

Université de Sherbrooke

Gata4 et Cdx2 sont des régulateurs transcriptionnels intestinaux du gène encodant la protéine sécrétoire de type lectine Pap1

Par
Joannie Bruneau
Département d'anatomie et biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
Mars, 2011

Mémoire évalué par :
Pr. François Boudreau, Département d'anatomie et biologie cellulaire
Pr. Fernand-Pierre Gendron, Département d'anatomie et biologie cellulaire
Pr. Xavier Roucou, Département de biochimie



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: 978-0-494-88877-3

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-88877-3

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

Gata4 et Cdx2 sont des régulateurs transcriptionnels intestinaux du gène encodant la protéine sécrétoire de type lectine *Pap1*

Par

Joannie Bruneau

Département d'Anatomie et biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en biologie cellulaire
Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Gata4 est un facteur de transcription exprimé par les entérocytes. Nos études ont démontré que Gata4 pouvait réguler l'expression de *Pap1* chez le rat. Ce gène encode pour une protéine sécrétoire de type lectine impliquée dans le contrôle de la prolifération bactérienne. Puisqu'il a été démontré que des lectines antibactériennes de la famille Pap sont sécrétées dans la lumière intestinale en réponse à des stimuli inflammatoires, le but de cette étude était de définir l'implication transcriptionnelle de Gata4 dans la réponse inflammatoire des cellules épithéliales intestinales. Afin de caractériser l'effet de Gata4 sur la régulation transcriptionnelle de *Pap1* dans les cellules Caco-2/15, nous avons utilisé des essais luciférase et généré différents mutants de la protéine Gata4 et du promoteur *Pap1*. Nous avons également utilisé des immunobuvardages et des analyses de gel de rétention afin de mesurer la quantité et l'affinité de Gata4 pour l'ADN dans les cellules IEC-6/Cdx2. Les essais luciférase ont démontré que Gata4, en combinaison avec Cdx2, amène un effet synergique important sur l'activité du promoteur de *Pap1* de l'ordre d'environ 8 fois. Différents mutants de la protéine Gata4 ont montré une abolition du potentiel transcriptionnel, démontrant que l'effet observé est spécifique. Cependant, la cotransfection d'un mutant du domaine en doigt de zinc (Zn) localisé en N-terminal, en combinaison avec Cdx2, augmente radicalement l'activation du promoteur de 18 fois. Des résultats préliminaires ont également démontré que la surexpression de ce mutant dans les cellules IEC-6/Cdx2 augmente fortement l'expression endogène du gène *Pap1*. Cet effet pourrait être médié par des interactions avec les cofacteurs Fog. En effet, la cotransfection de Fog1 réprime l'effet synergique observé avec Gata4 de type sauvage mais non avec le mutant du domaine en doigt de Zn en N-terminal. Les mutants générés du promoteur *Pap1* ont permis d'identifier le site Cdx2 et le site Gata le plus proximal du site d'initiation de la transcription comme nécessaire à l'effet transcriptionnel de Gata4 et Cdx2. En utilisant comme modèle les cellules IEC-6/Cdx2, nous avons montré qu'une induction avec des LPS n'a pas d'effet significatif sur la quantité totale de la protéine Gata4 mais des résultats préliminaires montrent une modulation de la phosphorylation de Gata4 sur la sérine 105. Par gel de rétention, nous avons montré que GATA4 a une affinité pour plusieurs sites sur le promoteur du gène *Pap1* et qu'elle est augmentée en condition de stress cellulaire induit par les LPS. Cette étude nous permet de mieux comprendre l'implication de Gata4 dans la réponse inflammatoire de la cellule épithéliale intestinale.

Mots-clés : transcription, Gata4, intestin, *Pap1*, Cdx2, inflammation

Table des matières

Liste des tableaux	VI
Liste des figures.....	VII
Liste des abréviations	VIII
I - Introduction.....	1
1. Anatomie du tube digestif	1
1.1 L'épithélium intestinal	1
1.2 L'axe crypte-villosité de l'intestin grêle	3
1.3 L'axe crypte-villosité du côlon	4
2. La transcription.....	4
2.1 Les cis-régulateurs	5
2.2 Les trans-régulateurs	5
3. Le facteur de transcription Gata4	6
3.1 La famille Gata.....	6
3.2 Structure et domaines fonctionnels	8
3.3 Régulation post-traductionnelle	8
3.4 Partenaires d'interaction.....	10
3.4.1 Cdx2 et HNF-1 α	11
3.4.2 Fog.....	11
3.5 Localisation dans l'intestin	12
3.6 Rôles dans l'intestin	14
3.6.1 Régulation de gènes intestinaux	14
3.6.2 Régulation des jonctions cellulaires	16
3.6.3 Maintien des identités jéjunum-iléon	16
3.6.4 Gata4 dans un contexte inflammatoire	17
3.6.5 Identification d'une nouvelle cible potentielle chez le rat : Pap1	18
4. Le peptide antimicrobien Pap1	19
4.1 La famille Pap	19
4.2 La protéine Pap1	19
4.3 Localisation	22
4.4 Régulation par les bactéries	23
4.5 Régulation par les cytokines inflammatoires	23
4.6 Rôles dans l'intestin	23
4.7 Implication dans les maladies intestinales	24
5. Problématique et objectifs de recherche.....	24
II - Matériel et méthodes	27
1. Culture cellulaire	27
1.1 Modèles	27
1.1.1 Les cellules IEC-6/Cdx2.....	27
1.1.2 La coculture de cellules IEC-6/Cdx2 sur cellules mésenchymateuses.....	27
1.1.3 Les cellules Caco-2/15, NIH 3T3 et HEK 293T	27
1.2 Lignées cellulaires IEC-6/cdx2 Gata4, Gata4 Δ 216-240 et Gata4 Δ 270-294	28
1.2.1 Production de rétrovirus	28
1.2.1.1 Préparation des ADN et transfection transitoire	28
1.2.1.2 Récolte des virus.....	29

1.2.2	Infection rétrovirale	29
1.3	Induction d'un stress inflammatoire cellulaire.....	29
1.4	Extractions protéiques.....	30
1.4.1	Protéines totales.....	30
1.4.2	Protéines nucléaires.....	30
1.5	Extraction de l'ARN	31
1.6	Immunobuvardage.....	31
1.7	Constructions plasmidiques Pap1-luciférase.....	31
1.7.1	Amplification de la région promotrice <i>Pap1</i>	31
1.7.2	Clonage dans le vecteur de transition TOPO	32
1.7.3	Sous-clonage dans le vecteur pGL3-Basic.....	32
1.7.4	Mutagenèse de Pap1-luciférase	33
1.8	Essais luciférase	33
1.8.1	Préparation des cellules	33
1.8.2	Transfection transitoire.....	33
1.8.3	Lyse des cellules et essais luciférase	34
1.9	Analyse par RT-PCR.....	35
1.9.1	Réaction de transcription inverse	35
1.9.2	Réaction de polymérisation en chaîne.....	35
1.10	Gel de rétention	35
1.10.1	Préparation des sondes radioactives	35
1.10.2	Réaction de liaison à l'ADN et gel de rétention.....	36
1.11	Analyse de densitométrie	37
1.12	Statistiques.....	37
2.	Modèle de souris.....	37
2.1	Lignées de souris utilisées et croisements.....	37
2.2	Génotypage des souris.....	38
2.2.1	Extraction d'ADN génomique.....	38
2.2.2	Réaction de polymérisation en chaîne.....	38
2.3	Sacrifice des souris.....	38
2.4	Fixation des tissus pour coupes histologiques	39
2.5	Immunofluorescences sur coupes histologiques	39
III -	Résultats	40
1.	Validation de l'expression protéique de Gata4 dans les cellules épithéliales intestinales de rat.....	40
2.	Effet synergique de Gata4 et Cdx2 sur le promoteur de Pap1	40
3.	Identification de deux sites du promoteur de Pap1 essentiels à son activation par Gata4 et Cdx2	42
4.	La suppression du domaine en doigt de Zn N-terminal de Gata4 augmente la transactivation de Pap1	42
5.	La protéine Gata4 subit des modifications post-traductionnelles dans un contexte de stress inflammatoire.....	49
6.	L'invalidation de Gata4 pourrait avoir un rôle sur l'étanchéité des jonctions adhérentes chez la souris	53
IV -	Discussion	59
1.	La coopération entre Gata4 et Cdx2 est essentielle à l'activation transcriptionnelle de Pap1 au niveau intestinal	59

2. Le potentiel répresseur de Gata4 sur le promoteur de Pap1 et l'importance des cofacteurs Fog dans ce phénomène	62
3. Le rôle de Gata4 dans la réponse des cellules épithéliales intestinales à un stress inflammatoire	66
4. L'étanchéité des jonctions cellulaires dans le modèle murin Gata4 ^{fl/-} Cre ⁺	69
CONCLUSION	71
PERSPECTIVES	72
REMERCIEMENTS	73
RÉFÉRENCES	74

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des anticorps utilisés lors de l'analyse des protéines par immunobuvardage.	31
Tableau 2. Séquence des oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse du promoteur <i>Pap1</i>	33
Tableau 3. Séquence des oligonucléotides utilisés pour l'analyse par RT-PCR.	35
Tableau 4. Séquence des oligonucléotides utilisés pour les gels de rétention.	36
Tableau 5. Lignées de souris utilisées.	37
Tableau 6. Séquences des oligonucléotides et conditions d'amplification utilisées pour le génotypage des souris.	38
Tableau 7. Circulation des tissus.	39
Tableau 8. Liste des anticorps utilisés lors d'immunofluorescences.	39

Liste des figures

Figure 1. L'épithélium intestinal.	2
Figure 2. Structure et homologie des protéines Gata.	7
Figure 3. Structure de la protéine Gata4 murine.	9
Figure 4. Niveaux d'expression de <i>Fog1</i> et <i>Fog2</i>	13
Figure 5. Expression de Gata4 dans l'intestin de la souris adulte.	15
Figure 6. Arbre phylogénique des protéines Pap de différentes espèces.	20
Figure 7. Représentation schématique de différentes protéines contenant un domaine lectine de type C.	21
Figure 8. Représentation schématique du promoteur <i>Pap1</i> de rat.	26
Figure 9. Expression de Gata4 et Cdx2 au cours de la différenciation des cellules épithéliales intestinales en coculture.	41
Figure 10. Effet de Gata4 sur le promoteur <i>Pap1</i> en présence ou absence de Cdx2.	43
Figure 11. Effet de Gata4 et Cdx2 sur la transcription du promoteur <i>Pap1</i> muté.	45
Figure 12. Effet de la protéine Gata4 mutée sur la transcription du promoteur <i>Pap1</i> dans les cellules Caco-2/15.	47
Figure 13. Effet de la protéine Gata4 mutée sur la transcription du promoteur <i>Pap1</i> dans les cellules NIH 3T3.	48
Figure 14. Effet de la perte d'un domaine en doigt de Zn de la protéine Gata4 sur l'expression endogène de <i>Pap1</i> dans les cellules IEC/Cdx2.	50
Figure 15. Effet du corépresseur <i>Fog1</i> sur la transcription du promoteur de <i>Pap1</i> induite par Gata4 et Cdx2.	51
Figure 16. Expression de Gata4 phosphorylée et Gata4 totale selon la période de stimulation aux LPS dans les cellules IEC-6/Cdx2.	52
Figure 17. Interaction d'extraits nucléaires de cellules IEC-6/Cdx2 stimulées aux LPS avec un site NF- κ B et un site Gata du promoteur <i>Pap1</i>	54
Figure 18. Génotypage des souris Gata4.	56
Figure 19. Validation de la perte de Gata4 dans l'épithélium des souris mutantes.	57
Figure 20. Expression de la E-Cadhérine dans l'épithélium des souris mutantes.	58
Figure 21. Mécanisme général proposé sur la régulation de <i>Pap1</i> par Gata4.	63

Liste des abréviations

A :	Adénine
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
C :	Cytosine
C/EBP :	<i>CCAAT enhancer binding protein</i>
CDP :	<i>CCAAT displacement protein</i>
Cdx :	<i>Caudal related homeobox</i>
CMV :	Promoteur du cytomégalovirus
cpm :	Compte par minute
Cre :	<i>Cyclization recombinase</i> (bactériophage P)
C-terminal :	Extrémité COOH
CTLD :	Domaine des lectines de type C
DMEM :	<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>
dNTP :	Désoxynucléotide triphosphate (N = A, T, C, G)
DTT :	Dithiothréitol
EDTA :	Acide éthylènediaminetétraacétique
ERK :	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
Fabp :	<i>Fatty acid binding protein</i>
FBS :	Sérum foetal bovin
Fog :	<i>Friend of Gata</i>
G :	Guanine
<i>Gata</i> :	Gène <i>Gata</i> animal
Gata :	Protéine <i>Gata</i> animale
<i>GATA</i> :	Gène <i>GATA</i> humain
GATA :	Protéine <i>GATA</i> humaine
HEPES :	4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonate
HIEC :	Cellule épithéliale intestinale humaine
HNF :	<i>Hepatocyte nuclear factor</i>
IEC :	Cellule épithéliale intestinale
IL :	Interleukine
INF :	Interféron
IPTG :	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
kb :	Kilobase
kDa :	Kilodalton
loxP :	<i>Locus of X-ing over P1</i>
LPH :	Lactase phlorizin-hydrolase
LPS :	Lipopolysaccharide
mA :	Milliampère
MAPK :	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MII :	Maladies inflammatoires intestinales

mM :	Millimolaire
NF- κ B :	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
ng :	Nanogramme
NLS :	<i>Nuclear localisation sequence</i>
N-terminal :	Extrémité NH ₂
O/N :	<i>Over night</i> (toute la nuit)
P :	Phosphate
Pap :	Protéine <i>pancreatitis associated protein</i> animale
PAP :	Protéine <i>pancreatitis associated protein</i> humaine
<i>Pap</i> :	Gène <i>pancreatitis associated protein</i> animal
<i>PAP</i> :	Gène <i>pancreatitis associated protein</i> humain
pb :	Paire de bases
PBS :	Tampon phosphate salin
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
PFA :	Paraformaldéhyde
PKA :	Protéine kinase A
R :	Adénine ou guanine
rpm :	Révolution par minute
RXR :	<i>Retinoid X receptor</i>
S :	Sérine (acide aminé)
Ser :	Sérine (acide aminé)
SNTP :	Petit peptide N-terminal
T :	Thymine
TAE :	Tris-acétate EDTA
TBP :	TATA binding protein
TNF :	Tumor necrosis factor
TP :	Température pièce
UV :	Ultraviolet
V217G :	Mutation d'une valine pour une glycine en position 217
W :	Adénine ou thymine
Zn :	Zinc
α :	Alpha
β :	Bêta
γ :	Gamma
μ g :	Microgramme
μ l :	Microlitre

I - Introduction

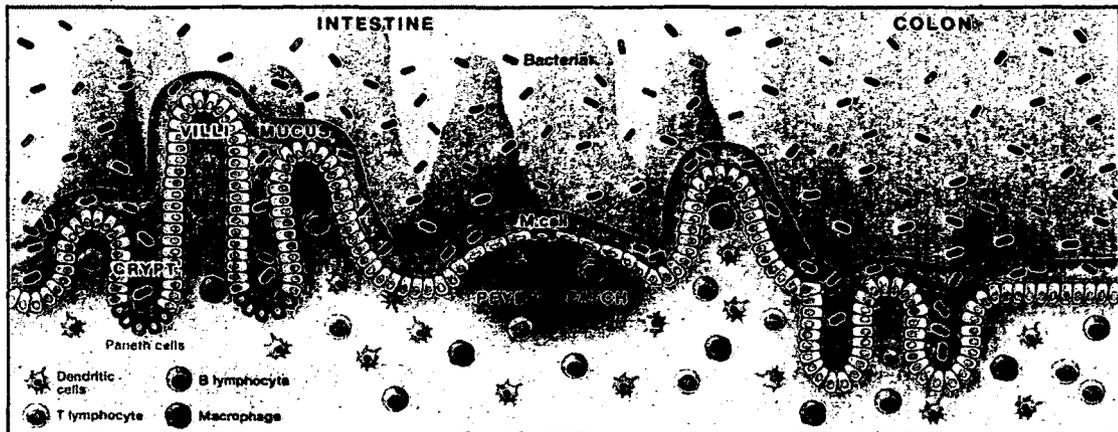
1. Anatomie du tube digestif

Le tube digestif est un long tube musculéux continu qui permet la digestion et l'absorption de la nourriture ingérée afin de fournir l'énergie nécessaire au corps. Le tube digestif est formé de quatre couches, soit de l'intérieur vers l'extérieur : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculéuse et la séreuse. Les organes du tube digestif sont la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. Leurs fonctions principales sont l'ingestion, la propulsion, la digestion mécanique, la digestion chimique, l'absorption et la défécation (MARIEB, 2005).

L'intestin se divise en intestin grêle et côlon. L'intestin grêle peut être subdivisé en trois parties distinctes : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. La muqueuse de l'intestin grêle présente des plis circulaires (aussi appelées valvules conniventes), des villosités et des microvillosités afin d'augmenter sa surface d'absorption et remplir pleinement son rôle de digestion et d'absorption des nutriments. Le côlon, qui présente une surface de contact plus petite que celle de l'intestin grêle malgré la présence de replis, peut être subdivisé en côlon ascendant, transverse et descendant et est majoritairement responsable de la réabsorption d'eau (MARIEB, 2005).

1.1 L'épithélium intestinal

La muqueuse intestinale est recouverte d'une couche simple de cellules épithéliales qui se renouvellent à tous les 4 à 5 jours (Figure 1). Ce taux de renouvellement rapide en fait un excellent modèle d'étude de la prolifération et de la différenciation cellulaire (VAN DER FLIER et CLEVERS, 2009). De plus, la perméabilité sélective de l'épithélium et son exposition continue à une forte concentration de microorganismes dans la lumière intestinale en font également un bon modèle pour étudier la tolérance et la réponse immunitaire (GARRETT *et al.*, 2010). En effet, cette



(GARRETT *et al.*, 2010)

Figure 1. L'épithélium intestinal.

L'épithélium intestinal joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Il est recouvert d'une couche de mucus qui représente à la fois une source de nutriments et un microhabitat pour la flore présente dans la lumière intestinale. Il est également en contact direct avec les cellules immunitaires présentes dans la muqueuse afin de protéger l'organisme contre une éventuelle infiltration de bactéries. Bien que similaires, les épithélia de l'intestin grêle et du côlon présentent quelques différences. L'épithélium de l'intestin grêle est organisé en axe crypte-villosité tandis que le côlon présente un épithélium plat avec seulement des cryptes. Également, les plaques de Peyer, les cellules M ainsi que les cellules de Paneth ne sont retrouvées qu'au niveau de l'intestin grêle.

couche simple de cellules épithéliales constitue la plus grande barrière protectrice contre l'environnement extérieur.

Cette barrière sélective est notamment possible grâce à la polarisation des cellules. Les jonctions adhérentes permettent aux cellules de conserver leur forme prismatique et de s'ancrer les unes aux autres. Ce sont surtout les interactions Cadhérines-Caténines qui sont responsables de la polarisation des cellules, en plus de réguler la migration et la prolifération cellulaire (GROSCWITZ et HOGAN, 2009). À l'exception des cellules elles-mêmes, ce sont les jonctions serrées qui permettent à l'épithélium d'effectuer son rôle de barrière semi-perméable. Les jonctions serrées sont retrouvées du côté apical des cellules polarisées et limitent le transport paracellulaire. Plus d'une cinquantaine de protéines différentes peuvent composer les jonctions serrées, mais la famille la mieux décrite dans la littérature jusqu'à présent est la famille des Claudines, comportant au moins 24 membres. La protéine ZO-1 ainsi que l'Occludine sont d'autres constituants bien connus des jonctions serrées (MARCHIANDO *et al.*, 2010).

1.2 L'axe crypte-villosité de l'intestin grêle

L'unité fonctionnelle de l'intestin grêle est l'axe crypte-villosité. La crypte renferme les cellules souches intestinales, les cellules amplificatrices en transition ainsi que les cellules de Paneth. Les cellules souches intestinales donnent naissance aux cellules amplificatrices, qui vont se diviser de 4 à 5 fois et migrer de façon ascendante dans la crypte pendant environ deux jours et former quatre types majeurs de cellules différenciées, soit les cellules absorbantes, caliciformes, entéroendocrines, et de Paneth. Les cellules de Paneth, qui sécrètent des protéines antibactériennes, sont les seules cellules différenciées retrouvées au fond des cryptes (VAN DER FLIER et CLEVERS, 2009).

La surface de l'épithélium de l'intestin grêle est augmentée par la présence de nombreuses villosités. Trois types de cellules différenciées recouvrent ces villosités : les cellules absorbantes, qui sont les plus nombreuses et dont la fonction principale réside en la digestion et l'absorption des nutriments, les cellules caliciformes, qui sécrètent du

mucus, et les cellules entéroendocrines, qui sécrètent différentes hormones intestinales. Trois jours après leur différenciation terminale, les cellules sont exfoliées à l'apex des villosités pour entrer en apoptose dans la lumière intestinale (VAN DER FLIER et CLEVERS, 2009).

L'épithélium contient également d'autres types de cellules moins connues dont les cellules M, retrouvées près des plaques de Peyer, qui sont des agrégats de follicules lymphoïdes situés dans la sous-muqueuse de l'intestin grêle. Les cellules M ont pour principale fonction de reconnaître et transporter les microorganismes aux plaques de Peyer sous-jacentes afin de contrer rapidement une éventuelle invasion bactérienne provenant de la lumière intestinale (GARRETT *et al.*, 2010).

1.3 L'axe crypte-villosité du côlon

L'épithélium du côlon est similaire à celui de l'intestin grêle, même si quelques différences histologiques les distinguent. L'épithélium du côlon ne présente pas de villosité, mais seulement des cryptes formant un épithélium plat. Les cellules de Paneth et les plaques de Peyer y sont également absentes (GARRETT *et al.*, 2010).

2. La transcription

La régulation de l'expression des gènes est une étape cruciale du maintien de l'homéostasie cellulaire et la majorité des événements responsables de cette régulation se produisent au niveau de la transcription (VILLARD, 2004). En biologie, le processus de transcription réfère au processus par lequel l'ARN polymérase utilise un brin d'ADN comme patron de synthèse afin de générer une molécule d'ARN complémentaire (MARIEB, 2005). Dans les cellules eucaryotes, l'ARN polymérase II requiert la collaboration de plusieurs facteurs de transcription (trans-régulateurs) pour se lier à des séquences précises d'ADN (cis-régulateurs) contenues dans le promoteur du gène et initier la transcription. Ce mécanisme contrôle l'expression des gènes qui seront éventuellement traduits en protéines et sa dérégulation est à l'origine de plusieurs pathologies (VILLARD, 2004).

2.1 Les cis-régulateurs

La transcription est initiée lorsque l'ARN polymérase II et les facteurs de transcription nécessaires se lient à une courte séquence d'ADN, appelée promoteur minimal. Le complexe multiprotéique formé va souvent lier le promoteur minimal au niveau d'un motif conservé d'ADN, appelé la boîte TATA, située de 20 à 30 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. En amont du promoteur minimal se trouvent d'autres séquences d'ADN où les facteurs de transcription vont interagir afin de moduler la transcription, il s'agit du promoteur proximal. D'autres régulateurs en cis peuvent également être retrouvés quelques centaines ou milliers de paires de bases en amont ou en aval des régions promotrices. Ces séquences sont appelées des amplificateurs si les facteurs de transcription s'y liant activent la transcription ou des silenceurs si les facteurs de transcription s'y liant répriment la transcription (VILLARD, 2004).

2.2 Les trans-régulateurs

Les régulateurs en *trans* peuvent être classés en deux sous-groupes, soit les facteurs de transcription généraux, qui sont absolument nécessaires à l'activité de l'ARN polymérase II, et les facteurs de transcription spécifiques, qui sont plutôt des protéines pouvant réguler positivement (activateur) ou négativement (répresseur) le taux de transcription (VILLARD, 2004).

