
16. **Boudreau F, Rings EH, van Wering HM, Kim RK, Swain GP, Krasinski SD, Moffett J, Grand RJ, Suh ER, and Traber PG.** Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *J Biol Chem* 277: 31909-31917, 2002.
17. **Boulanger J, Vezina A, Mongrain S, Boudreau F, Perreault N, Auclair BA, Laine J, Asselin C, and Rivard N.** 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, 2005.
18. **Byrne MM, Sturis J, Menzel S, Yamagata K, Fajans SS, Dronsfield MJ, Bain SC, Hattersley AT, Velho G, Froguel P, Bell GI, and Polonsky KS.** Altered insulin

secretory responses to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12. *Diabetes* 45: 1503-1510, 1996.

19. **Camilleri M, Papathanasopoulos A, and Odunsi ST.** Actions and therapeutic pathways of ghrelin for gastrointestinal disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6: 343-352, 2009.

20. **Campbell SJ, Carlotti F, Hall PA, Clark AJ, and Wolf CR.** Regulation of the CYP1A1 promoter in transgenic mice: an exquisitely sensitive on-off system for cell specific gene regulation. *J Cell Sci* 109 ( Pt 11): 2619-2625, 1996.

21. **Chawengsaksophak K, James R, Hammond VE, Kontgen F, and Beck F.** Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 386: 84-87, 1997.

22. **Chen WS, Manova K, Weinstein DC, Duncan SA, Plump AS, Prezioso VR, Bachvarova RF, and Darnell JE, Jr.** 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, 1994.

23. **Chiba H, Gotoh T, Kojima T, Satohisa S, Kikuchi K, Osanai M, and Sawada N.** Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res* 286: 288-297, 2003.

24. **Colnot S, Romagnolo B, Lambert M, Cluzeaud F, Porteu A, Vandewalle A, Thomasset M, Kahn A, and Perret C.** Intestinal expression of the calbindin-D9K gene in transgenic mice. Requirement for a Cdx2-binding site in a distal activator region. *J Biol Chem* 273: 31939-31946, 1998.

25. **Courtois G, Morgan JG, Campbell LA, Fourel G, and Crabtree GR.** Interaction of a liver-specific nuclear factor with the fibrinogen and alpha 1-antitrypsin promoters. *Science* 238: 688-692, 1987.

26. **Courtois G, Baumhueter S, and Crabtree GR.** Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 7937-7941, 1988.

27. **Crosnier C, Stamataki D, and Lewis J.** Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* 7: 349-359, 2006.

28. **Cummings DE and Overduin J.** Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 117: 13-23, 2007.

29. **Dauca M, Bouziges F, Colin S, Kedinger M, Keller MK, Schilt J, Simon-Assmann P, and Haffen K.** Development of the vertebrate small intestine and mechanisms of cell differentiation. *Int J Dev Biol* 34: 205-218, 1990.
30. **Desai S, Loomis Z, Pugh-Bernard A, Schrunk J, Doyle MJ, Minic A, McCoy E, and Sussel L.** Nkx2.2 regulates cell fate choice in the enteroendocrine cell lineages of the intestine. *Dev Biol* 313: 58-66, 2008.
31. **Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou SR, Schmidt C, Neff J, Washington MK, and Beauchamp RD.** Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* 115: 1765-1776, 2005.
32. **Drucker DJ.** The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest* 117: 24-32, 2007.
33. **Dukes ID, Sreenan S, Roe MW, Levisetti M, Zhou YP, Ostrega D, Bell GI, Pontoglio M, Yaniv M, Philipson L, and Polonsky KS.** Defective pancreatic beta-cell glycolytic signaling in hepatocyte nuclear factor-1alpha-deficient mice. *J Biol Chem* 273: 24457-24464, 1998.
34. **Duncan SA, Manova K, Chen WS, Hoodless P, Weinstein DC, Bachvarova RF, and Darnell JE, Jr.** Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7598-7602, 1994.
35. **Duncan SA, Nagy A, and Chan W.** Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. *Development* 124: 279-287, 1997.
36. **Fang R, Santiago NA, Olds LC, and Sibley E.** The homeodomain protein Cdx2 regulates lactase gene promoter activity during enterocyte differentiation. *Gastroenterology* 118: 115-127, 2000.
37. **Fevr T, Robine S, Louvard D, and Huelsken J.** Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol* 27: 7551-7559, 2007.
38. **Fre S, Huyghe M, Mourikis P, Robine S, Louvard D, and Artavanis-Tsakonas S.** Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 435: 964-968, 2005.