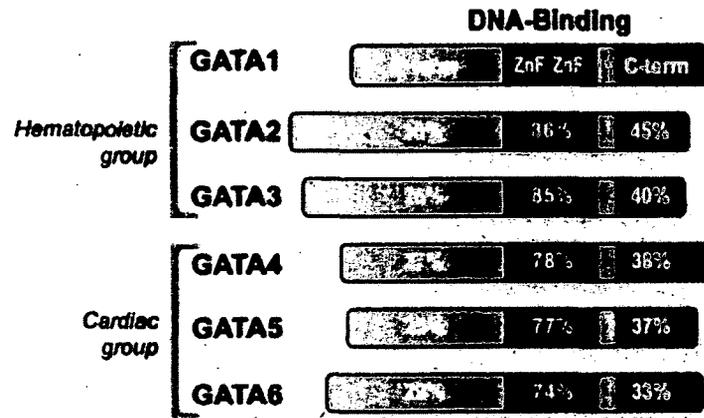
Les facteurs de transcription spécifiques activateurs sont les plus nombreux et ont plusieurs caractéristiques communes. Ils possèdent un domaine de liaison qui permet de lier des séquences spécifiques sur l'ADN. Plusieurs domaines de liaison à l'ADN ont des motifs de reconnaissance communs et peuvent donc être regroupés en quatre groupes : les facteurs de transcription avec un domaine de liaison à l'ADN à motif hélice-boucle-hélice (HLH), à motif leucine-zipper (LZ), à motif doigt de zinc (ZF), et à motif hélice-tour-hélice (HTH). Ils possèdent également, de façon générale, des domaines d'activation qui peuvent recruter ou accélérer l'assemblage des facteurs de transcription généraux sur le promoteur. Plusieurs facteurs de transcription spécifiques possèdent également des domaines de dimérisation afin de s'associer avec d'autres facteurs de transcription et des domaines de liaison à un ligand spécifique (VILLARD, 2004).

3. Le facteur de transcription Gata4

3.1 La famille Gata

Les facteurs de transcription de la famille Gata lient le motif GATA (WGATAR, où W = A ou T et R = A ou G), d'où ils tiennent leur nom, et sont des régulateurs importants de plusieurs gènes au niveau des tissus dans lesquels ils sont exprimés. La famille est composée de six protéines (Gata1 à 6) qui contiennent toutes un domaine de liaison à l'ADN composé de deux doigts de Zn qui est impliqué dans la liaison de l'ADN mais également dans des interactions protéine-protéine avec d'autres partenaires transcriptionnels ou cofacteurs (VIGER *et al.*, 2008). Il a été démontré que le doigt de Zn en C-terminal et son domaine basique adjacent étaient suffisants pour reconnaître la séquence consensus WGATAR contenue dans les promoteurs des gènes cibles, tandis que le doigt de Zn en N-terminal jouait plutôt un rôle stabilisateur du complexe ADN-protéine (YANG et EVANS, 1992; WHYATT *et al.*, 1993). De façon tridimensionnelle, il a été démontré que le domaine de liaison permettait aux facteurs Gata de lier l'ADN de façon similaire à une main tenant une corde (OMICIANSKI *et al.*, 1993). Puisque ce domaine de liaison à l'ADN est très conservé entre les membres de la famille Gata (Figure 2), ceux-ci partagent des rôles similaires dans différents tissus (MOLKENTIN, 2000; VIGER *et al.*, 2008).

Les facteurs Gata présentent une forte homologie dans leur séquence d'acides aminés à travers différentes espèces. Ils peuvent toutefois être séparés en deux sous-groupes selon leur patron d'expression spacio-temporel (Figure 2). Gata1/2/3 sont exprimés dans les cellules sanguines et sont essentiels à la prolifération des cellules souches hématopoïétiques, à la différenciation des érythrocytes et mégacaryocytes, et au développement des lymphocytes. Ils sont également exprimés et impliqués dans le développement du cerveau, de la moelle épinière et de l'oreille interne (BRESNICK *et al.*, 2005; VIGER *et al.*, 2008). Gata4/5/6 sont, quant à eux, exprimés majoritairement au niveau du cœur, des intestins et des gonades et ont une forte similarité de séquence (~ 80-90 % homologie) (WHYATT *et al.*, 1993; MOLKENTIN, 2000; PIKKARAINEN *et al.*, 2004; VIGER *et al.*, 2008).



(VIGER *et al.*, 2008)

Figure 2. Structure et homologie des protéines Gata.

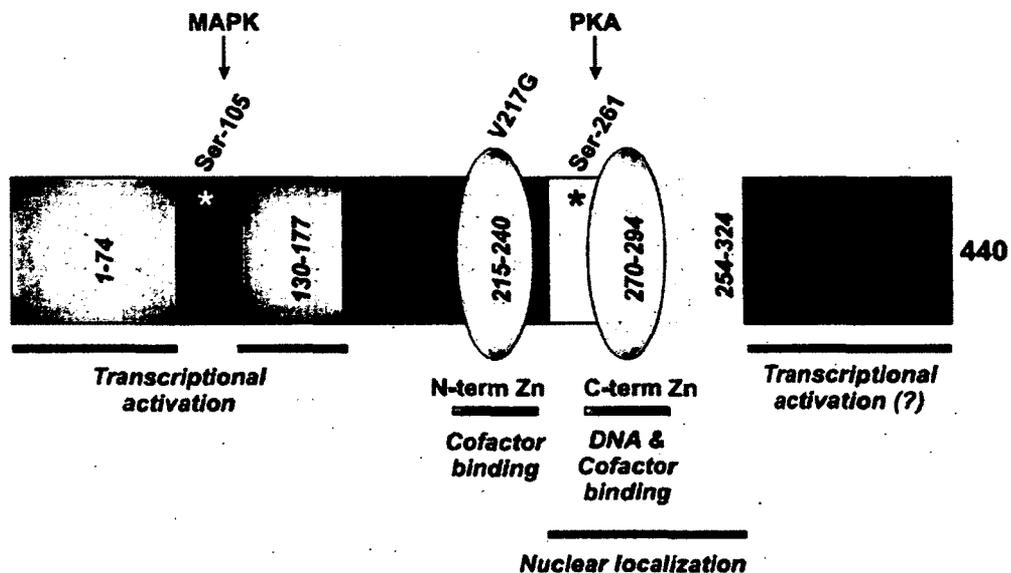
Pourcentage d'homologie entre les différents facteurs de transcription Gata (dédit à partir des séquences chez la souris) au niveau du domaine N-terminal, du domaine C-terminal et du domaine de liaison à l'ADN. Tous les facteurs Gata ont en commun un domaine de liaison à l'ADN conservé qui permet la liaison à la séquence consensus WGATAR et l'interaction avec d'autres facteurs de transcription et cofacteurs. Les domaines de transactivation sont localisés dans les régions N-terminales et C-terminales. La région NLS représente la séquence de localisation nucléaire.

3.2 Structure et domaines fonctionnels

Gata4 a été le quatrième facteur liant le motif GATA à être identifié chez la souris (ARCECI *et al.*, 1993). L'ADNc de Gata4 a été découvert en criblant une librairie d'embryons de souris âgés de 6,5 jours embryonnaires à l'aide de sondes oligonucléotidiques correspondantes à une région très conservée du domaine de liaison à l'ADN. Les séquences de nucléotides et d'acides aminés du facteur de transcription Gata4 peuvent être trouvées dans GenBank avec le numéro d'accès M98339. La protéine Gata4 se compose de 440 acides aminés et a un poids moléculaire prédit de 48 kDa (Figure 3). Elle contient, comme tous les autres membres de la famille, un domaine de liaison à l'ADN formé de deux doigts de Zn (Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys). Des analyses de suppression de domaine ont démontré que, tout comme pour Gata1, le motif en doigt de Zn en N-terminal de Gata4 lui permet de stabiliser sa liaison à l'ADN notamment grâce à l'interaction avec des cofacteurs, tandis que le motif en doigt de Zn C-terminal permet de lier directement la séquence consensus WGATAR en plus de pouvoir interagir avec des cofacteurs. Les analyses de suppression de domaine ont également montré la présence de deux domaines d'activation transcriptionnelle séparés situés dans la portion N-terminale de la protéine ainsi que la présence d'une séquence de localisation nucléaire (NLS) dans le domaine basique adjacent au doigt de Zn en C-terminal (PIKKARAINEN *et al.*, 2004).

3.3 Régulation post-traductionnelle

Plusieurs études ont démontré que les niveaux de la protéine Gata4 demeuraient inchangés même suite à des modifications de son affinité pour l'ADN (MORIMOTO *et al.*, 2000; HAUTALA *et al.*, 2001; LIANG *et al.*, 2001; LIANG *et al.*, 2001; TREMBLAY et VIGER, 2003; TREMBLAY et VIGER, 2003). Ce sont plutôt des modifications post-traductionnelles qui influenceraient l'activité et la capacité de liaison à l'ADN de la protéine Gata4. Des études réalisées dans les cardiomyocytes ont démontré que Gata4 était régulé par différentes voies de signalisation des MAPK via une phosphorylation directe. Des analyses de mutagenèse dirigée ainsi que des expériences réalisées avec des antisérums spécifiques à Gata4 phosphorylé ont permis de déterminer que les voies ERK1/2 et p38 des MAPK pouvait phosphoryler Gata4 sur plusieurs résidus sérine dans la partie N-terminale de la protéine, mais que la sérine 105 était le site majeur



(PIKKARAINEN *et al.*, 2004)

Figure 3. Structure de la protéine Gata4 murine.

La protéine Gata4 murine est formée de 440 acides aminés. Les domaines de transactivation, situés dans la partie N-terminale de la protéine, sont indiqués en rouge. Le domaine de liaison à l'ADN est formé de deux motifs en doigt de Zn : un motif en N-terminal (acides aminés 215 à 240) et un motif en C-terminal (acides aminés 270 à 294), qui sont tous deux indiqués en bleu. Le domaine de localisation nucléaire de la protéine (acides aminés 254 à 324), adjacent au doigt de Zn en C-terminal, est indiqué en vert. La sérine 105 est un site de phosphorylation par les MAPK et la sérine 261 est un site de phosphorylation par la PKA. Dans un modèle cardiaque, il a été démontré que la mutation simple V217G abolit l'interaction avec le facteur Fog2.

de phosphorylation (CHARRON *et al.*, 2001; LIANG *et al.*, 2001). Il a été montré que la phosphorylation de la sérine 105 par ERK2 augmente l'activité de liaison à l'ADN de la protéine Gata4 de 1,5 fois, ce qui en fait un site de régulation important (LIANG *et al.*, 2001).

Dans les cellules des gonades, Gata4 serait régulé au niveau post-traductionnel par la voie de l'AMPC/PKA via une phosphorylation directe (TREMBLAY et VIGER, 2003). La mutation de la sérine 261 ou une délétion plus étendue dans la partie N-terminale de la protéine diminue sévèrement sa phosphorylation par la PKA ainsi que son potentiel d'activation, sans affecter les niveaux de transactivation de base. Puisque la réduction n'est pas complète et ne permet pas de retourner au niveau de transactivation de base, il pourrait y avoir d'autres sites potentiels de phosphorylation par la PKA de plus faible affinité dans la région C-terminale de la protéine. La PKA pourrait également jouer indirectement sur la phosphorylation de la sérine 105 par la voie des MAPK. La phosphorylation directe de la sérine 261 par la PKA augmente l'activité transcriptionnelle de Gata4 et permet de réguler son activité (TREMBLAY et VIGER, 2003).

La phosphorylation de Gata4 semble un mécanisme de régulation important de la protéine. Elle peut influencer son activité intrinsèque en stimulant sa liaison à l'ADN ainsi que son activité transcriptionnelle, mais elle peut également influencer sa capacité d'interagir avec d'autres facteurs de transcription (TREMBLAY et VIGER, 2003), ce qui représente un mécanisme de régulation supplémentaire. Un jeu de phosphorylation de différents acides aminés représente donc un mécanisme pour répondre différemment aux stimuli que reçoit la cellule.

3.4 Partenaires d'interaction

Il a été démontré que Gata4 coopérait avec plusieurs autres facteurs de transcription et cofacteurs. Les facteurs impliqués changent selon le tissu étudié. Les interactions physiques se produisent au niveau des motifs en doigts de zinc et affectent positivement ou négativement le potentiel d'activation transcriptionnelle de Gata4 (PIKKARAINEN *et al.*, 2004).

3.4.1 Cdx2 et HNF-1 α

Le facteur de transcription à homéodomaine Cdx2 est exprimé seulement au niveau de l'épithélium intestinal (JAMES *et al.*, 1994) où il joue plusieurs rôles cruciaux. Il stimule la différenciation cellulaire ainsi que l'expression de la sucrase-isomaltase, un gène spécifique à l'intestin qui code pour une protéine responsable de la digestion du sucrose (SUH et TRABER, 1996). Au cours du développement, le gène *Cdx2* dicte l'identité intestinale et sa suppression chez la souris entraîne la mort embryonnaire autour de 3,5 jours causée par un défaut d'implantation (BECK *et al.*, 1999; SILBERG *et al.*, 2002). Le facteur de transcription HNF-1 α est quant à lui exprimé au niveau du foie, des reins et des intestins et est impliqué dans la régulation de plusieurs gènes. Une étude portant sur la régulation de l'expression du gène de la sucrase-isomaltase a mené à la découverte d'une coopération entre Gata4, Cdx2 et HNF-1 α au niveau intestinal (BOUDREAU *et al.*, 2002). Plus récemment, une étude s'est intéressée à la coopération de ces trois facteurs dans les cellules normales de cryptes intestinales humaines HIEC et a démontré que l'ajout de Gata4 à Cdx2 et HNF-1 α permettait aux cellules de subir des changements morphologiques et d'entamer un processus de différenciation entérocytaire impossible en absence de Gata4 (BENOIT *et al.*, 2010).

3.4.2 Fog

La découverte des protéines Friend of Gata-1 (Fog1) (TSANG *et al.*, 1997) et Fog2 (LU *et al.*, 1999; SVENSSON *et al.*, 1999; TEVOSIAN *et al.*, 1999) est une autre évidence que les facteurs Gata n'agissent pas seuls. Les deux membres de la famille Fog peuvent interagir avec chacun des six membres de la famille Gata *in vitro*. Les interactions se produisent entre les nombreux domaines en doigt de Zn des protéines Fog et le doigt de Zn en N-terminal des protéines Gata (FOX *et al.*, 1999). La formation de complexes Gata:Fog est d'ailleurs essentielle au développement de plusieurs tissus et peut soit activer ou réprimer la transcription des gènes cibles (CANTOR et ORKIN, 2005).

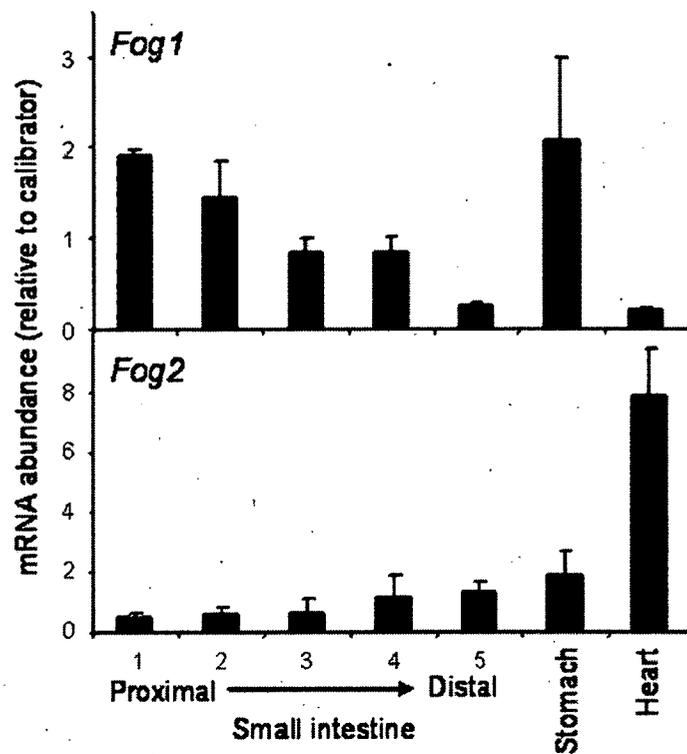
Les membres de la famille Fog sont de grosses protéines contenant plusieurs domaines en doigts de Zn. Chez l'embryon de la souris, *Fog1* est exprimé au niveau du

foie, de l'épithélium intestinal et du mésencéphale, tandis qu'il est exprimé au niveau de la moelle osseuse, de la rate, du foie et des testicules chez la souris adulte (TSANG *et al.*, 1997). *Fog1* encode pour une protéine de 995 acides aminés et a un poids moléculaire prédit de 110 kDa. Chez la souris, *Fog1* contient 9 doigts de zinc qui sont distribués tout le long de la protéine et sa suppression entraîne la mort entre 10,5 et 12,5 jours embryonnaires suite à une anémie sévère (TSANG *et al.*, 1998). *Fog2* est quant à lui surtout exprimé au niveau du cœur et du cerveau de la souris en développement de même qu'à l'âge adulte. *Fog2* encode pour une protéine de 1151 acides aminés ayant un poids moléculaire prédit de 128 kDa. *Fog2* est très similaire à *Fog1* et contient 8 motifs en doigts de Zn (LU *et al.*, 1999; SVENSSON *et al.*, 1999; TEVOSIAN *et al.*, 1999). Tout comme *Fog1*, sa suppression chez la souris est létale. Les embryons *Fog2*^{-/-} meurent entre 12,5 et 15,5 jours embryonnaires d'un défaut cardiaque congénital (TEVOSIAN *et al.*, 2002).

Au niveau intestinal, il semble que ce soit surtout *Fog1* qui soit exprimé. Chez la souris, des études histologiques ont montré que *Gata4* et *Fog1* sont coexprimés dans les cellules épithéliales gastriques de 11,5 à 18,5 jours embryonnaires. Les interactions entre *Gata4* et *Fog1* à ce stade seraient essentielles à la signalisation entre l'épithélium et le mésenchyme menant au développement de l'estomac (JACOBSEN *et al.*, 2005). C'est plutôt *Fog1* qui serait présent dans l'estomac ainsi que dans l'intestin de la souris adulte, où il présenterait un patron d'expression proximal à distal décroissant et serait très faiblement exprimé dans le cœur (Figure 4). Selon cette même étude, *Fog2* présenterait un patron d'expression inverse à *Fog1* et serait faiblement exprimé au niveau de l'intestin grêle (DALE *et al.*, 2007) mais très présent dans le cœur. *Gata4* et *Fog1* interagiraient ensemble dans l'épithélium de l'intestin grêle pour réprimer la transcription de gènes cibles (BEULING *et al.*, 2008).

3.5 Localisation dans l'intestin

Chez la souris adulte, l'ARNm de *Gata4* est retrouvé au niveau du cœur, de l'intestin grêle, des gonades, des poumons et du foie. Au niveau de l'embryon et du fœtus, *Gata4* est exprimé dans le cœur, le tube digestif proximal et distal, les gonades, le



(BEULING *et al.*, 2008)

Figure 4. Niveaux d'expression de *Fog1* et *Fog2*.

Par analyse RT-PCR en temps réel, les niveaux d'ARNm de *Fog1* et *Fog2* présentent des patrons d'expression opposés. *Fog1* a un patron d'expression décroissant de façon proximal à distal dans l'intestin grêle. Il est présent dans l'estomac, mais faiblement exprimé dans le cœur de la souris adulte. *Fog2* présente de faibles niveaux d'expression dans l'intestin grêle et l'estomac, mais est fortement exprimé dans le cœur de la souris adulte.

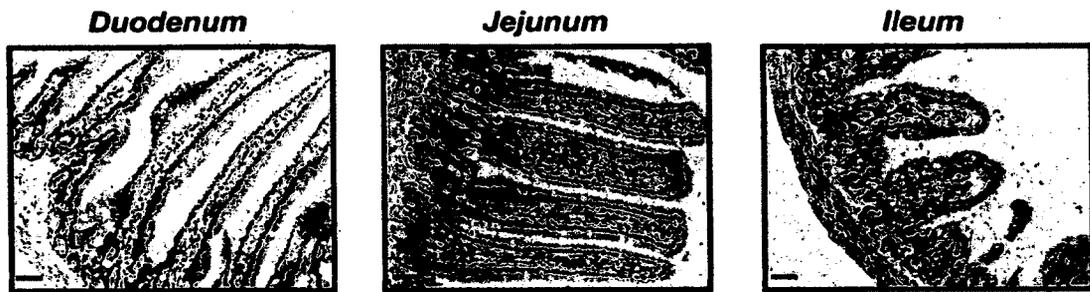
foie, l'endoderme viscéral et pariétal (ARCECI *et al.*, 1993). *Gata4* présente un patron d'expression rostro-caudal décroissant dans l'épithélium intestinal. Chez la souris adulte, *Gata4* est fortement exprimé dans le duodénum et le jéjunum et devient indétectable dans l'iléon distal et le côlon (Figure 5). Parmi les cellules épithéliales intestinales, les cellules absorbantes de la crypte mais surtout de la villosité ainsi que les cellules de Paneth expriment *Gata4*, tandis que les cellules à mucus et les cellules entéroendocrines positives pour la chromogranine A n'en expriment pas (BOSSE *et al.*, 2006; BATTLE *et al.*, 2008).

3.6 Rôles dans l'intestin

Gata4 est un régulateur de l'expression génique important dans différents tissus. Au cours de la dernière décennie, plusieurs études se sont intéressées à ses rôles dans l'intestin.

3.6.1 Régulation de gènes intestinaux

L'épithélium intestinal produit plusieurs enzymes impliquées dans la digestion des nutriments dans la lumière intestinale. La sucrase-isomaltase est une enzyme responsable de la digestion de différents sucres, notamment le sucrose, et qui est exprimée dans la bordure en brosse des entérocytes matures. Le promoteur de la sucrase-isomaltase contient plusieurs sites de régulation importants pouvant lier HNF-1 α , *Gata4*, et *Cdx2*. Ces facteurs coopèrent pour activer synergiquement les promoteurs de la sucrase-isomaltase et de la phospholipase A intestinale/lysophospholipase, une enzyme permettant la dégradation des phospholipides en acides gras et glycérol. Dans les cellules Caco-2, il a été montré que *Gata4* seul n'influence pas significativement l'activité transcriptionnelle de la sucrase-isomaltase et de la phospholipase A intestinale/lysophospholipase tandis que l'addition de *Cdx2* et HNF-1 α en présence de *Gata4* crée un effet synergique (BOUDREAU *et al.*, 2002). *Gata4* a également été identifié comme un régulateur important de la lactase-phlorizin hydrolase (LPH), une enzyme sécrétée par les entérocytes matures de l'intestin grêle et qui est responsable de la digestion du lactose. *Gata4* est le principal facteur *Gata* capable de lier le promoteur de la LPH. Il peut également coopérer avec HNF-1 α afin d'augmenter de façon synergique l'activité transcriptionnelle du promoteur (VAN WERING *et al.*, 2004). Une récente étude a



(BATTLE *et al.*, 2008)

Figure 5. Expression de Gata4 dans l'intestin de la souris adulte.

Par analyse immunohistochimique, on constate que la protéine Gata4 (en brun) est retrouvée au niveau du noyau des cellules épithéliales intestinales du duodénum et du jéjunum, mais est absent de l'iléon chez la souris adulte. Barre d'échelle, 50 μ m.

montré que Gata4 semblait promouvoir des changements morphologiques dans des cellules épithéliales intestinales humaines. Les lignées exprimant Gata4 et HNF-1 α ensemble semblaient avoir une meilleure polarisation et présentaient des caractéristiques fonctionnelles de cellules différenciées telles que des microvillosités (BENOIT *et al.*, 2010). Gata4, Cdx2 et HNF-1 α peuvent donc interagir ensemble pour activer la transcription de plusieurs gènes intestinaux.

3.6.2 Régulation des jonctions cellulaires

Les Claudines sont des protéines régulatrices importantes des jonctions serrées. La Claudine-2, contrairement à la majorité des autres membres de cette famille, a un effet négatif sur l'étanchéité des jonctions serrées (ESCAFFIT *et al.*, 2005). Chez le rat, la Claudine-2 est détectée dans les cryptes de l'intestin grêle et du côlon. Dans l'intestin grêle humain, elle est également retrouvée au niveau des villosités. Il a été démontré que GATA4 joue un rôle dans les mécanismes moléculaires qui orchestrent le maintien de la Claudine-2 le long de l'axe crypte-villosité humain, ce qui constitue une première évidence de l'implication possible de GATA4 dans la régulation de l'étanchéité de la barrière intestinale. En effet, des études transcriptionnelles ont montré que GATA4 coopère avec CDX2 et HNF-1 α pour activer le promoteur de la Claudine-2, mais non celui de la Claudine-4, ce qui soulève l'hypothèse qu'une déficience en GATA4 pourrait être directement impliquée dans le déclin du niveau de la Claudine-2, et ainsi une modulation à la hausse de l'étanchéité de la muqueuse intestinale (ESCAFFIT *et al.*, 2005).

3.6.3 Maintien des identités jéjunum-iléon

Le patron d'expression rostro-caudal décroissant de Gata4 ainsi que son implication dans la régulation de plusieurs gènes intestinaux a mené à des études *in vivo* visant à approfondir l'étude de ses rôles possibles au sein de l'épithélium intestinal. Une première étude a proposé un rôle essentiel pour Gata4 dans le maintien de l'identité du jéjunum et de l'iléon dans l'intestin grêle de la souris adulte (BOSSE *et al.*, 2006). Dans un modèle de souris inductible exprimant un mutant de la protéine Gata4 inactif, certains gènes normalement exprimés dans le jéjunum mais non dans l'iléon ont été retrouvés

modulés à la baisse, tels que les gènes *Fabp1* et *LPH*. Le phénomène inverse a également été observé, soit que d'autres gènes normalement exprimés seulement dans l'iléon ont été modulés à la hausse dans le jéjunum, ce qui a été le cas de gènes impliqués dans le transport des acides biliaires. L'étude a également mesuré l'effet de l'inactivation de *Gata4* sur les différentes populations de cellules intestinales. La perte de *Gata4* semblait provoquer une augmentation de la population de cellules caliciformes ainsi qu'une redistribution des sous-populations de cellules entéroendocrines. Il a été montré que cet effet pouvait être médié par le gène encodant pour la protéine *Math1*, une protéine importante dans l'activation de la lignée sécrétrice intestinale (BOSSE *et al.*, 2006).

Une autre étude est venue appuyer la plupart de ces résultats, validant l'hypothèse que la protéine *Gata4* était essentielle au maintien de l'identité du jéjunum (BATTLE *et al.*, 2008). Des souris n'exprimant pas la protéine *Gata4* seulement au niveau de l'épithélium intestinal ont été utilisées afin de vérifier la capacité du jéjunum d'effectuer ses fonctions normales, mais également de comparer l'expression des gènes dans le jéjunum et l'iléon. Les auteurs ont d'abord observé que les souris mutantes étaient légèrement mais significativement plus légères que les souris contrôles avant le sevrage. Suite à l'analyse phénotypique, les auteurs ont noté que la morphologie des cryptes était largement affectée, les villosités étant plus courtes mais plus larges dans l'épithélium des souris déficientes en *Gata4*. Le jéjunum de ces souris a montré une forte diminution de sa capacité d'absorber le cholestérol et les gras alimentaires. Il présentait également une perte d'expression de 53 % des gènes spécifiques au jéjunum, tandis qu'il présentait un gain d'expression de 47 % des gènes spécifiques à l'iléon, ce qui expliquerait la difficulté d'absorption des gras du jéjunum mutant pour *Gata4*. *Gata4* joue donc un rôle important dans le maintien des identités jéjunum-iléon.

3.6.4 *Gata4* dans un contexte inflammatoire

Jusqu'à présent, deux études publiées suggèrent une implication de *Gata4* dans le processus inflammatoire. Les entérocytes participent à la réponse de phase aiguë, un ensemble de réactions locales et systémiques qui se développent suite à un dommage tissulaire ou une infection et qui résultent en l'expression des gènes des protéines de phase

aiguë. Gata4 serait impliqué dans la régulation des protéines de phase aiguë de façon C/EBP-dépendante ou C/EBP-indépendante (TURGEON *et al.*, 2008). Gata4 serait donc un facteur important dans l'établissement de la régulation des réponses transcriptionnelles spécifiques des cellules épithéliales intestinales en contexte inflammatoire.

Les deux formes majeures de maladies inflammatoires intestinales (MII) chez l'humain sont la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Ce sont des réactions inflammatoires chroniques rémittentes ou progressives qui peuvent affecter tout le tractus gastro-intestinal, dans le cas de la maladie de Crohn, ou seulement la muqueuse colonique, dans le cas de la colite ulcéreuse, et qui sont associées avec un risque accru de cancer du côlon (KASER *et al.*, 2010). Récemment, l'analyse de plusieurs échantillons d'intestin normaux et enflammés provenant de patients sains ou atteints de MII ont été analysés en immunohistochimie afin de tester si GATA4 était présent dans un contexte inflammatoire (HAVERI *et al.*, 2009). De façon étonnante, il a été montré que la protéine GATA4 était exprimée dans la muqueuse du côlon des patients atteints de MII, alors qu'elle y est normalement absente. La protéine GATA6, normalement exprimée dans le côlon, demeurerait inchangée dans les tissus enflammés. TGF- β 1 serait responsable de la régulation à la hausse de GATA4 et tous deux seraient impliqués dans la guérison de l'épithélium enflammé.

3.6.5 Identification d'une nouvelle cible potentielle chez le rat : *Pap1*

Notre laboratoire s'intéresse depuis longtemps au rôle physiologique de Gata4 dans la régulation des fonctions de l'épithélium intestinal. Nous avons identifié, par l'établissement d'une lignée de cellules épithéliales intestinales où Gata4 est modulé à la baisse, les produits de gènes dont l'expression est modulée de façon précoce suite à la perte de Gata4. Les gènes pancreatitis-associated protein (*Pap*) 1 et 3 ont été montrés diminués de 1,8 fois dans ce contexte. Le laboratoire s'est alors intéressé au gène *Pap1* comme cible potentielle de Gata4 et la caractérisation de l'activité transcriptionnelle de Gata4 sur le promoteur de *Pap1* fut amorcée (BROUILLARD, 2008).

4. Le peptide antimicrobien Pap1

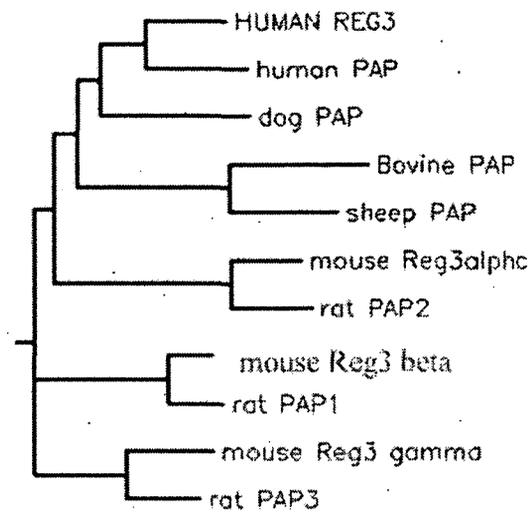
4.1 La famille Pap

La famille des Pancreatitis-associated proteins (Pap) renferme trois isoformes chez le rat et la souris : Pap1, Pap2 et Pap3. Seulement deux isoformes sont retrouvées chez l'humain et une seule chez le chien, le bovin et le mouton (VITERBO *et al.*, 2008). En comparant les protéines Pap à travers les espèces, la conservation de la structure primaire de ces protéines varie entre 47 et 91 %. Cette variation suggère que les protéines pourraient avoir des fonctions diverses. Cependant, en observant l'arbre phylogénétique des différentes isoformes de Pap, on observe qu'elles ont une origine commune (Figure 6). Certaines isoformes présentent toutefois une plus grande similarité; Pap1 appartient au même groupe que Reg3 β et Pap3 au même groupe que Reg3 γ (VITERBO *et al.*, 2008).

Les protéines Pap appartiennent à la sous-famille des lectines de type C (calcium-dépendantes), des petites protéines conservées évolutivement qui appartiennent à la famille des gènes *Reg3*. Toutes les lectines de type C possèdent un domaine consensus de liaison des carbohydrates (Figure 7). Les protéines Pap sont les plus petites protéines de la sous-famille, ne contenant que le domaine consensus de liaison aux carbohydrates lié à un court peptide N-terminal (CLOSA *et al.*, 2007). Les lectines de type C sembleraient être impliquées dans la régulation du processus inflammatoire. De récentes études ont effectivement démontré que les protéines Pap sont des protéines de phases aiguës impliquées dans les mécanismes de réponse tant anti- que proinflammatoire. Les protéines Pap seraient donc des régulateurs clés de l'inflammation et leur absence pourrait causer une dérégulation des processus inflammatoires (VITERBO *et al.*, 2008).

4.2 La protéine Pap1

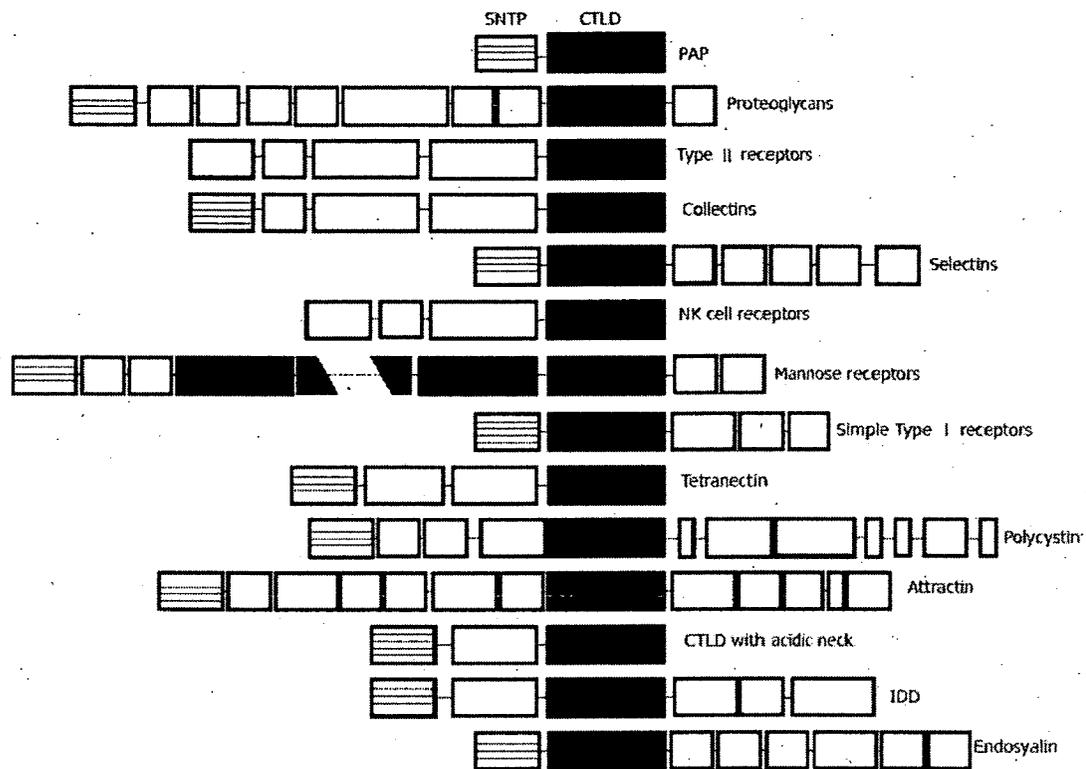
Pap1 a été la première protéine Pap découverte en 1984 dans le jus pancréatique de rats atteints de pancréatite aiguë (KEIM et LOFFLER, 1986). La protéine était absente dans les rats contrôles, mais apparaissait rapidement suite à l'induction de la pancréatite dans les rats expérimentaux puis demeurait élevée au cours des 3 à 4 jours suivants. L'analyse de la séquence nucléotidique a permis de déduire que la protéine Pap1 était



(VITERBO *et al.*, 2008)

Figure 6. Arbre phylogénique des protéines Pap de différentes espèces.

L'analyse phylogénique des séquences permet de regrouper les protéines Pap de rat et de souris ensemble, de même que les protéines Pap de bovin et mouton. Trois sous-regroupements sont formés par les isoformes de Pap de rat et de souris. Les protéines PAP humaine et canine ne peuvent être groupées avec des protéines Pap d'autres espèces.



(CLOSA *et al.*, 2007)

Figure 7. Représentation schématique de différentes protéines contenant un domaine lectine de type C.

Les séquences de différentes protéines contenant un domaine lectine de type C (CTLD) sont alignées. Notez que la protéine Pap est le membre le plus petit, ne contenant que le CTLD lié à un court peptide N-terminal (SNTP).

synthétisée sous forme de préprotéine et que, dans sa forme mature, elle a un poids moléculaire de 16,6 kDa (IOVANNA *et al.*, 1991). La séquence codante de la protéine Pap1 s'étale sur six exons. Les trois premiers exons encodent pour la région non transcrite en 5' de l'ARNm, le peptide signal, ainsi que 39 acides aminés de l'extrémité N-terminale de la protéine mature. Les trois autres exons encodent pour le domaine consensus de liaison aux carbohydrates, caractéristiques des lectines de type C (DUSETTI *et al.*, 1993). Le promoteur du gène a également été caractérisé sur une région s'étalant de -1253 pb à + 10 pb par rapport au site d'initiation de la transcription. Il a été montré que la région promotrice contenait plusieurs cis-régulateurs positifs et négatifs interagissant avec différentes protéines et que cette région serait responsable de l'expression différentielle de Pap1 dans les tissus (DUSETTI *et al.*, 1995).

4.3 Localisation

Au niveau du pancréas, Pap1 est exprimé constitutivement par les cellules α des îlots de Langerhans. Cependant, dans le pancréas exocrine, Pap1 est seulement exprimé en cas de dommages aux cellules acinaires. Son expression peut alors augmenter fortement et rapidement. Pap1 n'est pas seulement exprimé par le pancréas, son ARNm est aussi retrouvé au niveau des glandes salivaires, du cerveau, des reins, de l'estomac, de l'intestin, du foie et des gonades (IOVANNA *et al.*, 1991; CLOSA *et al.*, 2007). De façon générale, Pap1 est faiblement exprimé de base, mais son expression augmente radicalement lorsque le tissu enclenche un processus inflammatoire (CLOSA *et al.*, 2007).

L'ARNm de Pap1 est exprimé dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon de façon constitutive, mais il n'est pas détecté au niveau du côlon (DUSETTI *et al.*, 1993). Il est intéressant de noter que Pap3 a un patron d'expression très similaire à Pap1, tandis que Pap2 n'est aucunement exprimé au niveau du tractus intestinal (DUSETTI *et al.*, 1995). Des études réalisées chez l'humain et la souris ont rapporté que, dans la muqueuse intestinale, Pap1 était surtout exprimé par les cellules de Paneth, quoique les entérocytes et les cellules caliciformes peuvent également sécréter la protéine en plus faible quantité (MASCIOTRA *et al.*, 1995; GIRONELLA *et al.*, 2005; BRANDL *et al.*, 2007; BROUILLARD, 2008).

4.4 Régulation par les bactéries

La lumière intestinale est l'hôte d'une grande quantité de bactéries saprophytes essentielles à la fonction digestive. Une étude réalisée chez l'humain et la souris a permis d'établir que l'expression de la protéine Pap1 dans l'intestin pouvait être contrôlée par la présence de ces bactéries. En effet, certaines entérobactéries Gram négatives sont capables d'induire la sécrétion de Pap1 par les cellules de Paneth, alors que les bactéries Gram positives en sont incapables (CASH *et al.*, 2006). C'est ce qui expliquerait la quantité importante de protéine Pap1 retrouvée de façon constitutive dans l'intestin mature sain. L'expression prophylactique de cette lectine de type C représenterait une forme primitive de mécanisme de défense immunitaire qui aurait été conservée dans l'évolution (CASH *et al.*, 2006).

4.5 Régulation par les cytokines inflammatoires

Chez le rat, plusieurs médiateurs de l'inflammation peuvent influencer la transcription du gène *Pap1*. Des études *in vitro* ont montré que l'expression génique de *Pap1* était induite par l'INF- γ et le TNF- α , quoique d'un ordre 100 fois inférieur à l'induction obtenue en présence de la combinaison de IL-6 et dexaméthasone. Le promoteur de *Pap1* permettrait au gène d'être régulé par plusieurs voies différentes, selon le contexte tissulaire. L'INF- γ et le TNF- α sont deux médiateurs de l'inflammation extrêmement puissants, mais de plus en plus d'études démontrent que l'association de plusieurs cytokines ensembles ou de cytokines avec des cofacteurs tels que les glucocorticoïdes serait encore plus efficace pour induire l'expression des protéines de phase aiguë telle que Pap1 (DUSETTI *et al.*, 1995). En contexte physiologique, ce serait donc ces différentes associations qui détermineraient quelles molécules sont induites en réponse à un stress inflammatoire.

4.6 Rôles dans l'intestin

De plus en plus d'études attribuent à Pap1 un rôle de médiateur anti-inflammatoire. La sécrétion de Pap1 serait une réponse cellulaire à un stress

inflammatoire qui permettrait aux mammifères de se défendre de façon plus efficace. Ainsi, l'expression de *Pap1* a été observée dans le cas de plusieurs maladies impliquant un processus inflammatoire (FIEDLER *et al.*, 1998; CLOSA *et al.*, 2007). Par exemple, dans le cas de la pancréatite aiguë, l'activation de l'expression de *Pap1* augmenterait significativement la survie de l'animal (FIEDLER *et al.*, 1998). Au niveau intestinal, *Pap1* peut lier et agréger plusieurs souches bactériennes présentes dans la lumière intestinale (IOVANNA *et al.*, 1991). Cela suggère que *Pap1* serait un agent antibactérien jouant un rôle de prévention des infections et de leurs complications. Il a été démontré que son activité antibactérienne est directe. En effet, *Pap1* est capable de lier à lui seul les peptidoglycans de la paroi des bactéries Gram positives et entraîner la lyse cellulaire (CASH *et al.*, 2006; LEHOTZKY *et al.*, 2010).

4.7 Implication dans les maladies intestinales

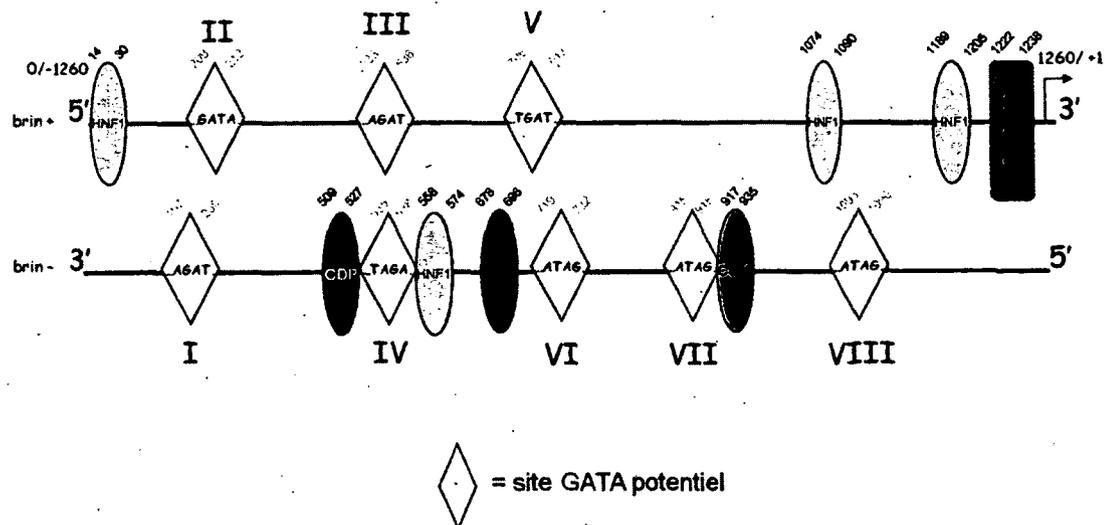
Une augmentation de l'expression de PAP a été observée chez des patients atteints de maladie de Crohn, de colite ulcéreuse, de maladie céliaque, ainsi que de cancers gastrointestinaux (CARROCCIO *et al.*, 1997; MOTOO *et al.*, 1998; MOTOO *et al.*, 1999; OGAWA *et al.*, 2003; GIRONELLA *et al.*, 2005; CLOSA *et al.*, 2007; CAO *et al.*, 2009). Dans la majorité des cas, il a été trouvé que les cellules de Paneth sécrètent davantage de PAP dans la lumière intestinale. Également, le niveau de PAP est augmenté de façon proportionnelle à la gravité des lésions dans le sérum des patients souffrant de la maladie par rapport aux patients sains. Dans les cas des affections touchant le côlon, l'apparition de PAP semble corrélée avec l'apparition de cellules de Paneth dans le tissu. Le rôle de médiateur inflammatoire de PAP ne serait donc pas limité au pancréas, mais constituerait plutôt une réponse générale des cellules épithéliales à des processus inflammatoires.

5. Problématique et objectifs de recherche

Suite à la découverte de *Pap1* comme cible potentielle de Gata4, notre laboratoire avait entamé la caractérisation de l'activité transcriptionnelle de Gata4 sur le promoteur de *Pap1* (BROUILLARD, 2008). L'étude détaillée du promoteur de ce gène, chez le rat, fut effectuée sur une zone limitée aux 1260 pb en amont du site d'initiation de la

transcription. L'analyse informatique de la séquence avait permis d'identifier huit sites Gata, ayant été numérotés de I à VIII (Figure 8). Le potentiel *in vitro* de Gata4 à lier ces éléments a été confirmé par analyse de gel de rétention. Suite à ces premiers résultats, notre hypothèse générale était donc que le facteur de transcription Gata4, de par son action sur *Pap1*, pouvait être impliqué dans la réponse inflammatoire des cellules épithéliales intestinales. Afin de vérifier l'implication transcriptionnelle de Gata4 dans ce processus, trois objectifs de départ avaient été fixés, soit de :

1. Caractériser l'activité transcriptionnelle de Gata4 sur le promoteur de *Pap1*
2. Déterminer les mécanismes de régulation moléculaire de Gata4 dans un contexte de stress inflammatoire
3. Mesurer l'effet d'une modulation de Gata4 dans l'inflammation intestinale



(BROUILLARD, 2008)

Figure 8. Représentation schématique du promoteur *Pap1* de rat.

Résultat de l'analyse informatique par le logiciel MatInspector d'une portion de 1260 pb en amont du site d'initiation de la transcription du gène *Pap1* de rat. Cette région promotrice contient huit sites d'interaction avec Gata4 confirmés (BROUILLARD, 2008), ainsi que quatre sites potentiels d'interaction pour HNF-1, un pour CDP, un pour Cdx1 et un pour Cdx2.

II - Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire

1.1 Modèles

1.1.1 Les cellules IEC-6/Cdx2

Les cellules IEC-6/Cdx2, des cellules épithéliales normales dérivées d'iléon de rat adulte (QUARONI *et al.*, 1979) où l'expression de Cdx2 est faible de base mais peut être régulée de façon inductible (SUH et TRABER, 1996), sont cultivées dans du milieu DMEM (Gibco BRL, Burlington, Canada) supplémenté avec 5 % de sérum foetal bovin (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, USA), 2 mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Canada), 0,01 mM de tampon HEPES (Gibco BRL, Burlington, Canada), 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Canada) et 0,1 U/ml d'insuline biosynthétique humaine (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Danemark). Cette lignée cellulaire croit dans un environnement dont la température est fixée à 37 °C et dont le taux de CO₂ est maintenu à 5 %. Du milieu frais est ajouté aux cellules tous les deux jours, et les cellules ont été réensemencées à l'atteinte de la confluence, dans un ratio de 1 : 10.

1.1.2 La coculture de cellules IEC-6/Cdx2 sur cellules mésenchymateuses

La méthode utilisée pour établir et cultiver la coculture mésenchyme-épithélium est celle décrite par la Dre Carine Lussier (LUSSIER *et al.*, 2008). Les cellules mésenchymateuses utilisées proviennent d'iléons de fœtus humains âgés entre 17 et 20 semaines.