39. **Gao N, White P, and Kaestner KH.** Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev Cell* 16: 588-599, 2009.
40. **Giancotti FG and Ruoslahti E.** Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032, 1999.
41. **Gonzalez FJ.** Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 alpha-mediated transcription. *Drug Metab Pharmacokinet* 23: 2-7, 2008.
42. **Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destree O, Kielman M, and Clevers H.** Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 129: 626-638, 2005.
43. **Gregorieff A and Clevers H.** Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 19: 877-890, 2005.
44. **Gronemeyer H, Gustafsson JA, and Laudet V.** Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3: 950-964, 2004.
45. **Groschwitz KR and Hogan SP.** Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 124: 3-20; quiz 21-22, 2009.
46. **Haffen K, Kedinger, M., Simon-Assman, P.** Cell contact dependent regulation of enterocytic differentiation. In: *Human Gastrointestinal Development*, edited by Lebenthal E. New York: Raven Press, 1989.
47. **Hardie DG.** The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117: 5479-5487, 2004.
48. **Hauck AL, Swanson KS, Kenis PJ, Leckband DE, Gaskins HR, and Schook LB.** Twists and turns in the development and maintenance of the mammalian small intestine epithelium. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75: 58-71, 2005.
49. **Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, and Gonzalez FJ.** Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* 21: 1393-1403, 2001.
50. **He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng X, He X, Wiedemann LM, Mishina Y, and Li L.** BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* 36: 1117-1121, 2004.
51. **Heller RS, Jenny M, Collombat P, Mansouri A, Tomasetto C, Madsen OD, Mellitzer G, Gradwohl G, and Serup P.** Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development. *Dev Biol* 286: 217-224, 2005.



52. **Hermiston ML, Wong MH, and Gordon JI.** Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. *Genes Dev* 10: 985-996, 1996.
53. **Hill ME, Asa SL, and Drucker DJ.** Essential requirement for Pax6 in control of enteroendocrine proglucagon gene transcription. *Mol Endocrinol* 13: 1474-1486, 1999.
54. **Hill JT, Mastracci TL, Vinton C, Doyle ML, Anderson KR, Loomis ZL, Schrunk JM, Minic AD, Prabakar KR, Pugliese A, Sun Y, Smith RG, and Sussel L.** Ghrelin is dispensable for embryonic pancreatic islet development and differentiation. *Regul Pept* 157: 51-56, 2009.
55. **Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, Akiyama TE, Gonzalez FJ, and Chou JY.** A molecular link between the common phenotypes of type 1 glycogen storage disease and HNF1alpha-null mice. *J Biol Chem* 276: 7963-7967, 2001.
56. **Hu C and Perlmutter DH.** Regulation of alpha1-antitrypsin gene expression in human intestinal epithelial cell line caco-2 by HNF-1alpha and HNF-4. *Am J Physiol* 276: G1181-1194, 1999.
57. **Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, and Guan KL.** TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126: 955-968, 2006.
58. **Inoue H, Nomiya J, Nakai K, Matsutani A, Tanizawa Y, and Oka Y.** Isolation of full-length cDNA of mouse PAX4 gene and identification of its human homologue. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 628-633, 1998.
59. **Ireland H, Kemp R, Houghton C, Howard L, Clarke AR, Sansom OJ, and Winton DJ.** Inducible Cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of beta-catenin. *Gastroenterology* 126: 1236-1246, 2004.
60. **James R, Erler T, and Kazenwadel J.** Structure of the murine homeobox gene cdx-2. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J Biol Chem* 269: 15229-15237, 1994.
61. **Jeanes A, Gottardi CJ, and Yap AS.** Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 27: 6920-6929, 2008.

62. **Jenny M, Uhl C, Roche C, Duluc I, Guillermin V, Guillemot F, Jensen J, Kedinger M, and Gradwohl G.** Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *Embo J* 21: 6338-6347, 2002.
63. **Jiang G, Nepomuceno L, Hopkins K, and Sladek FM.** Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol Cell Biol* 15: 5131-5143, 1995.
64. **Jiang G, Nepomuceno L, Yang Q, and Sladek FM.** Serine/threonine phosphorylation of orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4. *Arch Biochem Biophys* 340: 1-9, 1997.
65. **Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, and Thompson CB.** AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 18: 283-293, 2005.
66. **Jones RG, Li X, Gray PD, Kuang J, Clayton F, Samowitz WS, Madison BB, Gumucio DL, and Kuwada SK.** Conditional deletion of beta1 integrins in the intestinal epithelium causes a loss of Hedgehog expression, intestinal hyperplasia, and early postnatal lethality. *J Cell Biol* 175: 505-514, 2006.
67. **Kieffer TJ, McIntosh CH, and Pederson RA.** Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 136: 3585-3596, 1995.
68. **Klapper M, Bohme M, Nitz I, and Doring F.** The human intestinal fatty acid binding protein (hFABP2) gene is regulated by HNF-4alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 147-152, 2007.
69. **Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, and Clevers H.** Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 19: 379-383, 1998.
70. **Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, Chu P, Lee M, Yuan J, Nusse R, and Kuo CJ.** Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 266-271, 2004.
71. **Kuo CJ, Conley PB, Hsieh CL, Francke U, and Crabtree GR.** Molecular cloning, functional expression, and chromosomal localization of mouse hepatocyte nuclear factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9838-9842, 1990.