1.1.3 Les cellules Caco-2/15, NIH 3T3 et HEK 293T

La lignée cellulaire Caco-2/15, un clone de la lignée parentale Caco-2 (BEAULIEU et QUARONI, 1991), provient d'un adénocarcinome colorectal humain et a la particularité d'entamer un processus de différenciation épithéliale à l'atteinte de la confluence. Les cellules NIH 3T3 sont des cellules fibroblastiques embryonnaires de

souris (JAINCHILL *et al.*, 1969). Les cellules HEK 293T sont des cellules transformées de rein fœtal humain (AIELLO *et al.*, 1979). Ces trois types cellulaires ont été cultivés dans du milieu DMEM supplémenté avec 10 % de FBS, 2 mM de glutamine, 0,01 mM d'HEPES et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine. Ces lignées croissent dans un environnement dont la température est fixée à 37 °C et dont le taux de CO₂ est maintenu à 5 %. Du milieu frais est ajouté aux cellules tous les deux jours, et les cellules ont été réensemencées à l'atteinte de la confluence pour les NIH 3T3 et HEK 293T et avant la confluence pour les Caco-2/15, dans un ratio de 1 : 5.

1.2 Lignées cellulaires IEC-6/cdx2 Gata4, Gata4 Δ216-240 et Gata4 Δ270-294

1.2.1 Production de rétrovirus

1.2.1.1 Préparation des ADN et transfection transitoire

Les vecteurs rétroviraux (5µg) pBabePuro vide, pBabePuro/Gata4, pBabePuro/Gata4 Δ216-240 et pBabePuro/Gata4 Δ270-294, gracieusement offert par le laboratoire du Pr. Claude Asselin (RÉMILLARD, 2009), ont été mélangés à l'ADN rétroviral (5 µg) et à 1,5 ml d'OptiMEM (Invitrogen, Burlington, Canada). Les mélanges d'ADN ont été transfectés par lipofection dans la lignée cellulaire HEK 293T, ensemencée la veille dans des boîtes de pétri de 100 mm² et dont la confluence est d'environ 90 % au moment de la transfection. Pour chaque mélange d'ADN, 20 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, Canada) ont été pré-incubés avec 1,5 ml du milieu OptiMEM pendant 5 minutes à la température de la pièce. Suite à la préincubation, 1,5 ml du mélange Lipofectamine 2000/OptiMEM a été ajouté à chaque tube d'ADN/OptiMEM et l'incubation a été poursuivie pendant 20 minutes à la température de la pièce. Le milieu de culture des HEK 293T a été remplacé par 5 ml de milieu OptiMEM, et 3 ml du mélange ADN/Lipofectamine 2000/OptiMEM ont été ajoutés goutte à goutte dans chaque boîte de Petri. Les cellules ont été incubées pendant 4 heures à 37 °C et le milieu OptiMEM a été remplacé par 7 ml de milieu DMEM enrichi de 10 % FBS. Les cellules ont été incubées pendant 2 jours à 37 °C.

1.2.1.2 Récolte des virus

Le milieu de culture des cellules HEK 293T transfectées, contenant les virus en suspension, a été prélevé à l'aide d'une seringue de 10 ml (BD Biosciences, Mississauga, Canada) et filtré à travers des pores de 0,45 μm de diamètre. Les particules virales récoltées ont été aliquotées et conservées à -80 °C.

1.2.2 Infection rétrovirale

Les suspensions virales (700 μl) ont été dégelées à 37 °C et 0,7 μl de polybrène (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (concentration finale de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y ont été ajoutés. Ce mélange a ensuite été ajouté sur les cellules IEC-6/Cdx2, dont le milieu a été préalablement enlevé. Ces cellules ont été utilisées à environ 50 % de confluence, et elles ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits. Les cellules ont été incubées 1 heure à 37 °C et 1,3 ml du milieu approprié à ces cellules (DMEM 5% FBS) additionné de 1,3 μl de polybrène 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a été ajouté à chaque puit. Les cellules ont été incubées pendant 2 jours à 37 °C. Par la suite, le milieu des cellules a été remplacé à tous les deux jours pendant deux semaines par du milieu DMEM 5 % FBS additionné de puromycine à concentration finale progressive de 2,5 à 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, selon l'état des cellules, afin de sélectionner les cellules ayant incorporé les vecteurs rétroviraux.

1.3 Induction d'un stress inflammatoire cellulaire

Avant l'induction du stress inflammatoire, les cellules IEC-6/Cdx2 ont d'abord été amenée à se différencier en induisant l'expression de Cdx2 dans la lignée. Lorsque les cellules IEC-6/Cdx2 ont atteint 90-95 % de confluence, elles ont été induites à la différenciation, par l'ajout de 4 mM d'IPTG (Fisher, Mississauga, Canada) au milieu de culture, pendant 5 jours. L'induction du stress inflammatoire a été réalisée suite à l'induction de la différenciation, par ajout de LPS (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ au milieu de culture. Les cellules ont été induites pendant 0, 2, 4, 6, 8 et 24 heures et des extractions de protéines nucléaires ont ensuite été réalisées.

1.4 Extractions protéiques

1.4.1 Protéines totales

L'isolement des protéines totales de cellules en culture a été effectué tel que décrit précédemment (BROUILLARD, 2008; DARSIGNY *et al.*, 2009). La concentration en protéines a été déterminée à l'aide de la trousse *Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1* (Bio-Rad, Mississauga, Canada).

1.4.2 Protéines nucléaires

Les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS 1X (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ et 2 mM de KH₂PO₄). Elles ont été récoltées avec un grattoir dans 1 ml de PBS 1X et centrifugé à 1800 g pendant 5 min à 4 °C. Le culot a été resuspendu dans 5 fois le volume de cellules avec le tampon hypotonique (10 mM tampon HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl) auquel a été ajouté juste avant l'extraction 5 mM DTT, 1 % de *protease inhibitor cocktail for mammalian tissues* (Sigma Aldrich, Oakville, Canada), 200 mM d'orthovanadate et 50 mM de NaF avant d'être centrifugé à 1800 g pendant 5 min à 4 °C. Le culot a été resuspendu dans 3 fois le volume de cellules avec le tampon hypotonique et laissé sur glace pendant 10 minutes. Les cellules ont été homogénéisées avec 20 coups de pilon B et centrifugées à 1200 g pendant 15 minutes à 4 °C. Les noyaux cellulaires obtenus ont été resuspendus progressivement dans 0,5 fois le volume du culot avec le tampon faible en sels (20 mM tampon HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 25 % glycérol, 0,2 mM EDTA) auquel a été ajouté juste avant l'extraction 5 mM DTT, 1 % de *protease inhibitor cocktail for mammalian tissues*, 200 mM d'orthovanadate et 50 mM de NaF. Ensuite, les noyaux cellulaires ont été éclatés par l'ajout de 0,5 fois le volume du culot de tampon fort en sels (20 mM tampon HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 1,2 M KCl, 25 % glycérol, 0,2 mM EDTA) auquel a été ajouté juste avant l'extraction 5 mM DTT, 1 % de *protease inhibitor cocktail for mammalian tissues*, 200 mM d'orthovanadate et 50 mM de NaF. Les protéines sont extraites des noyaux pendant 30 minutes à 4 °C avec agitation et ensuite centrifugées à 16 000 g pendant 30 secondes. La concentration en protéines dans le surnageant a été déterminée à l'aide de la trousse *Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1* (Bio-Rad, Mississauga, Canada).

1.5 Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN total des cellules a été effectuée selon le protocole *Totally RNA extract* (Ambion, Austin, USA) et les centrifugations ont été réalisées à 4 °C, tel que recommandé par le fabricant. Afin d'éliminer toutes les traces d'ADN, l'ARN a été traité à la DNase en accord avec les recommandations du fabricant (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Canada). L'ARN a ensuite été dosé par spectrophotométrie (Bio-Rad, Mississauga, Canada) et conservé à -80 °C.

1.6 Immunobuvardage

La révélation des protéines totales de cellules en culture a été effectuée telle que décrite précédemment (BROUILLARD, 2008; DARSIGNY *et al.*, 2009). Les anticorps utilisés sont décrits au tableau 1.

Tableau 1. Liste des anticorps utilisés lors de l'analyse des protéines par immunobuvardage.

Anticorps primaire	Fournisseur	Dilution	Temps d'incubation	Anticorps secondaire	Fournisseur	Dilution
Gata4 (C-20)	Santa Cruz, sc-1237	1:3000	O/N à 4 °C	Anti-chèvre d'âne	Santa Cruz, sc-2056	1:3000
Gata4 P-S105	Abcam, ab5245-50	1:1000	4h à TP	Anti-lapin d'âne	Santa Cruz, sc-2077	1:3000
Cdx2	(BOULANGER <i>et al.</i> , 2005)	1:25000	O/N à 4 °C	Anti-lapin d'âne	Santa Cruz, sc-2077	1:3000
Actine (C-11)	Santa Cruz, sc-1615	1:3000	1h à TP ou O/N à 4 °C	Anti-chèvre d'âne	Santa Cruz, sc-2056	1:3000

1.7 Constructions plasmidiques Pap1-luciférase

1.7.1 Amplification de la région promotrice *Pap1*

L'ADN génomique des cellules IEC-6/Cdx2 a été extrait en utilisant les colonnes QIAGEN (QIAGEN, Mississauga, Canada) selon la méthode décrite par le manufacturier. La région promotrice de 1253 pb en amont du site d'initiation de la transcription du gène *Pap1* de rat a été amplifiée à partir de 100 ng d'ADN génomique des cellules IEC-6/Cdx2

et des amorces sens (5'-CTG CAG ATT TTC CAG TTA GTC-3') et antisens (5'-GTG AGG ACA GAG ATG GCT GT-3'). L'amplification a été réalisée avec la polymérase HotStart PFU Ultra (Stratagene, Californie, États-Unis). L'amplification a été réalisée comme suit : 1 cycle de dénaturation initiale à 95 °C pendant 2 minutes ; 30 cycles d'incubation alternative de 30 sec à 95 °C, 30 sec à 57 °C et 2 minutes à 72 °C; et une élongation finale de 10 minutes à 72 °C. La réaction a finalement été refroidie à 4 °C.

1.7.2 Clonage dans le vecteur de transition TOPO

Le produit de PCR obtenu par l'amplification de la région promotrice de *Pap1* à partir de l'ADN génomique des cellules IEC-6/Cdx2 a été inséré dans le vecteur de transition *pCR Blunt II TOPO* à l'aide du *Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit* (Invitrogen, Burlington, Canada). L'intégrité de l'insert a été validée par séquençage à la Plateforme de Séquençage et de Génotypage des Génomes de l'Université Laval avec les amorces universelles SP6 et T7.

1.7.3 Sous-clonage dans le vecteur pGL3-Basic

Le promoteur *Pap1* cloné dans le vecteur TOPO ainsi que le vecteur luciférase pGL3-Basic ont d'abord été digérés avec l'enzyme de restriction *SacI* (Roche, Laval, Canada) avant d'être purifiés avec une colonne PCR Montage (Millipore Corporation, Massachusetts, États-Unis) selon les recommandations du manufacturier. Ils ont ensuite été digérés avec l'enzyme de restriction *XhoI* (Roche, Laval, Canada) et ont été repurifiés sur colonne PCR Montage. Les promoteurs *Pap1* ont été insérés dans le vecteur pGL3-Basic grâce à une ligation des extrémités cohésives de l'insert et du vecteur par l'enzyme *T4 DNA ligase* (New England Biolabs, Pickering, Canada). La ligation a été transformée dans les bactéries *Escherichia coli Stbl3* chimiquement compétentes selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen, Burlington, Canada). L'intégrité des inserts a été validée par séquençage à la Plateforme de Séquençage et de Génotypage des Génomes de l'Université Laval par les amorces universelles RVPrimer3 et GLPrimer2. La construction a été nommée *Pap1-luciférase*.

1.7.4 Mutagenèse de Pap1-luciférase

Le promoteur *Pap1* a été muté pour les sites Gata VI et VIII ainsi que pour le site Cdx2 à l'aide du kit *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene, Californie, États-Unis) selon les recommandations du manufacturier. Les amorces utilisées pour les réactions de mutagenèse dirigée sont présentées dans le tableau 2. Les bases soulignées sont celles qui ont été modifiées de la séquence originale. Une deuxième réaction de mutagenèse dirigée pour Cdx2 a été effectuée sur le mutant du site Gata VIII afin d'obtenir un double mutant. Les mutations ont été validées par séquençage à la Plateforme de Séquençage et de Génotypage des Génomes de l'Université Laval avec les amorces universelles RVPrimer3 et GLPrimer2.

Tableau 2. Séquence des oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse du promoteur *Pap1*.

Site	Région (pb)	Séquence 5'-3'
Gata VI	-552 à -513	CAAATGATATGAAGCTTTCGAAACATATCTAAAATCATC (1 ^{er} brin) GATGATTTTAGATATGTTTCGAAAGCTTCATATCATTTTG (2 ^e brin)
Gata VIII	-180 à -135	GAGGTAATATTTATGACAATTTCGAAGTTGTACCAGAAAAGTCACC (1 ^{er} brin) GGTGACTTTTCTGGTAACAACCTTCGAATTGTCATAAATATTACCTC (2 ^e brin)
Cdx2	-345 à -305	CTTAACCTTATCAGGTAATCCCACCTTAAAACCTATGTCACAG (1 ^{er} brin) CTGTGACATAGTTTAAAGTGGGATTACCTGATAAGTTAAG (2 ^e brin)

1.8 Essais luciférase

1.8.1 Préparation des cellules

Les cellules Caco-2/15 ont étéensemencées dans une plaque de 24 puits afin d'être à environ 70 % de confluence le jour de la transfection. Les cellules NIH 3T3 ont étéensemencées dans une plaque de 24 puits afin d'être à environ 90 % de confluence le jour de la transfection. Chaque condition fut évaluée en triplicata.

1.8.2 Transfection transitoire

Un total de 0,8 µg d'ADN par puit a été transfecté dont : 200 ng des différents vecteurs *Pap1*-luciférase mutés ou non; 0, 100, 200 ou 400 ng des vecteurs d'expression

pcDNA/Gata4 ou pBabePuro/Gata4, ou 400 ng de pBabePuro/Gata4 Δ 216-240 ou pBabePuro/Gata4 Δ 270-294 offerts par le laboratoire du Pr. Claude Asselin (RÉMILLARD, 2009); 5 ng du vecteur d'expression pcDNA/Cdx2; 200 ng du vecteur d'expression de Fog1; et une quantité complémentaire du vecteur pcDNA 3.1neo afin de compléter à 0,8 μ g. Le vecteur phRL-CMV Vector Renilla (5 ng) (Proméga, Madison, USA) a été ajouté à chaque mélange d'ADN pour évaluer l'efficacité de transfection dans chaque puit. Les ADN sont préparés en triplicata dans un même tube. Pour chaque mélange d'ADN, 6 μ l de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, Canada) ont été préincubés avec 150 μ l du milieu OptiMEM pendant 5 minutes à la température de la pièce. Suite à la préincubation, 150 μ l du mélange Lipofectamine 2000/OptiMEM ont été ajoutés à chaque tube d'ADN/OptiMEM et l'incubation a été poursuivie pendant 20 minutes à la température de la pièce. Le milieu de culture des cellules a été remplacé par 500 μ l de milieu OptiMEM, et 100 μ l du mélange ADN/Lipofectamine 2000/OptiMEM ont été ajoutés goutte à goutte dans chaque puit. Les cellules ont été incubées pendant 4 heures à 37 °C et le milieu OptiMEM a été remplacé par 500 μ l de milieu DMEM enrichi de 10 % FBS. Les cellules ont été incubées pendant 2 jours à 37 °C.

1.8.3 Lyse des cellules et essais luciférase

Après 48 heures, le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées dans 500 μ l de PBS 1X. Les essais luciférase ont été réalisés à l'aide du *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, Madison, USA). Les cellules ont été lysées dans 100 μ l de tampon de lyse passive 1X et agitées sur une plaque pendant 30 minutes. Les lysats de cellules ont été resuspendus 3 fois, transférés dans un microtube et centrifugés à 4 °C pendant 5 minutes à 16 000 g. Un volume de 20 μ l d'extraits protéiques a été utilisé pour la lecture, le reste a été conservé à -80 °C. L'activité luciférase a immédiatement été mesurée par l'utilisation du luminomètre *Microplate Luminometer ORION* (Berthold Detection Systems) selon le protocole suivant : première injection de 50 μ l du substrat pour la luciférase firefly (LAR II) suivi d'un délai de trois secondes ; la première mesure a été prise pendant 10 secondes suivi d'un délai de dix secondes. Il y a ensuite eu injection de 50 μ l du substrat pour la luciférase rénilla (tampon *Stop 'n' Glow*), délai de trois secondes puis la deuxième mesure a été prise pendant dix secondes.

1.9 Analyse par RT-PCR

1.9.1 Réaction de transcription inverse

La synthèse des ADNc a été faite à partir de 2 µg d'ARN en utilisant la trousse *First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* selon les recommandations du fournisseur (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Canada). La réaction de transcription inverse a été effectuée pendant une heure à 42 °C et l'enzyme fut inactivée 5 minutes à 95 °C.

1.9.2 Réaction de polymérisation en chaîne

Les séquences des amorces et les conditions d'amplification utilisées pour les réactions en chaîne de la polymérase (PCR) sont décrites au tableau 3. Les produits de PCR ont été analysés en déposant 10 µl de ces produits sur un gel d'agarose 1,5 % (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) additionné de bromure d'éthidium (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Canada) pour être migrés par électrophorèse dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA). La présence d'amplicons a été révélée sous illumination UV.

Tableau 3. Séquence des oligonucléotides utilisés pour l'analyse par RT-PCR.

Gène	Séquence 5'-3'	Température d'hybridation
<i>Gata4</i>	TCTCACTATGGGCACAGCAG (1 ^{er} brin) AAGAGTCCTGCTTGGAGCTG (2 ^e brin)	59 °C
<i>Pap1</i>	ACTGGGAGAGGAACCCATCT (1 ^{er} brin) ATTGCGACGCTAGGGCAAC (2 ^e brin)	59 °C
<i>TBP</i>	GGGGAGCTGTGATGTGAAGT (1 ^{er} brin) GGAGAACAATTCTGGGTTGA (2 ^e brin)	59 °C

1.10 Gel de rétention

1.10.1 Préparation des sondes radioactives

Les oligonucléotides complémentaires pour le site de liaison II du facteur *Gata4* sur le promoteur du gène *Pap1* et pour NF-κB ont d'abord été synthétisés (IDT, Coralville, USA) (Tableau 4). Les oligonucléotides (25 µg de chacun) ont été mélangés et

le volume a été complété à 50 µl avec de l'eau stérile. Les oligonucléotides ont été chauffés pendant 2 minutes à 75 °C et la réaction d'appariement a été effectuée en laissant descendre la température lentement jusqu'à la température de la pièce. Les oligonucléotides double brins ont été dilués à 100 ng/µl puis marqués radioactivement à leur extrémité 5' dans une réaction d'échange du groupement phosphate avec le [γ -³²P] dATP par la T4 polynucléotide kinase (SAMBROOK et RUSSELL, 2001). Les sondes ont été purifiées en utilisant les colonnes ProbeQuant™ G50 (Amersham Biosciences, Québec, Canada) selon le protocole du manufacturier.

Tableau 4. Séquence des oligonucléotides utilisés pour les gels de rétention.

Sonde	Séquence 5'-3'
Gata II	TGCTTTGAGATAGGCTGCTA (1 ^{er} brin) TAGCAGCCTATCTCAAAGCA (2 ^e brin)
NF-κB	AGTTGAGGGGACTTCCAGGC (1 ^{er} brin) GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT (2 ^e brin)

1.10.2 Réaction de liaison à l'ADN et gel de rétention

Les réactions de liaison à l'ADN ont été effectuées dans un volume total de 20 µl contenant 5 µg d'extraits de protéines nucléaires de cellules IEC-6/Cdx2 induites à la différenciation et stimulées aux LPS pour différentes périodes de temps, 4 µl de tampon de liaison 5X (1 M Tris-Cl pH 7,5, 1 M MgCl₂, 3 M KCl, 0,5 M EDTA et 1 M de DTT) et 2 µg de compétiteurs non spécifiques Poly[d(I-C)] (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Canada). Une quantité équivalente à 50 000 cpm de chaque sonde a été ajoutée aux réactions et elles ont été incubées pendant 20 minutes à la température de la pièce. Les mélanges réactionnels ont été déposés sur un gel 5 % acrylamide (4,8 g d'acrylamide, 0,128 g de bis-acrylamide, 9 ml de TBE 5X (0,04 M Tris-borate, 0,04 M acide borique, 0,5 M EDTA pH 8,0), 200 µl d'ammonium persulfate 10 %, 100 µl de TEMED et 80 ml d'eau distillée) préalablement équilibré pendant 15 minutes à 25 mA dans un tampon TBE 0,5X. Le gel a été migré pendant 2h à 25 mA à 4 °C puis il a été séché pendant 1h à 80 °C

avant d'être exposé dans une cassette d'exposition (*Kodak screen*) (Bio-Rad, Mississauga, Canada) O/N. L'écran a été révélé le lendemain à l'aide de l'appareil *Molecular Imager FX* (Bio-Rad, Mississauga, Canada).

1.11 Analyse de densitométrie

Les analyses densitométriques ont été réalisées à l'aide du logiciel ImageJ en Java (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

1.12 Statistiques

Tous les graphiques et les calculs de moyennes et d'écart moyen ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.03 pour Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Les résultats ont été ramenés en pourcentage d'induction par rapport au contrôle. Les tests de Student non pairé avec intervalles de confiance de 95 % ont également été effectués à l'aide de ce logiciel (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

2. Modèle de souris

2.1 Lignées de souris utilisées et croisements

Les différentes lignées de souris utilisées sont indiquées dans le tableau 5. Les souris expérimentales $Gata4^{fl/-} Cre^+$ ont été obtenues suite au croisement des trois lignées, par l'accouplement de souris $Gata4^{+/-} Cre^+$ avec des souris $Gata4^{fl/fl}$. Les souris utilisées comme contrôles étaient de génotype $Gata4^{fl/+}$.

Tableau 5. Lignées de souris utilisées.

Lignée	Race	Génotype	Source
<i>VillineCre</i>	C57BL/6	Cre^+	(MADISON <i>et al.</i> , 2002)
<i>Gata4 fl</i>	Hybride	$Gata4^{fl/+}$	(WATT <i>et al.</i> , 2004)
<i>Gata4 null</i>	Hybride	$Gata4^{+/-}$	(MOLKENTIN <i>et al.</i> , 1997)

2.2 Génotypage des souris

2.2.1 Extraction d'ADN génomique

Environ 7 jours après la naissance des souris, un orteil est coupé afin d'extraire l'ADN génomique et d'identifier chaque souris. Les orteils sont digérés à 57 °C avec la protéinase K (20 µl/ml) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) et l'ADN est ensuite extrait selon le protocole *Spin Doctor Genomic DNA Prep* établi par la compagnie Gerard Biotech (Oxford, OH).

2.2.2 Réaction de polymérisation en chaîne

Les séquences des amorces et les conditions d'amplification utilisées pour déterminer le génotypage des souris sont décrites au tableau 6. Les produits de PCR ont été analysés en déposant 10 µl sur un gel d'agarose 1,5 % (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) additionné de bromure d'éthidium (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Canada) et migrés par électrophorèse dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA). La présence d'amplicons a été révélée sous illumination UV.

Tableau 6. Séquences des oligonucléotides et conditions d'amplification utilisées pour le génotypage des souris.

Gène	Séquence 5'-3'	T °C hybridation	Nb de cycles	Produit (pb)
<i>Villine</i> <i>Cre</i>	GCGGCATGGTGCAAGTTGAAT (1 ^{er} brin) CGTTCACCGGCATCAACGTTT (2 ^e brin)	50 °C	36	252
<i>Gata4 fl</i>	CCCAGTAAAGAAGTCAGCACAAGGAAAC (1 ^{er} brin) AGACTATTGATCCCGGAGTGAACATT (2 ^e brin)	55 °C	40	355, wt 455, fl
<i>Gata4 null</i>	GGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATT (1 ^{er} brin) GTGAGACCTGCAGAATGGGAGTGGAGAATG (2 ^e brin)	55 °C	40	207

2.3 Sacrifice des souris

Toutes les souris ont été traitées selon un protocole approuvé par le Comité institutionnel sur l'expérimentation animale de l'Université de Sherbrooke. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale suite à une injection intramusculaire de 1 µl par gramme de poids corporel de chlorhydrate de kétamine (Bioniche, Belleville, ON). Les

prélèvements ont été effectués sur une plaque de verre froide pour ralentir la dégradation des tissus.

2.4 Fixation des tissus pour coupes histologiques

Les tissus sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4 % pendant une nuit à 4 °C. Ils sont ensuite lavés à l'éthanol 70 % et conservés à 4 °C dans l'éthanol jusqu'à leur circulation tel que décrit dans le tableau 7. Les tissus sont par la suite inclus dans des blocs de paraffine. Des coupes histologiques de 5 µm d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un microtome (American Optical Co. Spencer-820) et déposées sur des lames.

Tableau 7. Circulation des tissus.

Étapes	Solution	Durée
1	Éthanol 70 %	6 × 10 min
2	Éthanol 95 %	3 × 10 min
3	Éthanol 100 %	3 × 10 min et 3 × 20 min
4	Toluène	1 × 1h et 1 × 14-18h
5	Paraffine 75 °C	3 × 1h

2.5 Immunofluorescences sur coupes histologiques

La révélation des antigènes par immunofluorescence a été effectuée telle que décrite précédemment (DARSIGNY *et al.*, 2009). Les anticorps utilisés sont décrits dans le tableau 8.

Tableau 8. Liste des anticorps utilisés lors d'immunofluorescences.

Anticorps primaire	Fournisseur	Dilution	Temps d'incubation	Anticorps secondaire	Fournisseur	Dilution
Gata4 (C-20)	Santa Cruz, sc-1237	1:250	O/N à 4 °C	IgG Anti-chèvre marqué à la fluoresceine	Vector Laboratories, FI-5000	1:200
E-Cadhérine	BD Biosciences, 610182	1:2500	O/N à 4 °C	IgG Anti-souris marqué à la fluoresceine	Vector Laboratories, FI-2000	1:200

III - Résultats

1. Validation de l'expression protéique de Gata4 dans les cellules épithéliales intestinales de rat

L'expression de Gata4 ayant été bien caractérisée au niveau de l'intestin grêle chez la souris (ARCECI *et al.*, 1993; MOLKENTIN, 2000; BOUDREAU *et al.*, 2002; DUSING et WIGINTON, 2005; BOSSE *et al.*, 2006; BATTLE *et al.*, 2008) et au niveau des cellules IEC-6 (TURGEON *et al.*, 2008) et IEC-6/Cdx2 (LUSSIER *et al.*, 2008), le profil d'expression de Gata4 et Cdx2 durant la différenciation d'un modèle de coculture qui récapitule la différenciation épithéliale intestinale a brièvement été caractérisé. Pour ce faire, des extraits de protéines totales de cellules IEC-6/Cdx2 cocultivent avec des cellules mésenchymateuses durant 1, 3, 5 et 8 jours suivant l'ensemencement ont été utilisés pour effectuer une analyse par immunobuvardage. Cette expérience a permis de constater que Gata4 et Cdx2 sont présents en faible quantité dans les cellules IEC-6/Cdx2 non différenciées et que leur expression augmente progressivement dans le temps avec la différenciation des cellules épithéliales. L'expression de Gata4 augmente radicalement 3 jours après l'ensemencement tandis que Cdx2 semble augmenter plus fortement 5 jours après l'ensemencement (Figure 9).

2. Effet synergique de Gata4 et Cdx2 sur le promoteur de *Pap1*

Afin de vérifier l'effet transcriptionnel que pouvait avoir Gata4 sur *Pap1*, des essais luciférase avec le promoteur *Pap1* ont été effectués dans les cellules Caco-2/15. Dans ce modèle, les essais ont démontré que Gata4 seul n'était pas capable de transactiver le promoteur de *Pap1*, même lorsque 400 ng de pBabe/Gata4 étaient cotransfectés. Cependant, l'ajout de seulement 5 ng du vecteur pcDNA/Cdx2, quoique inefficace lorsque transfecté seul, était suffisant pour augmenter l'activité transcriptionnelle d'environ 10 fois lorsque combiné à Gata4. La cotransfection de 5 ng de pcDNA/Cdx2 avec 400 ng de pBabe/Gata4 augmente donc significativement le potentiel

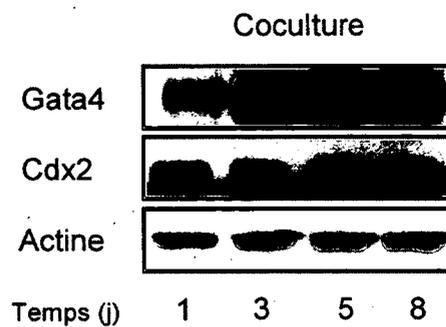


Figure 9. Expression de Gata4 et Cdx2 au cours de la différenciation des cellules épithéliales intestinales en coculture.

Un immunobuvardage a été effectué sur des lysats de protéines totales de cellules IEC-6/Cdx2 cultivées en présence de cellules mésenchymateuses humaines. Des anticorps spécifiques pour Gata4 et Cdx2 ont été utilisés. L'actine a été visualisée afin d'assurer la constance des quantités de protéines migrées. Le résultat montré est représentatif de deux expériences indépendantes (j = jours).

transcriptionnel du promoteur de *Pap1* (Figure 10). Les expériences subséquentes ont été réalisées dans ces conditions.

3. Identification de deux sites du promoteur de *Pap1* essentiels à son activation par *Gata4* et *Cdx2*

Afin de poursuivre la caractérisation de la région promotrice de 1253 pb de *Pap1* (DUSETTI *et al.*, 1993) entamée par une ancienne étudiante du laboratoire (BROUILLARD, 2008), quatre mutants de ce promoteur ont été générés par réactions de mutagenèse dirigée (Figure 11A). L'activité transcriptionnelle de ces mutants a été comparée à celle du promoteur *Pap1* de type sauvage afin d'identifier des sites potentiellement importants à l'action synergique de *Gata4* et *Cdx2* (Figure 11B). La mutation du site Gata VI ne change pas l'activité transcriptionnelle induite par *Gata4* et *Cdx2*. Cependant, la mutation du site Gata VIII, le plus proximal du site d'initiation de la transcription, diminue significativement l'effet synergique d'un facteur de 7 fois. Un résultat similaire est observé lorsque le site *Cdx2* est muté, avec une réduction de l'activité transcriptionnelle de 6 fois. La mutation de ces deux derniers sites abolit presque complètement l'effet synergique de *Gata4* et *Cdx2* sur le promoteur. Le site Gata VIII et le site *Cdx2* du promoteur *Pap1* sont donc tous deux essentiels à son activation par *Gata4* et *Cdx2*.

4. La suppression du domaine en doigt de Zn N-terminal de *Gata4* augmente la transactivation de *Pap1*

Dans le but de vérifier l'effet que pouvait entraîner la perte des domaines en doigt de Zn de la protéine *Gata4* sur l'activité transcriptionnelle de *Pap1*, les mutants de la protéine *Gata4* $\Delta 216-240$ et $\Delta 270-294$, gracieusement offerts par le laboratoire du Pr. Claude Asselin (RÉMILLARD, 2009), ont été utilisés pour mesurer leur potentiel d'activation de *Pap1* en essais luciférase. Dans les cellules Caco-2/15, la cotransfection de *Gata4* $\Delta 216-240$ seul était suffisante pour augmenter l'activité transcriptionnelle de *Pap1* d'un ratio de près de 2 fois et ce, de façon significative, contrairement à *Gata4* non muté dans tous les essais effectués (Figure 12A). En présence de *Cdx2*, les deux mutants de la

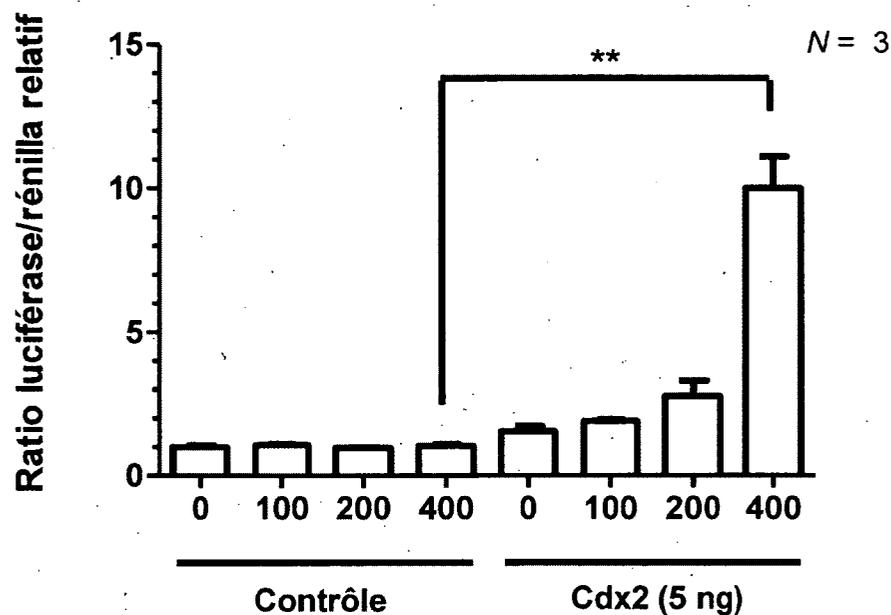
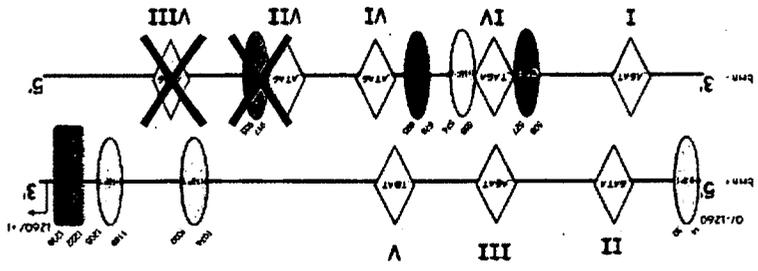
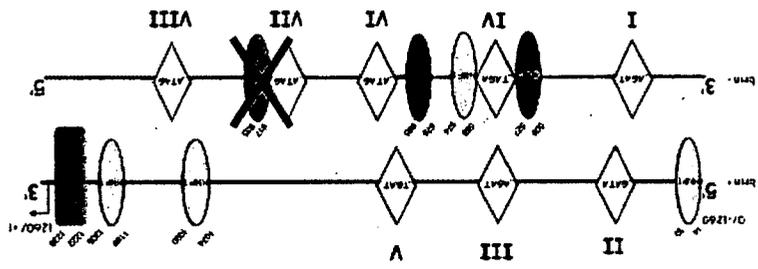


Figure 10. Effet de Gata4 sur le promoteur *Pap1* en présence ou absence de Cdx2.

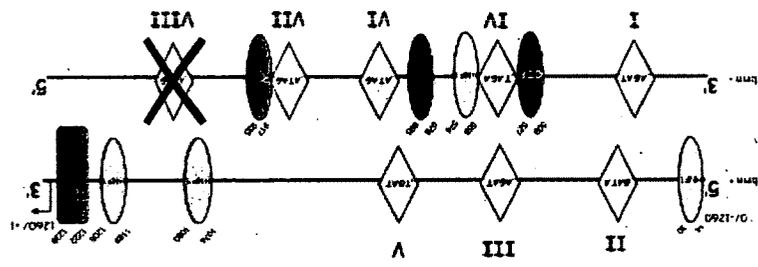
A) Les cellules Caco-2/15 ont été cotransfectées à la Lipofectamine 2000 avec 200 ng du vecteur *Pap1*-luciférase rapporteur, 2 ng de phRL-CMV Renilla et différentes combinaisons de pBabe/GATA4 (100, 200 et 400 ng) et pcDNA/Cdx2 (5 ng). Le vecteur pcDNA3.1 a été utilisé comme vecteur vide afin de calibrer les différentes quantités de vecteurs d'expression utilisés dans chaque condition. Les résultats obtenus en triplicata ont été reportés comme des ratios (moyenne et écart moyen) de variation par rapport aux transfections avec le vecteur luciférase rapporteur seul (**P < 0,01).



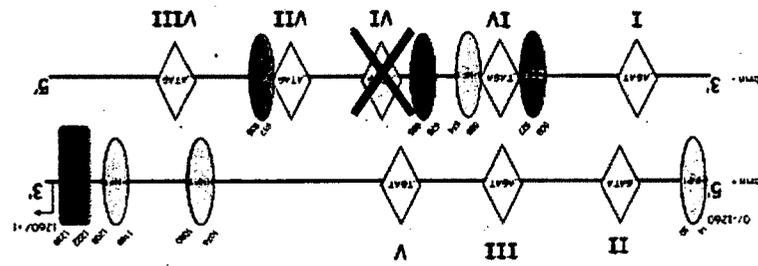
5



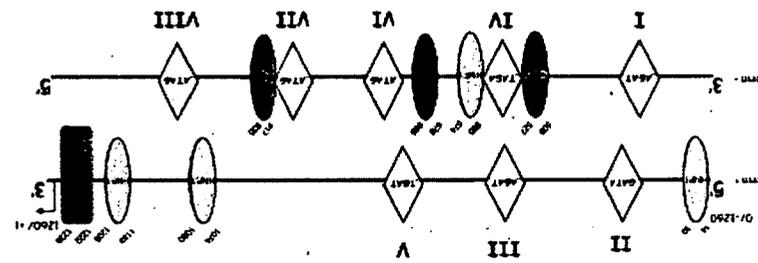
4



3



2



1

A

B

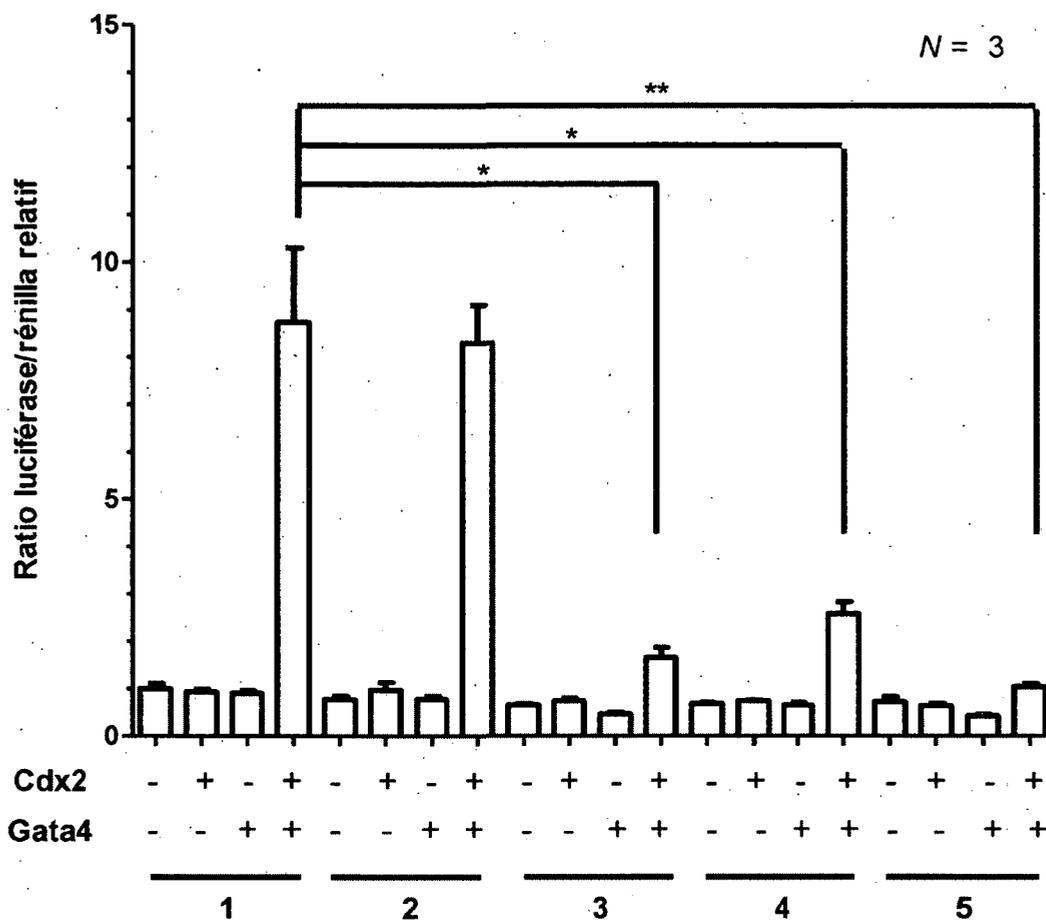


Figure 11. Effet de Gata4 et Cdx2 sur la transcription du promoteur *Pap1* muté.

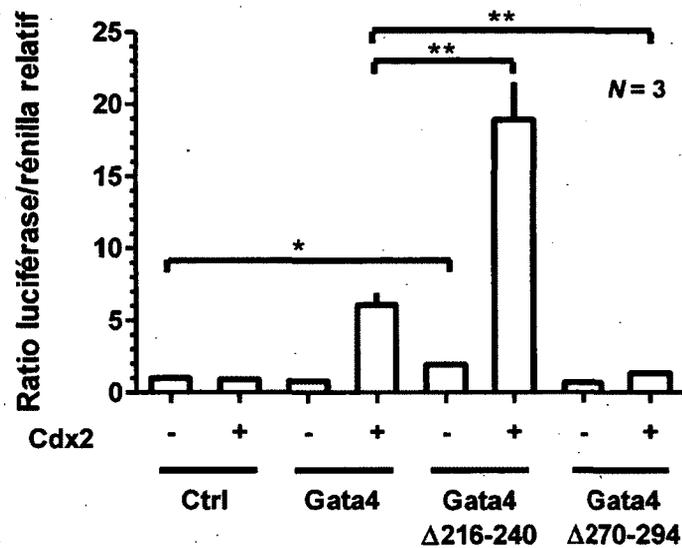
A) Des réactions de mutagenèse dirigée ont permis de synthétiser les vecteur *Pap1*-luciférase rapporteur mutés pour les sites Gata VI, VIII, Cdx2 ou Gata VIII et Cdx2 à partir du promoteur non muté. B) Les cellules Caco-2/15 ont été cotransfectées à la Lipofectamine 2000 avec 200 ng du vecteur *Pap1*-luciférase rapporteur non muté (1) ou muté pour le site Gata VI (2), VIII (3), Cdx2 (4) ou Gata VIII et Cdx2 (5), 2 ng de pRL-CMV Renilla et la combinaison pBabe/Gata4 (400 ng) et pcDNA/Cdx2 (5 ng). Le vecteur pcDNA3.1 a été utilisé comme vecteur vide afin de calibrer les différentes quantités de vecteurs d'expression utilisés dans chaque condition. Les résultats obtenus en triplicata ont été reportés comme des ratios (moyenne et écart moyen) de variation par rapport aux transfections avec le vecteur luciférase rapporteur seul et sont représentatifs de trois expériences indépendantes (*P < 0,05 ; **P < 0,01).

protéine ont démontré des effets opposés. Lorsque Gata4 Δ 216-240 est cotransfecté avec Cdx2, il augmente radicalement l'effet synergique produit entre Gata4 non muté et Cdx2 d'un facteur de plus de 18 fois, tandis que la cotransfection de Gata4 Δ 270-294 abolit complètement cette synergie.

Les cellules NIH 3T3 déficientes pour l'expression de Gata4 ont été utilisées afin de vérifier que les transfections de pBabe/Gata4, pBabe/Gata4 Δ 216-240 et pBabe/Gata4 Δ 270-294 amenaient la production des protéines désirées. Un immunobuvardage de type Western a donc été effectué sur des lysats de protéines totales de cellules NIH 3T3 ayant été transfectées avec 400 ng de vecteur pBabePuro vide, Gata4, Gata4 Δ 216-240 et Gata4 Δ 270-294 afin de confirmer la production des protéines (Figure 12B). On constate que la suppression de 25 acides aminés dans les mutants Gata4 Δ 216-240 et Gata4 Δ 270-294 diminue le poids moléculaire de la protéine Gata4 d'environ 3 kDa, tel que prévu.

L'effet de la perte des domaines en doigt de Zn de la protéine Gata4 sur l'activité transcriptionnelle de *Pap1* a également été mesuré dans les cellules NIH 3T3 afin de vérifier la reproductibilité des résultats observés dans un contexte non intestinal (Figure 13). Des résultats similaires à ceux des cellules Caco-2/15 ont été observés. Tout comme dans les cellules Caco-2/15, Gata4 et Cdx2 produisent un effet synergique et Gata4 Δ 216-240 seul est suffisant pour augmenter l'activité transcriptionnelle de *Pap1* d'un ratio significatif de plus de 3 fois, contrairement à Gata4 non muté. Également, la cotransfection de Gata4 Δ 216-240 avec Cdx2 augmente radicalement l'effet synergique produit entre Gata4 non muté et Cdx2 d'un facteur de 14 fois. Cependant, la cotransfection de Gata4 Δ 270-294 n'abolit pas cette synergie, qui conserve relativement la même amplitude, mais augmente plutôt l'activité transcriptionnelle lorsque comparé à Cdx2 seul. Également, Cdx2 seul entraîne une augmentation de la transcription du promoteur de *Pap1* de 4 fois dans les cellules NIH 3T3. Une augmentation significative de l'activité transcriptionnelle de l'ordre de 7 fois est tout de même observée par l'ajout de Gata4 à Cdx2.

A



B

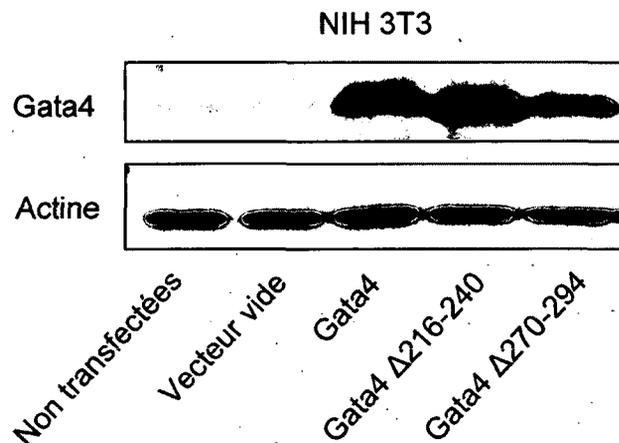


Figure 12. Effet de la protéine Gata4 mutée sur la transcription du promoteur *Pap1* dans les cellules Caco-2/15.

A) Les cellules Caco-2/15 ont été cotransfectées à la Lipofectamine 2000 avec 200 ng du vecteur *Pap1*-luciférase rapporteur, 2 ng de phRL-CMV Renilla et différentes combinaisons de pBabe/Gata4 muté pour l'un ou l'autre des domaines en doigt de Zn (400 ng) et pcDNA/Cdx2 (5 ng). Le vecteur pcDNA3.1 a été utilisé comme vecteur vide afin de calibrer les différentes quantités de vecteurs d'expression utilisés dans chaque condition. Les résultats obtenus en triplicata ont été reportés comme des ratios (moyenne et écart moyen) de variation par rapport aux transfections avec le vecteur luciférase rapporteur seul et sont représentatifs de trois expériences indépendantes (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). B) Un immunobuvardage a été effectué sur des lysats de protéines totales des cellules NIH 3T3 cotransfectées avec 400 ng du vecteur vide pBabePuro, Gata4 de type sauvage ou muté pour l'un ou l'autre des doigts de Zn afin de confirmer la production des protéines mutées.

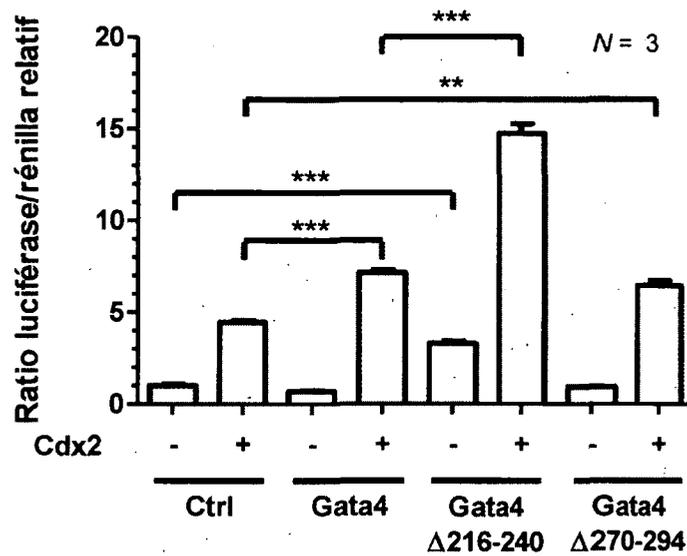


Figure 13. Effet de la protéine Gata4 mutée sur la transcription du promoteur *Pap1* dans les cellules NIH 3T3.