72. **Langlois MJ, Roy SA, Auclair BA, Jones C, Boudreau F, Carrier JC, Rivard N, and Perreault N.** Epithelial phosphatase and tensin homolog regulates intestinal architecture and secretory cell commitment and acts as a modifier gene in neoplasia. *Faseb J* 23: 1835-1844, 2009.
73. **Laprise P, Chailier P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ, and Rivard N.** Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 277: 8226-8234, 2002.
74. **Larsson LI, St-Onge L, Hougaard DM, Sosa-Pineda B, and Gruss P.** Pax 4 and 6 regulate gastrointestinal endocrine cell development. *Mech Dev* 79: 153-159, 1998.
75. **Lee YH, Sauer B, and Gonzalez FJ.** Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1alpha knockout mouse. *Mol Cell Biol* 18: 3059-3068, 1998.
76. **Lee CS, Perreault N, Brestelli JE, and Kaestner KH.** 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, 2002.
77. **Lee MJ, Feliars D, Mariappan MM, Sataranatarajan K, Mahimainathan L, Musi N, Foretz M, Viollet B, Weinberg JM, Choudhury GG, and Kasinath BS.** A role for AMP-activated protein kinase in diabetes-induced renal hypertrophy. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F617-627, 2007.
78. **Li J, Ning G, and Duncan SA.** Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev* 14: 464-474, 2000.
79. **Lin X.** Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* 131: 6009-6021, 2004.
80. **Lin WY, Hu YJ, and Lee YH.** Hepatocyte nuclear factor-1alpha regulates glucocorticoid receptor expression to control postnatal body growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295: G542-551, 2008.
81. **Lopez-Otin C and Matrisian LM.** Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 7: 800-808, 2007.
82. **Madison BB, Dunbar L, Qiao XT, Braunstein K, Braunstein E, and Gumucio DL.** Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J Biol Chem* 277: 33275-33283, 2002.

83. **McIntyre N, Holdsworth CD, and Turner DS.** New Interpretation of Oral Glucose Tolerance. *Lancet* 2: 20-21, 1964.
84. **Mietus-Snyder M, Sladek FM, Ginsburg GS, Kuo CF, Ladias JA, Darnell JE, Jr., and Karathanasis SK.** Antagonism between apolipoprotein AI regulatory protein 1, Ear3/COUP-TF, and hepatocyte nuclear factor 4 modulates apolipoprotein CIII gene expression in liver and intestinal cells. *Mol Cell Biol* 12: 1708-1718, 1992.
85. **Moore B.** On the treatment of Diabetes mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. *Biochem J* 1: 28-38, 1906.
86. **Moreno E and Morata G.** Caudal is the Hox gene that specifies the most posterior Drosophile segment. *Nature* 400: 873-877, 1999.
87. **Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, and Tsai MJ.** Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11: 2323-2334, 1997.
88. **Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, and Rossant J.** Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoblast differentiation. *Cell* 123: 917-929, 2005.
89. **Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI, and Young RA.** Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303: 1378-1381, 2004.
90. **Olsen L, Bressendorff S, Troelsen JT, and Olsen J.** Differentiation-dependent activation of the human intestinal alkaline phosphatase promoter by HNF-4 in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G220-226, 2005.
91. **Park J, Schulz S, and Waldman SA.** Intestine-specific activity of the human guanylyl cyclase C promoter is regulated by Cdx2. *Gastroenterology* 119: 89-96, 2000.
92. **Parviz F, Matullo C, Garrison WD, Savatski L, Adamson JW, Ning G, Kaestner KH, Rossi JM, Zaret KS, and Duncan SA.** Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet* 34: 292-296, 2003.
93. **Perreault N, Katz JP, Sackett SD, and Kaestner KH.** Foxl1 controls the Wnt/beta-catenin pathway by modulating the expression of proteoglycans in the gut. *J Biol Chem* 276: 43328-43333, 2001.
94. **Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, and Clevers H.** Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 17: 1709-1713, 2003.