Les cellules NIH 3T3 ont été cotransfectées à la Lipofectamine 2000 avec 200 ng du vecteur *Pap1*-luciférase rapporteur, 2 ng de phRL-CMV Renilla et différentes combinaisons de pBabe/Gata4 muté pour l'un ou l'autre des domaines en doigt de Zn (400 ng) et pcDNA/Cdx2 (5 ng). Le vecteur pcDNA3.1 a été utilisé comme vecteur vide afin de calibrer les différentes quantités de vecteurs d'expression utilisés dans chaque condition. Les résultats obtenus en triplicata ont été reportés comme des ratios (moyenne et écart moyen) de variation par rapport aux transfections avec le vecteur luciférase rapporteur seul et sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**P < 0,01 ; ***P < 0,001).

Finalement, l'effet de la perte de chacun des domaines en doigt de Zn de la protéine Gata4 a été mesuré sur l'expression endogène de *Pap1*. Une analyse par RT-PCR sur des extraits d'ARN de lignées cellulaires IEC-6/Cdx2 surexprimant Gata4, Gata4 Δ 216-240 et Gata4 Δ 270-294 a été réalisée pour les gènes *Gata4*, *Pap1* et *TBP*, utilisé comme gène de référence afin de mesurer le niveau d'ARNm de départ (Figure 14). Le résultat préliminaire obtenu montre que *Pap1* est induit seulement dans la lignée surexprimant Gata4 Δ 216-240.

Puisqu'il est connu que le domaine en doigt de Zn en N-terminal de Gata4 peut interagir avec les protéines de la famille des corépresseurs Fog, il semblait intéressant de tester l'effet que pouvait avoir le corépresseur Fog1 sur l'activité transcriptionnelle de *Pap1* (Figure 15). L'ajout de Fog1 abolit l'effet synergique entre Gata4 et Cdx2. Cependant, l'ajout de Fog1 à Gata4 Δ 216-240 et Cdx2 n'entraîne pas de diminution significative de l'activité transcriptionnelle de *Pap1*. Aucune différence n'est observée lorsque Fog1 est ajouté à Gata4 Δ 270-294 et Cdx2, qui ne présente pas de synergie dans les cellules Caco-2/15.

5. La protéine Gata4 subit des modifications post-traductionnelles dans un contexte de stress inflammatoire

Afin de mesurer l'expression de Gata4 dans un contexte inflammatoire, un immunobuvardage a été réalisé sur des extraits de protéines nucléaires de cellules IEC-6/Cdx2 induites à la différenciation et stimulées aux LPS pour différentes périodes de temps. L'expression de la protéine totale Gata4 semble relativement stable, quoiqu'elle semble légèrement modulée à la baisse après 8 h d'induction aux LPS (Figure 16A). Une analyse densitométrique réalisée sur trois immunobuvardages différents réalisés sur des extraits de protéines nucléaires issues de cinétiques inflammatoires différentes montre cette tendance, quoiqu'elle ne soit pas significative (Figure 16B). Cependant, l'anticorps spécifique à la forme Gata4 phosphorylée sur la sérine 105 révèle une modulation plus importante de cette forme. Le niveau de Gata4 P-S105 semble d'abord diminué après 2 heures d'induction aux LPS mais l'expression de la protéine augmente à nouveau à partir

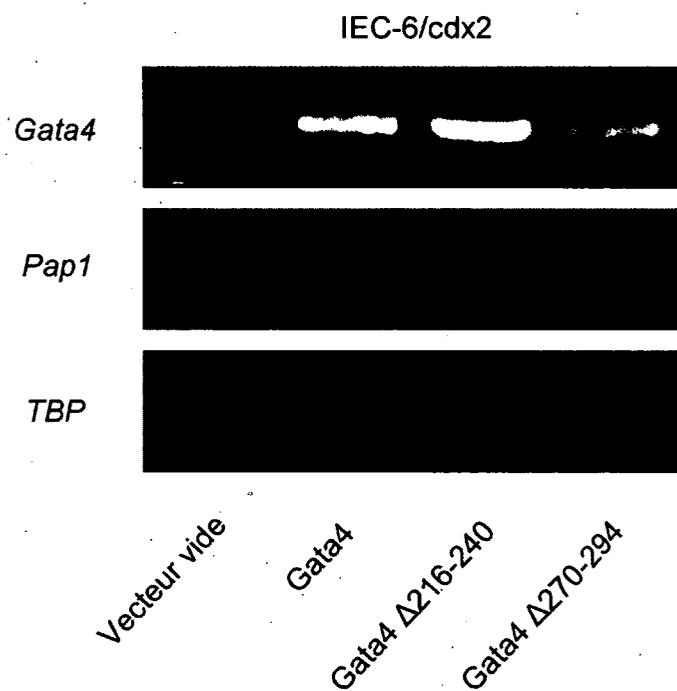


Figure 14. Effet de la perte d'un domaine en doigt de Zn de la protéine Gata4 sur l'expression endogène de *Pap1* dans les cellules IEC/Cdx2.

Une analyse de l'expression de *Pap1* a été réalisée par RT-PCR semi-quantitatif sur les cellules IEC-6/Cdx2 infectées avec des rétrovirus exprimant le vecteur pBabePuro vide, Gata4, Gata4 Δ 216-240 et Gata4 Δ 270-294. Le gène *TBP* a été utilisé comme gène de référence afin de mesurer le niveau d'ARNm de départ.

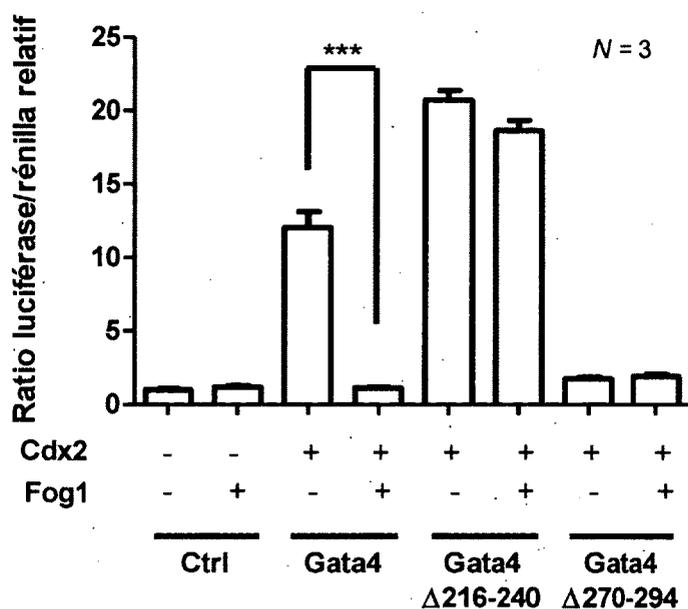
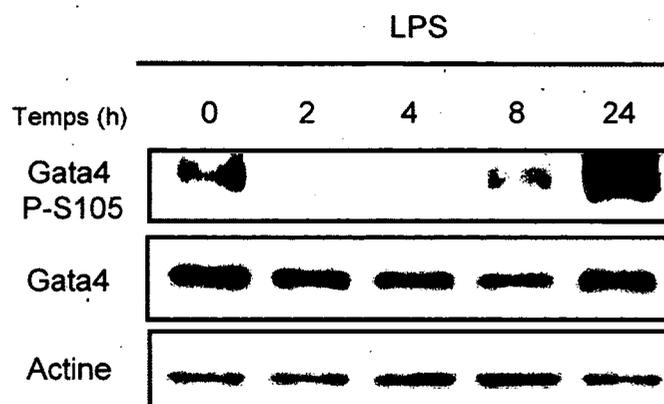


Figure 15. Effet du corépresseur Fog1 sur la transcription du promoteur de *Pap1* induite par Gata4 et Cdx2.

Les cellules Caco-2/15 ont été cotransfectées à la Lipofectamine 2000 avec 200 ng du vecteur *Pap1*-luciférase rapporteur, 2 ng de phRL-CMV Renilla et différentes combinaisons de pBabe/Gata4 muté pour l'un ou l'autre des domaines en doigt de Zn (400 ng), pcDNA/Cdx2 (5 ng) et Fog1 (200 ng). Le vecteur pcDNA3.1 a été utilisé comme vecteur vide afin de calibrer les différentes quantités de vecteurs d'expression utilisés dans chaque condition. Les résultats obtenus en triplicata ont été reportés comme des ratios (moyenne et écart moyen) de variation par rapport aux transfections avec le vecteur luciférase rapporteur seul et sont représentatifs de trois expériences indépendantes (***) ($P < 0,001$).

A



B

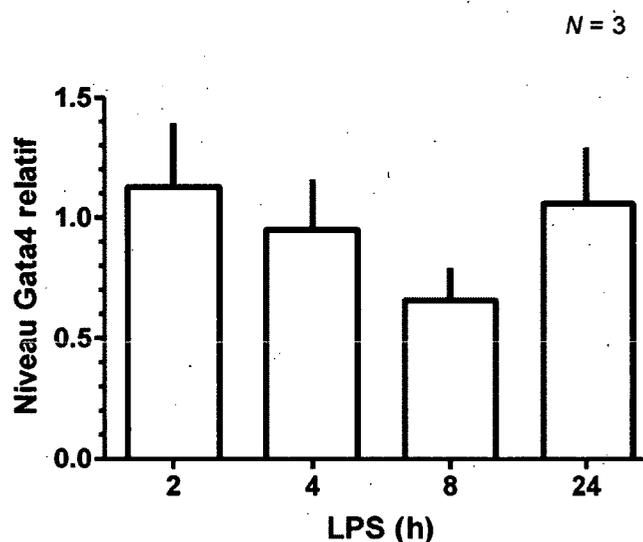


Figure 16. Expression de Gata4 phosphorylée et Gata4 totale selon la période de stimulation aux LPS dans les cellules IEC-6/Cdx2.

Un immunobuvardage a été effectué sur des lysats de protéines nucléaires de IEC-6/Cdx2 différenciées et stimulées aux LPS à concentration finale de 5 $\mu\text{g/ml}$ pendant différentes périodes de temps avec un anticorps spécifique pour la protéine Gata4 phosphorylée sur la sérine 105 et un anticorps dirigé contre la protéine Gata4 totale (A). L'actine a été visualisée afin d'assurer la constance des quantités de protéines migrées. Une analyse densitométrique avec le logiciel ImageJ réalisée sur trois immunobuvardages différents permet d'illustrer la quantité relative de protéine Gata4 selon la période d'exposition aux LPS. Une analyse statistique a été effectuée et ne montre pas de différence significative entre les quantités relatives de protéine Gata4 (B).

de 4 heures d'induction aux LPS et continue d'augmenter pour atteindre un pic maximal d'expression après 24h.

La capacité de Gata4 de lier l'ADN dans un contexte inflammatoire a également été mesurée. Une analyse par gel de rétention a d'abord été effectuée avec une sonde pour NF- κ B afin de confirmer que la cinétique inflammatoire induisait bel et bien une réponse inflammatoire cellulaire. On observe que le complexe NF- κ B est plus intense 2h après une exposition aux LPS et qu'il diminue ensuite aux temps 4, 6, 8 et 24 heures (Figure 17A), une réponse qui s'apparente à celle observée dans le cas d'inductions au TNF α et à l'IL-1 β (BOUDREAU, 1997). Un profil similaire est également observé pour la liaison de Gata4 au promoteur de *Pap1*, soit une augmentation de l'affinité de Gata4 pour la sonde du site Gata II du promoteur à 2h et un retour plutôt au niveau basal pour les temps d'induction plus longs (Figure 17B). Cette expérience ayant été répétée trois fois, elle nous a permis de conclure que Gata4 lie l'ADN de façon différentielle suite à une stimulation aux LPS.

6. L'invalidation de Gata4 pourrait avoir un rôle sur l'étanchéité des jonctions adhérentes chez la souris

Afin d'explorer le rôle de Gata4 dans son contexte physiologique, les souris *Gata4 null* et *Gata4 fl* ont été croisées afin de produire des souris *Gata4^{fl}-Cre⁺*, soit des souris n'exprimant pas Gata4 au niveau de l'épithélium intestinal (BATTLE *et al.*, 2008). Le génotype des souris a été déterminé à partir de leur ADN génomique, extrait d'un échantillon d'orteil récolté 7 jours après leur naissance. La présence de séquences loxP de part et d'autre des exons 3 à 5 du gène *Gata4* forment l'allèle *Gata4 fl* (WATT *et al.*, 2004). Le génotypage par PCR de ces souris présente un fragment de 455 pb tandis que l'allèle de type sauvage présente un fragment de 355 pb. Le remplacement des domaines en doigt de Zn de Gata4 par le gène de résistance à la néomycine forme l'allèle *Gata4 null* (MOLKENTIN *et al.*, 1997). La présence de cet allèle donne un fragment de 207 pb suite au génotypage par PCR. La présence de l'allèle de la Cre recombinase, la topoisomérase de type I responsable de la recombinaison des sites loxP, sous le contrôle du promoteur de

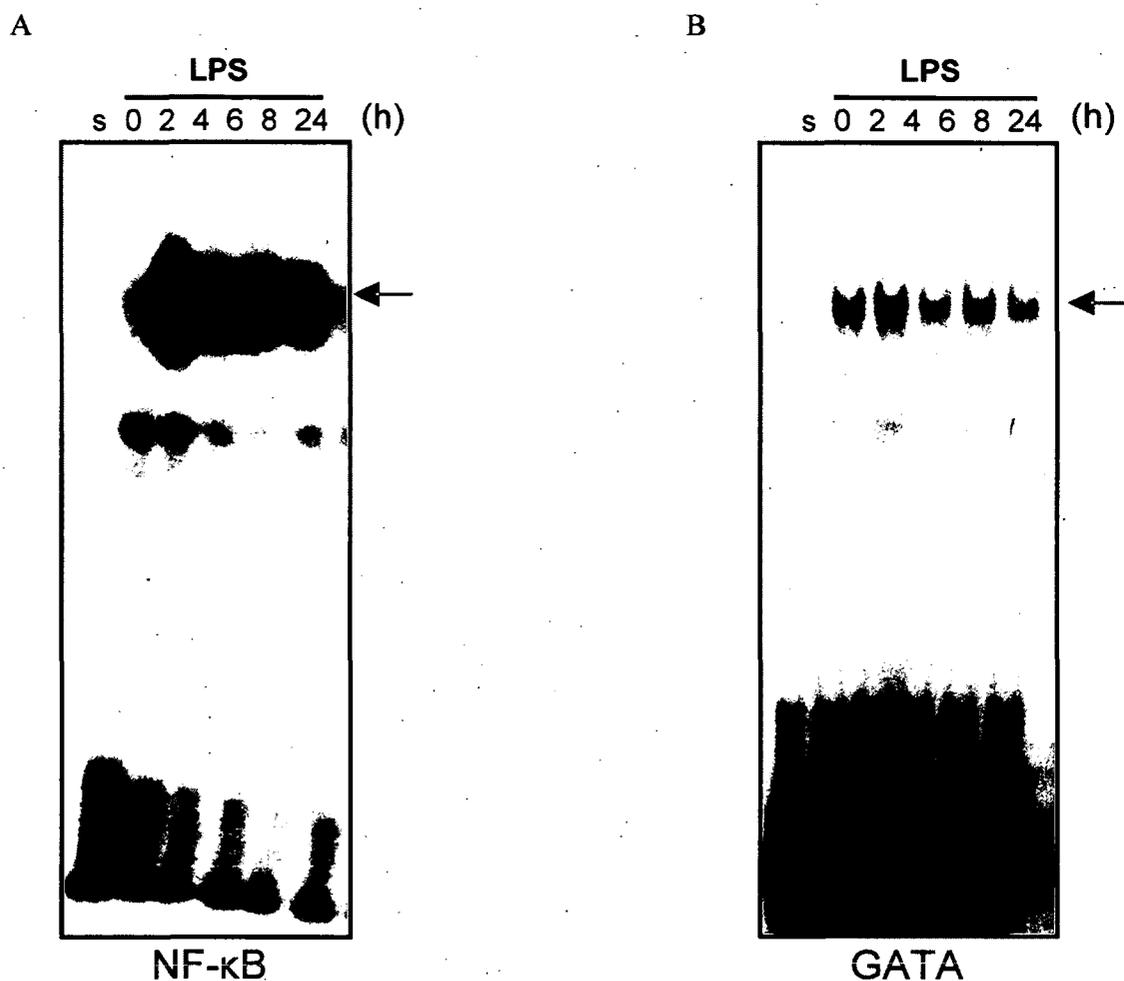


Figure 17. Interaction d'extraits nucléaires de cellules IEC-6/Cdx2 stimulées aux LPS avec un site NF-κB et un site Gata du promoteur *Pap1*.

Des oligonucléotides pour NF-κB (A) et le site Gata II du promoteur de *Pap1* (B) marqués au ^{32}P ont été utilisés pour analyse par gel de rétention. Chaque réaction de liaison a été effectuée avec 5 μg d'extraits nucléaires de cellules IEC-6/Cdx2 différenciées stimulées avec du LPS à concentration finale de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pendant 0, 2, 4, 6, 8 et 24 heures et migrée sur le gel de polyacrylamide avec la sonde libre (s) comme contrôle. Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

la Villine, une protéine du cytosquelette exprimée seulement dans l'épithélium intestinal, donne un fragment de 252 pb suite au PCR de géotypage (Figure 18).

La perte de Gata4 au niveau de l'épithélium du jéjunum des souris mutantes a d'abord été vérifiée par immunofluorescence afin de s'assurer de la validité du modèle. Les souris contrôles (*Gata4^{fl/+}*) présente un marquage nucléaire dans les cellules épithéliales intestinales tout le long de l'axe crypte-villosité, à l'exception du bas de la crypte (Figure 19). On constate la disparition totale du marquage Gata4 dans les souris mutantes (*Gata4^{fl/+} Cre⁺*) au niveau des noyaux des cellules épithéliales intestinales, confirmant l'efficacité du modèle. Un léger marquage non spécifique demeure entre les villosités intestinales.

L'expression de la E-Cadhérine a été évaluée par immunofluorescence au niveau du jéjunum des souris mutantes par rapport aux souris contrôles afin d'entamer la caractérisation du rôle de Gata4 sur l'étanchéité des jonctions cellulaires. On constate que les souris contrôles expriment la E-Cadhérine du côté latéral de toutes les cellules épithéliales (Figure 20), tel qu'attendu (GROSCHWITZ et HOGAN, 2009). Les souris mutantes expriment toutefois moins intensément la E-Cadhérine au niveau de ces cellules, quoique sa localisation semble demeurer du côté latéral des cellules de l'épithélium.

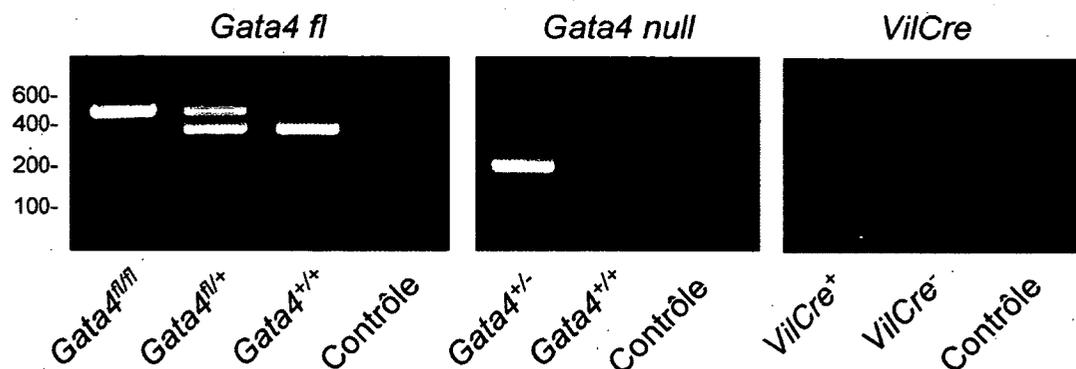


Figure 18. Génotypage des souris Gata4.

Le génotype de chaque souris a été déterminé par PCR sur des extraits d'ADN génomique. Chaque souris a été génotypée pour l'allèle *Gata4 fl*, l'allèle *Gata4 null* et la *Villine Cre*. La présence de l'allèle fl donne un fragment de 455 pb tandis que l'allèle de type sauvage présente un fragment de 355 pb. La présence de l'allèle *Gata4 null* donne un fragment de 207 pb et celle de la *Villine Cre* un fragment de 252 pb. Un PCR sans ADN migré avec les échantillons de souris est utilisé comme contrôle négatif.

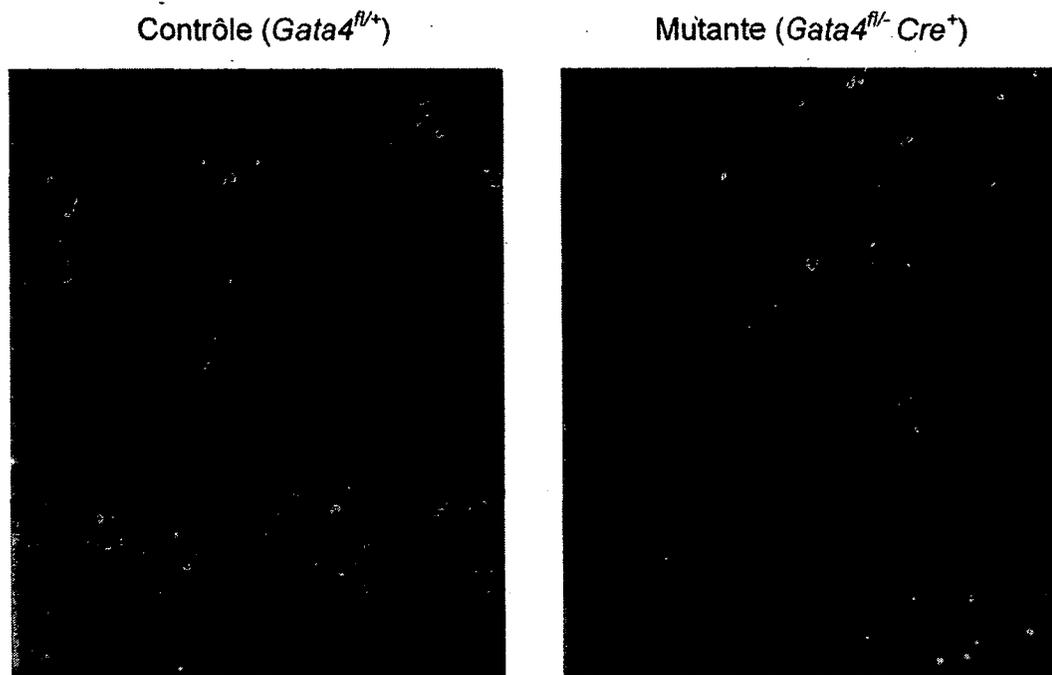
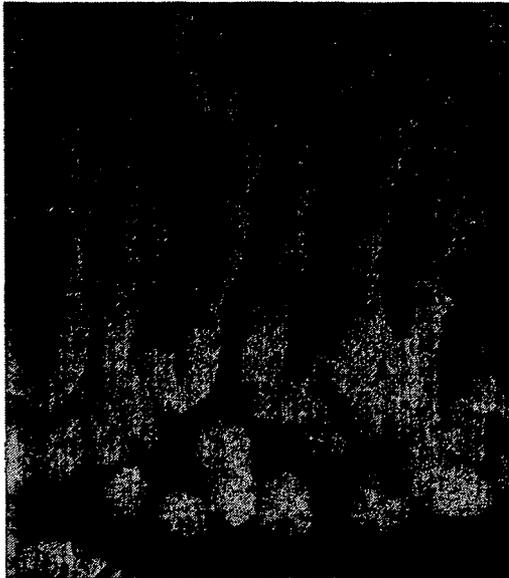


Figure 19. Validation de la perte de Gata4 dans l'épithélium des souris mutantes.

Un immunofluorescence indirecte avec un anticorps spécifique pour Gata4 permet d'observer un marquage nucléaire des cellules épithéliales intestinales dans des coupes de jéjunum distal de souris contrôles tandis que ce marquage est absent chez les souris mutantes. Le résultat montré est représentatif de deux expériences indépendantes.

Contrôle (*Gata4^{fl/+}*)Mutante (*Gata4^{fl/-} Cre⁺*)

N = 3

Figure 20. Expression de la E-Cadhérine dans l'épithélium des souris mutantes.

Un immunofluorescence indirecte avec un anticorps spécifique pour la E-Cadhérine permet d'observer une légère diminution de la protéine E-Cadhérine dans les cellules épithéliales intestinales de jéjunum distal des souris mutantes par rapport aux contrôles. Le résultat montré est représentatif de trois expériences indépendantes.

IV - Discussion

L'hypothèse de départ de ce projet de recherche stipulait que le facteur de transcription Gata4, de par son action potentielle sur *Pap1*, est impliqué dans la réponse inflammatoire des cellules épithéliales intestinales. Depuis sa découverte en 1993, Gata4 a été reconnu pour jouer des rôles importants au niveau de l'intestin grêle. Son implication dans la régulation transcriptionnelle de gènes intestinaux a été démontrée dans le cadre de plusieurs études tant *in vitro* qu'*in vivo* (BOUDREAU *et al.*, 2002; ESCAFFIT *et al.*, 2005; BOSSE *et al.*, 2006; BATTLE *et al.*, 2008; BEULING *et al.*, 2008). Des études antérieures menées dans notre laboratoire ont suggéré que *Pap1* pourrait être une cible transcriptionnelle de Gata4 dans l'intestin, une première évidence de l'implication de ce facteur dans l'inflammation (BROUILLARD, 2008). Plus récemment, deux études sont venues appuyer ce concept et ont rapporté une implication de Gata4 dans la réponse inflammatoire intestinale (TURGEON *et al.*, 2008; HAVERI *et al.*, 2009).

1. La coopération entre Gata4 et Cdx2 est essentielle à l'activation transcriptionnelle de *Pap1* au niveau intestinal

Notre laboratoire a développé un modèle de coculture où les cellules IEC/Cdx2 sontensemencées sur des cellules mésenchymateuses provenant d'iléons de fœtus humains entre 17 et 20 semaines d'âge. Suite à l'ensemencement, il a été montré que les cellules vont se polariser et entamer un processus de différenciation (LUSSIER *et al.*, 2008). Nous avons mesuré l'expression de Gata4 et Cdx2 durant la différenciation de ce modèle afin de confirmer leur expression concomitante dans les cellules IEC-6/Cdx2 différenciées. Cette expérience a permis de constater que l'expression des deux facteurs de transcription d'intérêt augmente effectivement avec la différenciation du modèle épithélial (Figure 9) et vient confirmer des résultats obtenus précédemment dans le laboratoire (LUSSIER *et al.*, 2008). Le modèle de coculture représente un bon modèle *in vitro* et permet de mieux comprendre l'expression de ces facteurs lors de la différenciation intestinale.

Afin de répondre à notre premier objectif, qui était de caractériser l'activité transcriptionnelle de Gata4 sur le promoteur de *Pap1*, nous avons utilisé des essais transcriptionnels avec gène rapporteur de la luciférase. Une région promotrice de 1253 pb adjacente au site d'initiation de la transcription de *Pap1* a été clonée en amont du gène rapporteur de la luciférase afin de mesurer l'activité transcriptionnelle de cette région. Notre choix de modèle s'est arrêté sur la lignée Caco-2/15 parce que ce sont des cellules d'origine intestinale faciles à cultiver et qu'elles ont démontrées avoir un bon taux de transfection transitoire par des liposomes dans notre laboratoire. Afin d'établir nos conditions expérimentales, les cellules Caco-2/15 ont été transfectées avec des quantités croissantes du vecteur d'expression de la protéine Gata4. Même lorsque 400 ng du vecteur d'expression pBabe/Gata4 était cotransfecté, les essais ont démontré que Gata4 seul n'était pas capable de transactiver le promoteur de *Pap1* (Figure 10). Même si *Pap1* avait été montré comme une cible de Gata4 (BROUILLARD, 2008), ce résultat était peu surprenant. Des résultats semblables ont été obtenus précédemment lorsque Gata4 seul avait été transfecté dans les cellules Caco-2; aucun effet n'avait été observé sur les promoteurs de la sucrase-isomaltase et de la phospholipase A intestinale (BOUDREAU *et al.*, 2002).

Puisqu'un phénomène de coopération avait été observé entre Gata4, Cdx2 et HNF-1 α dans de telles expériences (BOUDREAU *et al.*, 2002) et que Cdx1, un facteur de transcription à homéodomaine très similaire à Cdx2, avait montré une induction de l'expression génique de *PAP* humain en interagissant directement sur son promoteur (MOUCADEL *et al.*, 2001), nous avons voulu vérifier quel effet aurait l'ajout de seulement 5 ng du vecteur d'expression de Cdx2. Lorsque transfecté seul, Cdx2 ne présente pas une augmentation significative de l'activité transcriptionnelle de *Pap1* dans les cellules Caco-2/15. Cependant, sa cotransfection avec 400 ng de pBabe/Gata4 augmente de l'ordre d'environ 10 fois le potentiel transcriptionnel du promoteur de *Pap1* (Figure 10). Cette coopération entre Gata4 et Cdx2 est essentielle à l'activation transcriptionnelle de *Pap1* au niveau intestinal et l'effet synergique observé est très similaire à celui observé dans le cas d'autres promoteurs de gènes intestinaux

(BOUDREAU *et al.*, 2002). Plusieurs exemples de coopération entre Gata4 et d'autres facteurs de transcription ont été rapportés dans la littérature. Au niveau cardiaque, il est bien connu que Gata4 coopère avec Gata6, Fog2, RXR α , p300, et plusieurs autres grâce à son domaine en doigt de Zn en N-terminal (PIKKARAINEN *et al.*, 2004). Ces interactions entre facteurs de transcription sont non seulement essentielles à la fonction de Gata4, mais également aux autres facteurs Gata ainsi que d'autres familles de facteurs de transcription. Plusieurs facteurs sont requis afin d'ouvrir l'hélice d'ADN et influencer le processus de transcription (BRESNICK *et al.*, 2005).

Nous nous sommes alors intéressés aux sites potentiels où pouvaient se lier les facteurs Gata4 et Cdx2 sur le promoteur *Pap1*. Trois sites Gata différents ainsi que le site unique Cdx2 du promoteur *Pap1* prédit par bio-informatique ont été mutés (Figure 11A). Suite à l'obtention des promoteurs mutants, leur activité transcriptionnelle a été comparée à celle du promoteur de type sauvage. En utilisant les concentrations de vecteurs d'expression de Gata4 et Cdx2 trouvés pour provoquer un effet synergique sur la transcription de *Pap1*, il a été trouvé que le site Gata VIII et le site Cdx2 du promoteur *Pap1* sont tous deux essentiels à son activation par Gata4 et Cdx2. En effet, lorsque le site Cdx2 est muté, Cdx2 ne peut médier son action et l'effet synergique entre Gata4 et Cdx2 n'est pas observé, de même si nous mutons le site Gata le plus proximal du site d'initiation de la transcription ou les deux sites en même temps, ce qui crée une abolition quasi totale de la transcription (Figure 11B). Tel qu'attendu, l'effet de Gata4 passerait par sa liaison au site Gata le plus proximal du site d'initiation de la transcription. Le site unique Cdx2 est également situé dans la même région, soit près du site de recrutement des facteurs de transcription généraux. De façon générale, la plus grande majorité des cis-régulateurs agissent dans la région promotrice proximale. Selon nos résultats, ce seraient également le cas de l'effet synergique entre Gata4 et Cdx2 sur *Pap1*. Nos observations vont dans le même sens qu'une étude similaire réalisée avec le promoteur de *Pap1* dans les cellules pancréatiques AR-42J montrant une diminution de l'activité de seulement 30 % lorsque la région promotrice est réduite au premier tiers proximal et passe de -1253 pb à -444 pb (DUSSETTI *et al.*, 1995). Cette perte de synergie en présence des promoteurs mutés pour les sites Gata VIII et/ou Cdx2 montre la spécificité de l'effet synergique

observé dans nos expériences et démontre qu'*in vitro*, Gata4 et Cdx2 activent bel et bien le promoteur proximal de *Pap1*. Le mécanisme général proposé sur l'effet de Gata4 sur le promoteur de *Pap1* est présenté à la figure 21.

2. Le potentiel répresseur de Gata4 sur le promoteur de *Pap1* et l'importance des cofacteurs Fog dans ce phénomène

Il est connu que le motif en doigt de Zn en N-terminal de Gata4 lui permet de stabiliser sa liaison à l'ADN en interagissant avec des cofacteurs, tandis que le motif en doigt de Zn en C-terminal lui permet surtout de lier la séquence WGATAR (PIKKARAINEN *et al.*, 2004). Nous avons vérifié la nécessité de chacun de ces domaines dans le contexte d'activation de la transcription de *Pap1* par analyse de suppression de domaines. Grâce à une collaboration avec le laboratoire du Pr. Claude Asselin, un mutant de chacun de ces deux domaines très importants de Gata4 ont pu être utilisés pour mesurer leur potentiel d'activation de *Pap1* en essais luciférase. Dans les cellules Caco-2/15, nous avons d'abord observé que la transfection de Gata4 muté pour le doigt de Zn en N-terminal était à elle seule suffisante pour induire la transcription de *Pap1*. L'ajout de Cdx2 aux essais a permis de démontrer que les deux mutants avaient des effets opposés. En effet, l'ajout de Cdx2 à la transfection de Gata4 Δ 216-240 crée un effet synergique encore plus fort qu'avec la protéine Gata4 de type sauvage, tandis que la cotransfection de Cdx2 avec Gata4 Δ 270-294 abolit cette synergie (Figure 12A).

Étonnés par l'écart entre l'effet obtenu avec le mutant du doigt de Zn en N-terminal et le mutant du doigt de Zn en C-terminal, nous avons voulu confirmer ces résultats dans une autre lignée cellulaire. Notre choix s'est arrêté sur la lignée NIH 3T3. D'origine fibroblastique, les cellules NIH.3T3 n'expriment aucun des facteurs impliqués dans l'expérience et ont l'avantage d'avoir un excellent taux de transfection par des liposomes. Tous les vecteurs d'expression de Gata4 ont été transfectés dans cette lignée afin de confirmer qu'ils amenaient la production des protéines désirées (Figure 12B). Tel qu'attendu, malgré la suppression de 25 acides aminés dans les mutants, les protéines présentaient un poids moléculaire légèrement inférieur à celui de la protéine Gata4 mais étaient tout de même produites. L'effet de la perte des domaines en doigt de Zn de la

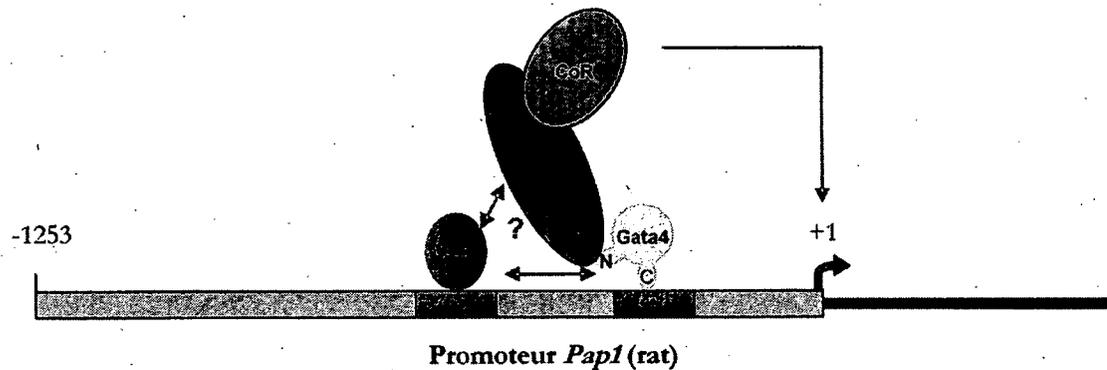


Figure 21. Mécanisme général proposé sur la régulation de *Pap1* par Gata4.

Au niveau intestinal, Gata4 peut interagir sur le site Gata le plus proximal du site d'initiation de la transcription du promoteur *Pap1* de rat via son domaine en doigt de Zn C-terminal. Cdx2 peut interagir avec le site Cdx2 du promoteur *Pap1*, il se produit alors un effet synergique entre Gata4 et Cdx2 sur l'activité transcriptionnelle de *Pap1*. Le cofacteur Fog1 peut cependant interagir avec le domaine en doigt de Zn N-terminal de la protéine Gata4 et recruter un complexe de corépression qui va réprimer la transcription de *Pap1*. Nous ne connaissons pas actuellement s'il existe une interaction entre Fog1 et Cdx2.

protéine Gata4 a ensuite été mesuré sur l'activité transcriptionnelle de *Pap1* dans cette lignée et des résultats similaires à ceux obtenus dans les cellules Caco-2/15 ont été observés. Gata4 Δ 216-240 seul s'est révélé suffisant pour augmenter l'activité transcriptionnelle de *Pap1* de façon significative et la cotransfection de Gata4 Δ 216-240 avec Cdx2 augmente également de façon drastique l'effet synergique (Figure 13). Les résultats obtenus ne permettent cependant pas de déterminer quels sites Gata sont responsables de cette augmentation de la transcription.

De façon générale, Gata4 Δ 216-240 augmente radicalement la transcription de *Pap1* dans les deux lignées cellulaires. Cependant, quelques différences ont été observées entre les résultats obtenus dans les deux lignées. Notamment, dans les cellules NIH 3T3, Cdx2 seul augmente de 4 fois l'activation du promoteur *Pap1*. Également, la cotransfection de Gata4 Δ 270-294 n'a pas diminué l'effet de Gata4 et Cdx2. Ces différences sont probablement attribuables au niveau initial de Cdx2 dans les deux modèles. En effet, le facteur de transcription Cdx2 étant spécifique à l'intestin (JAMES *et al.*, 1994), on le retrouve en quantité variable selon l'état de différenciation dans les cellules Caco-2/15 (HOUDE *et al.*, 2001), tandis qu'il est absent des cellules NIH 3T3. Cela expliquerait pourquoi la transfection de seulement 5 ng du vecteur d'expression de Cdx2 peut induire une telle augmentation de la transcription dans les NIH 3T3, et que cet effet n'est pas retrouvé dans la lignée Caco-2/15. Néanmoins, la suppression du domaine en doigt de Zn en N-terminal provoque un effet drastique dans les deux modèles, confirmant la véracité du phénomène observé.

Ces résultats ont montré que la suppression du domaine en doigt de Zn en N-terminal de Gata4 entraînait une levée de la répression de *Pap1*. Nous avons voulu mesurer cette levée de répression en mesurant l'expression endogène de *Pap1* dans les cellules IEC-6/Cdx2 n'ayant pas été induites à produire Cdx2 via l'ajout d'IPTG, mais exprimant de façon stable les différentes protéines Gata4 à notre disposition. Les résultats préliminaires obtenus ont été dans le sens prédit. L'analyse de *Pap1* dans les lignées cellulaires IEC-6/Cdx2 non différenciées surexprimant Gata4, Gata4 Δ 216-240 et Gata4 Δ 270-294 montre que le gène est exprimé en quantité non détectable dans les cellules IEC-6/Cdx2 surexprimant le vecteur vide, Gata4, et Gata4 Δ 270-294 mais qu'il serait

induit seulement dans la lignée surexprimant Gata4 Δ 216-240 (Figure 14). Jusqu'à présent, cette expérience a été réalisée qu'une seule fois mais les travaux visant à reproduire les résultats obtenus sont en cours dans le laboratoire. Ce résultat va dans le même sens que ceux montrés précédemment avec les mutants de la protéine Gata4. Avec l'analyse de Gata4, nous avons montré que les surexpressions des protéines Gata4 ont bel et bien fonctionné dans les trois lignées. *Pap1* serait donc faiblement exprimé de base dans les cellules épithéliales intestinales en présence de Gata4 seul, ce qui ne permettrait pas sa détection par analyse de RT-PCR semi-quantitatif. Cette observation est possiblement attribuable à la présence du cofacteur Fog1 en grande quantité dans cette lignée cellulaire intestinale. Cependant, la suppression du domaine d'interaction de Gata4 avec ces cofacteurs entraîne une augmentation de l'expression endogène de *Pap1*. La surexpression de ce mutant permet possiblement le déplacement de la protéine Gata4 endogène. L'utilisation des mutants de la protéine Gata4 nous a permis de mieux comprendre son mécanisme d'action sur le promoteur de *Pap1*. La mutation du doigt de Zn en C-terminal de Gata4 l'empêche de lier l'ADN et ainsi, la coopération n'étant plus possible, l'effet synergique n'est pas observé. Cependant, la mutation du doigt de Zn en N-terminal de Gata4 ne l'empêche pas de lier l'ADN et augmente même radicalement l'activité transcriptionnelle de *Pap1*.

Suite à cette observation, nous nous sommes interrogés à savoir quel cofacteur de Gata4 pouvait être responsable de cette levée de la répression. Au niveau cardiaque, le principal cofacteur reconnu pour interagir avec le domaine en doigt de Zn en N-terminal de Gata4 est Fog2 (LU *et al.*, 1999; SVENSSON *et al.*, 1999; TEVOSIAN *et al.*, 1999; SVENSSON *et al.*, 2000). Les cofacteurs Fog1 et Fog2 sont tous deux des corépresseurs bien connus pour interagir avec les facteurs Gata et la simple mutation V217G dans le domaine en doigt de Zn en N-terminal est suffisante pour empêcher l'interaction de Fog2 dans le cœur (CRISPINO *et al.*, 2001). Puisqu'au niveau intestinal, il semble que ce soit surtout *Fog1* qui soit exprimé, il nous a donc semblé pertinent de tester l'effet de Fog1 sur l'activité transcriptionnelle de *Pap1*. En ajoutant le cofacteur Fog1 à nos essais, nous avons montré qu'il ne pouvait pas agir sur la protéine Gata4 mutée pour le doigt de zinc en N-terminal et ainsi que l'effet synergique était toujours observé (Figure 15).

Cependant, lorsque Fog1 a été ajouté en présence de Cdx2 et de Gata4 non muté, il y avait répression transcriptionnelle de *Pap1*. L'interaction de Fog1 sur Gata4 s'effectue donc via le domaine en doigt de Zn en N-terminal. Nous ne pouvons présentement décrire le mécanisme exact de cette répression, ni dire s'il y a une possible interaction entre Cdx2 et Fog1, mais Fog1 réprime de façon certaine l'activité Gata4-dépendante sur le promoteur de *Pap1*.

À la vue des résultats obtenus sur le promoteur *Pap1* ainsi que dans le cadre d'autres études parues récemment, il semble que l'association entre les facteurs Gata et Fog soit beaucoup plus importante dans le contrôle des régions promotrices que l'on pourrait le croire. En effet, les cofacteurs Fog peuvent agir tant comme amplificateurs ou répresseurs de l'activité transcriptionnelle des facteurs Gata (ROBERT *et al.*, 2002). Dans le cas qui nous intéresse, le complexe Gata4 :Fog1 réprimerait la transcription du gène *Pap1* au niveau intestinal. Cependant, selon le facteur Gata impliqué et le contexte physiologique, la formation de tels complexes Gata :Fog peut activer ou réprimer la transcription des gènes cibles, ce qui en fait une plaque tournante de régulation importante capable de s'ajuster rapidement à l'environnement cellulaire (BRESNICK *et al.*, 2005). La transition d'un facteur Gata à un autre facteur Gata ainsi que l'association ou non à un cofacteur Fog permettrait un ajustement minutieux de la transcription dans plusieurs types de cellules différentes. Ainsi, l'association de Gata4 à Fog1, de même que le passage de la formation du complexe Gata4 :Fog1 à un complexe Gata5 :Fog1 ou Gata6 :Fog1, pourraient être des mécanismes de régulation du gène *Pap1* dans l'intestin. Il ne serait pas étonnant que de futures études révèlent d'autres implications majeures des complexes Gata :Fog dans plusieurs tissus.

3. Le rôle de Gata4 dans la réponse des cellules épithéliales intestinales à un stress inflammatoire

La découverte du gène *Pap1* comme cible potentielle de Gata4 chez le rat (BROUILLARD, 2008) a été notre première évidence de l'implication possible de Gata4 dans la réponse inflammatoire des cellules épithéliales intestinales. En effet, *Pap1* est un médiateur inflammatoire important chez plusieurs espèces et la protéine PAP humaine est

reconnue pour être augmentée chez des patients atteints de maladies inflammatoires intestinales (CARROCCIO *et al.*, 1997; MOTOO *et al.*, 1998; MOTOO *et al.*, 1999; OGAWA *et al.*, 2003; GIRONELLA *et al.*, 2005; CLOSA *et al.*, 2007; CAO *et al.*, 2009). Cependant, sa régulation par Gata4 au niveau intestinal a été un nouveau concept introduit par notre laboratoire. Nous avons donc voulu vérifier quel serait l'impact d'un stress inflammatoire sur Gata4 *in vitro*. Pour ce faire, nous avons utilisé des inductions aux LPS. En effet, les LPS sont les composants immunostimulateurs des bactéries les mieux connues pour induire une inflammation systémique. Les LPS sont des composants structuraux de la membrane externe des bactéries Gram négatives et sont formés de trois parties : un lipide A, un oligosaccharide charpente, et des chaînes latérales d'antigène O (LU *et al.*, 2008). Ils déclenchent une réaction inflammatoire rapide d'intensité proportionnelle à leur dose.

Suite à un stress inflammatoire, nous avons observé à plusieurs reprises que la protéine Gata4 totale semble relativement stable, quoiqu'elle présente une légère modulation à la baisse non significative après 8h d'induction aux LPS. Suite à la mise au point de l'immunobuvardage avec l'anticorps Gata4 P-S105, un premier résultat nous montre que Gata4 P-S105 est d'abord diminué après quelques heures d'induction aux LPS et augmente par la suite pour atteindre un pic après 24h (Figure 16). Les travaux se poursuivent dans le laboratoire afin de reproduire cet essai mais les résultats obtenus avec l'anticorps contre la protéine Gata4 totale sont en accord avec la littérature scientifique sur le sujet qui démontre que les niveaux demeurent inchangés dans plusieurs contextes différents modifiant son affinité pour l'ADN (MORIMOTO *et al.*, 2000; HAUTALA *et al.*, 2001; LIANG *et al.*, 2001; LIANG *et al.*, 2001; TREMBLAY et VIGER, 2003; TREMBLAY et VIGER, 2003). Un stress inflammatoire influencerait plutôt le niveau de phosphorylation de la sérine 105, possiblement via la voie des MAPK, afin de moduler l'activité de liaison à l'ADN de la protéine Gata4. Cette possibilité demeure à vérifier, mais l'induction d'un stress inflammatoire pourrait entraîner des modifications post-traductionnelles de Gata4.

Puisque certaines modifications post-traductionnelles de Gata4 influencent sa capacité de liaison à l'ADN, nous avons mesuré sa capacité à lier le promoteur *Pap1* dans un contexte inflammatoire. Une analyse par gel de rétention a montré une augmentation de l'affinité de Gata4 pour la sonde du site Gata II du promoteur à 2h et un retour au niveau basal pour les temps d'induction de 4h à 24h (Figure 17). Nous avons donc confirmé que Gata4 lie l'ADN de façon différentielle suite à une stimulation aux LPS. Tel que discuté précédemment, la phosphorylation de la sérine 105 augmente l'activité de liaison à l'ADN de la protéine Gata4 (LIANG *et al.*, 2001). Cependant, la cinétique de phosphorylation sur la sérine 105 présente une induction inverse à celle de l'affinité de Gata4 pour le promoteur *Pap1*. Dans ce cas précis, il semble donc improbable qu'il y ait un lien direct entre les deux phénomènes observés. La modulation de l'affinité de Gata4 pour le promoteur de *Pap1* passerait ne serait donc pas causée par cette modification post-traductionnelle mais possible par une phosphorylation ailleurs sur la protéine ou par un autre mécanisme.