95. **Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Bach JP, Babinet C, and Yaniv M.** Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* 84: 575-585, 1996.
96. **Pontoglio M, Sreenan S, Roe M, Pugh W, Ostrega D, Doyen A, Pick AJ, Baldwin A, Velho G, Froguel P, Levisetti M, Bonner-Weir S, Bell GI, Yaniv M, and Polonsky KS.** Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. *J Clin Invest* 101: 2215-2222, 1998.
97. **Pontoglio M.** Hepatocyte nuclear factor 1, a transcription factor at the crossroads of glucose homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 11 Suppl 16: S140-143, 2000.
98. **Pontoglio M, Prie D, Cheret C, Doyen A, Leroy C, Froguel P, Velho G, Yaniv M, and Friedlander G.** HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep* 1: 359-365, 2000.
99. **Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, and Ganz T.** The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci* 59: 156-170, 2002.
100. **Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, and Mifflin RC.** Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G2-7, 2005.
101. **Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, and Isselbacher KJ.** Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol* 80: 248-265, 1979.
102. **Ranganath LR.** The entero-insular axis: implications for human metabolism. *Clin Chem Lab Med* 46: 43-56, 2008.
103. **Reinheckel T, Hagemann S, Dollwet-Mack S, Martinez E, Lohmuller T, Zlatkovic G, Tobin DJ, Maas-Szabowski N, and Peters C.** The lysosomal cysteine protease cathepsin L regulates keratinocyte proliferation by control of growth factor recycling. *J Cell Sci* 118: 3387-3395, 2005.
104. **Rings EH, Boudreau F, Taylor JK, Moffett J, Suh ER, and Traber PG.** Phosphorylation of the serine 60 residue within the Cdx2 activation domain mediates its transactivation capacity. *Gastroenterology* 121: 1437-1450, 2001.
105. **Roth W, Deussing J, Botchkarev VA, Pauly-Evers M, Saftig P, Hafner A, Schmidt P, Schmahl W, Scherer J, Anton-Lamprecht I, Von Figura K, Paus R, and Peters C.** Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *Faseb J* 14: 2075-2086, 2000.

106. **Sakaguchi T, Gu X, Golden HM, Suh E, Rhoads DB, and Reinecker HC.** Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha. *J Biol Chem* 277: 21361-21370, 2002.
107. **Sancho E, Batlle E, and Clevers H.** Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 695-723, 2004.
108. **Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, Batlle E, Simon-Assmann P, Clevers H, Nathke IS, Clarke AR, and Winton DJ.** Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 18: 1385-1390, 2004.
109. **Sauvaget D, Chauffeton V, Citadelle D, Chatelet FP, Cywiner-Golenzner C, Chambaz J, Pincon-Raymond M, Cardot P, Le Beyec J, and Ribeiro A.** 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, 2002.
110. **Schlaepfer DD and Hunter T.** Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol* 8: 151-157, 1998.
111. **Scoville DH, Sato T, He XC, and Li L.** Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* 134: 849-864, 2008.
112. **Sesti G.** Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20: 665-679, 2006.
113. **Shaw RJ.** Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 18: 598-608, 2006.
114. **Shih DQ, Screenan S, Munoz KN, Philipson L, Pontoglio M, Yaniv M, Polonsky KS, and Stoffel M.** Loss of HNF-1alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. *Diabetes* 50: 2472-2480, 2001.
115. **Silberg DG, Swain GP, Suh ER, and Traber PG.** Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology* 119: 961-971, 2000.
116. **Silberg DG, Sullivan J, Kang E, Swain GP, Moffett J, Sund NJ, Sackett SD, and Kaestner KH.** Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice. *Gastroenterology* 122: 689-696, 2002.

117. **Simon-Assmann P, Bouziges F, Haffen AK, and Kedinger M.** Epithelial-mesenchymal interactions in the production of basement membrane components in the gut. *Development* 102: 339-347, 1988.
118. **Sladek FM, Zhong WM, Lai E, and Darnell JE, Jr.** Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev* 4: 2353-2365, 1990.
119. **Sladek FM, Ruse MD, Jr., Nepomuceno L, Huang SM, and Stallcup MR.** Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ 1. *Mol Cell Biol* 19: 6509-6522, 1999.
120. **Smith SB, Gasa R, Watada H, Wang J, Griffen SC, and German MS.** Neurogenin3 and hepatic nuclear factor 1 cooperate in activating pancreatic expression of Pax4. *J Biol Chem* 278: 38254-38259, 2003.
121. **Soriano P.** Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21: 70-71, 1999.
122. **Stegmann A, Hansen M, Wang Y, Larsen JB, Lund LR, Ritte L, Nicholson JK, Quistorff B, Simon-Assmann P, Troelsen JT, and Olsen J.** 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, 2006.
123. **Stumpel F, Burcelin R, Jungermann K, and Thorens B.** Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11330-11335, 2001.
124. **Suh E, Chen L, Taylor J, and Traber PG.** A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* 14: 7340-7351, 1994.
125. **Suh E and Traber PG.** An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* 16: 619-625, 1996.
126. **Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL, and German MS.** Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* 125: 2213-2221, 1998.

127. **Swenson ES, Mann EA, Jump ML, and Giannella RA.** Hepatocyte nuclear factor-4 regulates intestinal expression of the guanylin/heat-stable toxin receptor. *Am J Physiol* 276: G728-736, 1999.
128. **Thomas H, Jaschkowitz K, Bulman M, Frayling TM, Mitchell SM, Roosen S, Lingott-Frieg A, Tack CJ, Ellard S, Ryffel GU, and Hattersley AT.** A distant upstream promoter of the HNF-4alpha gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Genet* 10: 2089-2097, 2001.
129. **Torres-Padilla ME, Sladek FM, and Weiss MC.** Developmentally regulated N-terminal variants of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha mediate multiple interactions through coactivator and corepressor-histone deacetylase complexes. *J Biol Chem* 277: 44677-44687, 2002.
130. **Traber P, and Wu GD.** Intestinal Development and Differentiation. In *Gastrointestinal Cancers: Biology, Diagnosis, and Therapy*. Philadelphia:: Lippincott-Raven Publishers, 1995.
131. **Tsukita S, Furuse M, and Itoh M.** Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 285-293, 2001.
132. **van Dijk TH, Grefhorst A, Oosterveer MH, Bloks VW, Staels B, Reijngoud DJ, and Kuipers F.** An increased flux through the glucose 6-phosphate pool in enterocytes delays glucose absorption in Fxr<sup>-/-</sup> mice. *J Biol Chem* 284: 10315-10323, 2009.
133. **van Es JH, Jay P, Gregorieff A, van Gijn ME, Jonkheer S, Hatzis P, Thiele A, van den Born M, Begthel H, Brabletz T, Taketo MM, and Clevers H.** Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol* 7: 381-386, 2005.
134. **van Es JH and Clevers H.** Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease. *Trends Mol Med* 11: 496-502, 2005.
135. **Velho G, Bellanne-Chantelot C, and Timsit J.** [MODY, a model of genotype/phenotype interactions in type 2 diabetes]. *Med Sci (Paris)* 19: 854-859, 2003.
136. **Viollet B, Yaniv M, and Pontoglio M.** Embryonic but not postnatal reexpression of hepatocyte nuclear factor 1alpha (HNF1alpha) can reactivate the silent phenylalanine hydroxylase gene in HNF1alpha-deficient hepatocytes. *Mol Cell Biol* 21: 3662-3670, 2001.
137. **Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hebrard S, Amouyal C, Mounier R, Foretz M, and Andreelli F.** Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci* 14: 3380-3400, 2009.



138. **Walthall K, Cappon GD, Hurtt ME, and Zoetis T.** Postnatal development of the gastrointestinal system: a species comparison. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 74: 132-156, 2005.
139. **Wang L, Klopot A, Freund JN, Dowling LN, Krasinski SD, and Fleet JC.** Control of differentiation-induced calbindin-D9k gene expression in Caco-2 cells by cdx-2 and HNF-1alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G943-953, 2004.
140. **Wang Q, Elghazi L, Martin S, Martins I, Srinivasan RS, Geng X, Sleeman M, Collombat P, Houghton J, and Sosa-Pineda B.** Ghrelin is a novel target of Pax4 in endocrine progenitors of the pancreas and duodenum. *Dev Dyn* 237: 51-61, 2008.
141. **Wisely GB, Miller AB, Davis RG, Thornquest AD, Jr., Johnson R, Spitzer T, Seffler A, Shearer B, Moore JT, Willson TM, and Williams SP.** Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids. *Structure* 10: 1225-1234, 2002.
142. **Yamamoto H, Bai YQ, and Yuasa Y.** Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 300: 813-818, 2003.
143. **Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ, and Zoghbi HY.** Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 294: 2155-2158, 2001.