Un profil similaire à celui de Gata4 est également observé pour la liaison de NF- κ B en contexte inflammatoire. À ce jour, il n'y a pas d'étude publiée démontrant une relation directe entre Gata4 et NF- κ B. Cependant, des travaux réalisés dans le laboratoire du Pr. Claude Asselin présentent une première évidence que Gata4 pourrait augmenter la liaison à l'ADN de NF- κ B en induisant p50 et p65 pour former des complexes de hauts poids moléculaires dans les cellules IEC-6 en condition inflammatoire (RÉMILLARD, 2009). Le mécanisme général pourrait donc être qu'un stress inflammatoire cellulaire module, via la voie NF- κ B ou la voie des MAPK, l'affinité de Gata4 pour *Pap1*. Il est également possible qu'un stress inflammatoire influence la formation du complexe Gata :Fog, ce qui modulerait la transcription de *Pap1* de façon différentielle et ainsi la réponse inflammatoire cellulaire. Des expériences supplémentaires sont requises pour vérifier cette hypothèse, mais il semble de plus en plus plausible que l'inflammation puisse influencer les complexes Gata :Fog via la voie des MAPK.

Une récente étude a montré qu'un traitement au TNF- α , une cytokine proinflammatoire, est capable d'inverser le ratio GATA1/GATA2 normalement retrouvé

pendant la formation des cellules sanguines, en plus de moduler à la baisse l'expression de FOG1 ainsi qu'un autre cofacteur, le facteur de transcription érythroïde 2 (BUCK *et al.*, 2008). L'étude a démontré que c'est via la voie des MAPK que TNF- α produirait ces effets sur les facteurs Gata et Fog, et éventuellement, sur l'anémie (BUCK *et al.*, 2008). En faisant un parallèle entre cette étude et la nôtre, il serait possible qu'un stress inflammatoire module également les ratios de facteurs Gata ainsi que la formation de complexes Gata:Fog tel que Gata4:Fog1 au niveau intestinal, modulant ainsi la transcription de *Pap1* et éventuellement, permettant une meilleure réponse inflammatoire cellulaire.

4. L'étanchéité des jonctions cellulaires dans le modèle murin *Gata4^{fl/-} Cre⁺*

Afin d'explorer le rôle de Gata4 dans son contexte physiologique, des souris *Gata4^{fl/-} Cre⁺* ont été produites (Figure 18). Ces souris n'exprimant pas Gata4 au niveau de l'épithélium intestinal nous ont été fournies par le laboratoire du Pr. Stephen A. Duncan (Medical College of Wisconsin, Wisconsin, États-Unis), qui a partiellement caractérisé le modèle (BATTLE *et al.*, 2008). Les auteurs ont notamment observé que les souris mutantes étaient plus légères, que la morphologie de leurs cryptes était affectée et que leur jéjunum montrait une forte diminution de sa capacité d'absorber le cholestérol et les gras alimentaires. L'équipe a démontré que Gata4 jouait un rôle important dans le maintien des identités jéjunum-iléon, mais n'a pas investigué le rôle possible de Gata4 dans l'inflammation dans ce modèle.

La perte de Gata4 au niveau de l'épithélium du jéjunum des souris mutantes a été confirmée afin de s'assurer de la validité du modèle. Avec la technique d'immunofluorescence, nous avons constaté la disparition totale du marquage Gata4 au niveau des noyaux des cellules épithéliales intestinales dans les souris mutantes (Figure 19). Tel que discuté précédemment, cette couche simple de cellules épithéliales constitue la plus grande barrière protectrice contre l'environnement extérieur. Puisque ce sont surtout les interactions Cadhérines-Caténines qui sont responsables de la polarisation des cellules (GROSCWITZ et HOGAN, 2009) et ainsi de l'étanchéité de la barrière intestinale, nous avons d'abord voulu investiguer si la protéine E-Cadhérine, largement

retrouvée dans les jonctions adhérentes, pouvait être affectée par la perte de Gata4. Un premier résultat avec ce modèle *in vivo* nous a permis de constater que les souris mutantes expriment moins intensément la E-Cadhérine que les souris contrôles, quoique sa localisation demeure du côté latéral des cellules de l'épithélium. Ce résultat est le premier obtenu dans la caractérisation du rôle de Gata4 sur l'étanchéité des jonctions cellulaires. Plusieurs autres molécules demeurent à analyser afin de mieux comprendre si Gata4 peut moduler l'inflammation intestinale à ce niveau ou via d'autres mécanismes.

CONCLUSION

La présente étude a permis d'approfondir nos connaissances sur l'implication du facteur de transcription Gata4 dans la réponse inflammatoire des cellules épithéliales intestinales. Nous avons démontré que *Pap1* est une cible transcriptionnelle de Gata4 dans les cellules épithéliales intestinales. La caractérisation de l'activité transcriptionnelle de Gata4 sur *Pap1* a permis de déterminer que Gata4 et Cdx2 sont des régulateurs transcriptionnels intestinaux importants du gène encodant la protéine sécrétoire de type lectine Pap1. Nous avons également démontré que les sites proximaux de Gata et Cdx2 sont nécessaires à l'effet synergique positif sur l'activité transcriptionnelle de *Pap1* et que la délétion du domaine en doigt de Zn en N-terminal de Gata4 augmente radicalement l'activité transcriptionnelle et l'expression endogène de *Pap1*. Nous pensons que ce phénomène est causé par une interaction avec les cofacteurs Fog puisque nous avons montré que Fog1 réprime l'activité Gata4-dépendante sur le promoteur *Pap1*.

Nos résultats en condition de stress inflammatoire dans les cellules épithéliales intestinales ont montré que le niveau de la protéine Gata4 totale n'était pas affecté de façon significative, mais que sa phosphorylation sur le résidu sérine 105 pourrait être modulée. Nous avons également déterminé qu'un stress inflammatoire modifie la liaison de Gata4 sur le promoteur de *Pap1*. Nous n'avons cependant pas réussi à déterminer tous les mécanismes de régulation moléculaire de Gata4 escomptés dans un contexte de stress inflammatoire. Est-ce que Gata4 pourrait être un régulateur majeur de l'homéostasie inflammatoire intestinale?

Finalement, avec le modèle de souris mutantes pour Gata4, nous n'avons pas eu le temps de mesurer l'effet de la modulation de Gata4 sur l'inflammation intestinale. Les souris mutantes semblent présenter une légère diminution de la protéine des jonctions adhérentes E-Cadhérine, mais d'autres expériences devront être conduites afin de répondre pleinement à cet objectif.

PERSPECTIVES

Plusieurs avenues intéressantes peuvent être envisagées pour poursuivre ce projet. Les trois sous-objectifs fixés peuvent être explorés davantage afin de mieux répondre aux questions entourant le mécanisme des phénomènes observés dans le cadre de cette étude. Afin de compléter la caractérisation de l'activité transcriptionnelle de *Gata4* sur *Pap1*, nous pourrions réaliser des essais transcriptionnels supplémentaires afin de déterminer quels sites Gata sont impliqués dans l'effet causé par les mutants des protéines Gata4. Il serait aussi intéressant d'effectuer une immunoprécipitation de la chromatine afin de confirmer la liaison de *Gata4* à *Pap1* dans un contexte physiologique. Il serait également pertinent d'investiguer la contribution des cofacteurs Fog dans l'effet de *Gata4* observé, notamment en mesurant l'expression des Fog dans plusieurs lignées intestinales et en inhibant *Fog1* par le mécanisme d'interférence à l'ARN (shRNA) dans nos modèles cellulaires.

Afin d'approfondir nos connaissances sur l'implication de *Gata4* dans la signalisation inflammatoire, il serait intéressant d'effectuer des expériences supplémentaires dans des cellules épithéliales intestinales induites aux LPS et d'utiliser différents inhibiteurs de la voie des MAPK afin de déterminer les seconds messagers impliqués. Cependant, la caractérisation du modèle de souris *Gata4^{fl/fl} Cre⁺* est probablement l'avenue la plus excitante de ce projet. Ayant généré plusieurs souris mutantes, il serait pertinent de compléter l'investigation du rôle de *Gata4* dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale en effectuant plusieurs analyses d'immunofluorescences pour différentes protéines des jonctions cellulaires telles que les Claudines, l'Occludine, ZO-1, etc., mais également pour les autres facteurs Gata intestinaux, soit *Gata5* et *Gata6*, sachant que des mécanismes de compensation sont possibles au niveau intestinal. Il serait également intéressant de mesurer la conduction transépithéliale chez ces souris mutantes. Ce modèle murin permettra assurément de répondre à plusieurs questions concernant ce nouveau rôle de *Gata4* dans la réponse inflammatoire intestinale.

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce mémoire fut une occasion merveilleuse pour moi d'apprendre à surmonter des obstacles. Plusieurs personnes m'ont aidée à me surpasser au cours des deux dernières années. Je pense particulièrement au professeur François Boudreau, mon directeur de recherche, dont les conseils judicieux m'ont aidée à voir plus loin. Merci François de m'avoir accueillie dans ton laboratoire et de m'avoir transmis une partie de tes connaissances avec autant de passion. Merci d'être un patron dévoué et compétent, mais avant tout un homme admirable, compréhensif et humain. Ton sourire et ton positivisme sont contagieux et ont su m'encourager à chaque pas, petit ou grand. Tu es pour moi un modèle exemplaire de réussite et d'accomplissement.

Merci à toute l'équipe du Département d'anatomie et biologie cellulaire pour la qualité de la formation offerte. J'aimerais remercier les professeurs Fernand-Pierre Gendron et Xavier Roucou qui ont accepté de donner de leur précieux temps pour la révision et la correction de ce mémoire, ainsi que les Fonds de la recherche en santé du Québec pour leur soutien financier tout au long de ma maîtrise.

J'aimerais remercier chaudement mes parents, Normand et Carmen Bruneau, pour leur soutien constant tout au long de mes études. Merci de croire en moi depuis toujours, avec amour. Votre implication et vos encouragements m'ont toujours donné l'espoir d'aller de l'avant. Vous m'avez donné des ailes, pour toujours voler plus haut et plus loin, le plus beau cadeau qui soit.

Je suis également très reconnaissante envers Guillaume Desnoyers pour son aide et son apport quotidien à la réalisation de mes études. Ta présence et ton écoute ont été des éléments-clés de ma réussite. Merci pour toutes les découvertes enrichissantes partagées ensemble au cours de ces années.

RÉFÉRENCES

- Aiello, L., Guilfoyle, R., Huebner, K. et Weinmann, R.** 1979. Adenovirus 5 DNA sequences present and RNA sequences transcribed in transformed human embryo kidney cells (HEK-Ad-5 or 293). *Virology*, **94**(2), 460-469.
- Arceci, R. J., King, A. A., Simon, M. C., Orkin, S. H. et Wilson, D. B.** 1993. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol*, **13**(4), 2235-2246.
- Battle, M. A., Bondow, B. J., Iverson, M. A., Adams, S. J., Jandacek, R. J., Tso, P. et Duncan, S. A.** 2008. GATA4 is essential for jejunal function in mice. *Gastroenterology*, **135**(5), 1676-1686 e1671.
- Beaulieu, J. F. et Quaroni, A.** 1991. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem J*, **280** (Pt 3), 599-608.
- Beck, F., Chawengsaksophak, K., Waring, P., Playford, R. J. et Furness, J. B.** 1999. Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(13), 7318-7323.
- Benoit, Y. D., Pare, F., Francoeur, C., Jean, D., Tremblay, E., Boudreau, F., Escaffit, F. et Beaulieu, J. F.** 2010. Cooperation between HNF-1alpha, Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **298**(4), G504-517.
- Beuling, E., Bosse, T., van de Kerk, D. J., Piaseckyj, C. M., Fujiwara, Y., Katz, S. G., Orkin, S. H., Grand, R. J. et Krasinski, S. D.** 2008. GATA4 mediates gene repression in the mature mouse small intestine through interactions with friend of GATA (FOG) cofactors. *Dev Biol*, **322**(1), 179-189.
- Bosse, T., Piaseckyj, C. M., Burghard, E., Fialkovich, J. J., Rajagopal, S., Pu, W. T. et Krasinski, S. D.** 2006. Gata4 is essential for the maintenance of jejunal-ileal identities in the adult mouse small intestine. *Mol Cell Biol*, **26**(23), 9060-9070.
- Boudreau, F.** *Implication des facteurs de transcription C/EBP α , C/EBP β et C/EBP δ dans le contrôle de la prolifération et de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales intestinales de rat.* Thèse, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, 1997, 141 pages.
- 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. et Traber, P. G.** 2002. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *J Biol Chem*, **277**(35), 31909-31917.

Boulanger, J., Vezina, A., Mongrain, S., Boudreau, F., Perreault, N., Auclair, B. A., Laine, J., Asselin, C. et Rivard, N. 2005. Cdk2-dependent phosphorylation of homeobox transcription factor CDX2 regulates its nuclear translocation and proteasome-mediated degradation in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*, **280**(18), 18095-18107.

Brandl, K., Plitas, G., Schnabl, B., DeMatteo, R. P. et Pamer, E. G. 2007. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med*, **204**(8), 1891-1900.

Bresnick, E. H., Martowicz, M. L., Pal, S. et Johnson, K. D. 2005. Developmental control via GATA factor interplay at chromatin domains. *J Cell Physiol*, **205**(1), 1-9.

Brouillard, G. *Rôle du facteur de transcription GATA4 dans l'épithélium intestinal et identification d'une nouvelle cible, le gène PAPI.* Mémoire, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, 2008, 143 pages.

Buck, I., Morceau, F., Cristofanon, S., Heintz, C., Chateauvieux, S., Reuter, S., Dicato, M. et Diederich, M. 2008. Tumor necrosis factor alpha inhibits erythroid differentiation in human erythropoietin-dependent cells involving p38 MAPK pathway, GATA-1 and FOG-1 downregulation and GATA-2 upregulation. *Biochem Pharmacol*, **76**(10), 1229-1239.

Cantor, A. B. et Orkin, S. H. 2005. Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins. *Semin Cell Dev Biol*, **16**(1), 117-128.

Cao, G., Ma, J., Zhang, Y., Liu, B. et Li, F. 2009. Pancreatitis-associated protein is related closely to neoplastic proliferative activity in patients with colorectal carcinoma. *Anat Rec (Hoboken)*, **292**(2), 249-253.

Carroccio, A., Iovanna, J. L., Iacono, G., Li Pani, M., Montalto, G., Cavataio, F., Marasa, L., Barthelémy-Bialas, S. et Dagorn, J. C. 1997. Pancreatitis-associated protein in patients with celiac disease: serum levels and immunocytochemical localization in small intestine. *Digestion*, **58**(2), 98-103.

Cash, H. L., Whitham, C. V., Behrendt, C. L. et Hooper, L. V. 2006. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*, **313**(5790), 1126-1130.

Charron, F., Tsimiklis, G., Arcand, M., Robitaille, L., Liang, Q., Molkenin, J. D., Meloche, S. et Nemer, M. 2001. Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes Dev*, **15**(20), 2702-2719.

Closa, D., Motoo, Y. et Iovanna, J. L. 2007. Pancreatitis-associated protein: from a lectin to an anti-inflammatory cytokine. *World J Gastroenterol*, **13**(2), 170-174.

Crispino, J. D., Lodish, M. B., Thurberg, B. L., Litovsky, S. H., Collins, T., Molkentin, J. D. et Orkin, S. H. 2001. Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes Dev*, **15**(7), 839-844.

Dale, R. M., Remo, B. F. et Svensson, E. C. 2007. An alternative transcript of the FOG-2 gene encodes a FOG-2 isoform lacking the FOG repression motif. *Biochem Biophys Res Commun*, **357**(3), 683-687.

Darsigny, M., Babeu, J. P., Dupuis, A. A., Furth, E. E., Seidman, E. G., Levy, E., Verdu, E. F., Gendron, F. P. et Boudreau, F. 2009. Loss of hepatocyte-nuclear-factor-4alpha affects colonic ion transport and causes chronic inflammation resembling inflammatory bowel disease in mice. *PLoS One*, **4**(10), e7609.

Duseti, N. J., Frigerio, J. M., Keim, V., Dagorn, J. C. et Iovanna, J. L. 1993. Structural organization of the gene encoding the rat pancreatitis-associated protein. Analysis of its evolutionary history reveals an ancient divergence from the other carbohydrate-recognition domain-containing genes. *J Biol Chem*, **268**(19), 14470-14475.

Duseti, N. J., Frigerio, J. M., Szpirer, C., Dagorn, J. C. et Iovanna, J. L. 1995. Cloning, expression and chromosomal localization of the rat pancreatitis-associated protein III gene. *Biochem J*, **307** (Pt 1), 9-16.

Duseti, N. J., Ortiz, E. M., Dagorn, J. C. et Iovanna, J. L. 1995. Identification of a transcriptional regulatory region of the rat pancreatitis-associated protein I (PAP I) gene that confers tissue specificity. *Biochem J*, **311** (Pt 2), 643-647.

Duseti, N. J., Ortiz, E. M., Mallo, G. V., Dagorn, J. C. et Iovanna, J. L. 1995. Pancreatitis-associated protein I (PAP I), an acute phase protein induced by cytokines. Identification of two functional interleukin-6 response elements in the rat PAP I promoter region. *J Biol Chem*, **270**(38), 22417-22421.

Dusing, M. R. et Wiginton, D. A. 2005. Epithelial lineages of the small intestine have unique patterns of GATA expression. *J Mol Histol*, **36**(1-2), 15-24.

Escaffit, F., Boudreau, F. et Beaulieu, J. F. 2005. Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J Cell Physiol*, **203**(1), 15-26.

Fiedler, F., Croissant, N., Rehbein, C., Iovanna, J. L., Dagorn, J. C., van Ackern, K. et Keim, V. 1998. Acute-phase response of the rat pancreas protects against further aggression with severe necrotizing pancreatitis. *Crit Care Med*, **26**(5), 887-894.

Fox, A. H., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J. et Crossley, M. 1999. Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *EMBO J*, **18**(10), 2812-2822.

Garrett, W. S., Gordon, J. I. et Glimcher, L. H. 2010. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*, **140**(6), 859-870.

Gironella, M., Iovanna, J. L., Sans, M., Gil, F., Penalva, M., Closa, D., Miquel, R., Pique, J. M. et Panes, J. 2005. Anti-inflammatory effects of pancreatitis associated protein in inflammatory bowel disease. *Gut*, **54**(9), 1244-1253.

Groschwitz, K. R. et Hogan, S. P. 2009. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, **124**(1), 3-20; quiz 21-22.

Hautala, N., Tokola, H., Luodonpaa, M., Puhakka, J., Romppanen, H., Vuolteenaho, O. et Ruskoaho, H. 2001. Pressure overload increases GATA4 binding activity via endothelin-1. *Circulation*, **103**(5), 730-735.

Haveri, H., Ashorn, M., Iltanen, S., Wilson, D. B., Andersson, L. C. et Heikinheimo, M. 2009. Enhanced expression of transcription factor GATA-4 in inflammatory bowel disease and its possible regulation by TGF-beta1. *J Clin Immunol*, **29**(4), 444-453.

Houde, M., Laprise, P., Jean, D., Blais, M., Asselin, C. et Rivard, N. 2001. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J Biol Chem*, **276**(24), 21885-21894.

Iovanna, J., Orelle, B., Keim, V. et Dagorn, J. C. 1991. Messenger RNA sequence and expression of rat pancreatitis-associated protein, a lectin-related protein overexpressed during acute experimental pancreatitis. *J Biol Chem*, **266**(36), 24664-24669.

Jacobsen, C. M., Mannisto, S., Porter-Tinge, S., Genova, E., Parviainen, H., Heikinheimo, M., Adameyko, II, Tevosian, S. G. et Wilson, D. B. 2005. GATA-4:FOG interactions regulate gastric epithelial development in the mouse. *Dev Dyn*, **234**(2), 355-362.

Jainchill, J. L., Aaronson, S. A. et Todaro, G. J. 1969. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol*, **4**(5), 549-553.

James, R., Erler, T. et Kazenwadel, J. 1994. Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J Biol Chem*, **269**(21), 15229-15237.

Kaser, A., Zeissig, S. et Blumberg, R. S. 2010. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol*, **28**, 573-621.

Keim, V. et Loffler, H. G. 1986. Pancreatitis-associated protein in bile acid-induced pancreatitis of the rat. *Clin Physiol Biochem*, **4**(2), 136-142.

Lehotzky, R. E., Partch, C. L., Mukherjee, S., Cash, H. L., Goldman, W. E., Gardner, K. H. et Hooper, L. V. 2010. Molecular basis for peptidoglycan recognition by a bactericidal lectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(17), 7722-7727.

Liang, Q., De Windt, L. J., Witt, S. A., Kimball, T. R., Markham, B. E. et Molkenin, J. D. 2001. The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, **276**(32), 30245-30253.

Liang, Q., Wiese, R. J., Bueno, O. F., Dai, Y. S., Markham, B. E. et Molkenin, J. D. 2001. The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol*, **21**(21), 7460-7469.

Lu, J. R., McKinsey, T. A., Xu, H., Wang, D. Z., Richardson, J. A. et Olson, E. N. 1999. FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. *Mol Cell Biol*, **19**(6), 4495-4502.

Lu, Y. C., Yeh, W. C. et Ohashi, P. S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, **42**(2), 145-151.

Lussier, C. R., Babeu, J. P., Auclair, B. A., Perreault, N. et Boudreau, F. 2008. Hepatocyte nuclear factor-4alpha promotes differentiation of intestinal epithelial cells in a coculture system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **294**(2), G418-428.

Madison, B. B., Dunbar, L., Qiao, X. T., Braunstein, K., Braunstein, E. et Gumucio, D. L. 2002. 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**(36), 33275-33283.

Marchiando, A. M., Graham, W. V. et Turner, J. R. 2010. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol*, **5**, 119-144.

Marieb, E. N., *Anatomie et physiologie humaines*, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., 2005.

Masciotra, L., Lechene de la Porte, P., Frigerio, J. M., Dusetti, N. J., Dagorn, J. C. et Iovanna, J. L. 1995. Immunocytochemical localization of pancreatitis-associated protein in human small intestine. *Dig Dis Sci*, **40**(3), 519-524.

Molkenin, J. D., Lin, Q., Duncan, S. A. et Olson, E. N. 1997. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev*, **11**(8), 1061-1072.

Molkenin, J. D. 2000. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem*, **275**(50), 38949-38952.

Morimoto, T., Hasegawa, K., Kaburagi, S., Kakita, T., Wada, H., Yanazume, T. et Sasayama, S. 2000. Phosphorylation of GATA-4 is involved in alpha 1-adrenergic agonist-responsive transcription of the endothelin-1 gene in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, **275**(18), 13721-13726.

Motoo, Y., Itoh, T., Su, S. B., Nakatani, M. T., Watanabe, H., Okai, T. et Sawabu, N. 1998. Expression of pancreatitis-associated protein (PAP) mRNA in gastrointestinal cancers. *Int J Pancreatol*, **23**(1), 11-16.

Motoo, Y., Satomura, Y., Mouri, I., Mouri, H., Ohtsubo, K., Sakai, J., Fujii, T., Taga, H., Yamaguchi, Y., Watanabe, H., Okai, T. et Sawabu, N. 1999. Serum levels of pancreatitis-associated protein in digestive diseases with special reference to gastrointestinal cancers. *Dig Dis Sci*, **44**(6), 1142-1147.

Moucadel, V., Soubeyran, P., Vasseur, S., Dusetti, N. J., Dagorn, J. C. et Iovanna, J. L. 2001. Cdx1 promotes cellular growth of epithelial intestinal cells through induction of the secretory protein PAP I. *Eur J Cell Biol*, **80**(2), 156-163.

Ogawa, H., Fukushima, K., Naito, H., Funayama, Y., Unno, M., Takahashi, K., Kitayama, T., Matsuno, S., Ohtani, H., Takasawa, S., Okamoto, H. et Sasaki, I. 2003. Increased expression of HIP/PAP and regenerating gene III in human inflammatory bowel disease and a murine bacterial reconstitution model. *Inflamm Bowel Dis*, **9**(3), 162-170.

Omichinski, J. G., Clore, G. M., Schaad, O., Felsenfeld, G., Trainor, C., Appella, E., Stahl, S. J. et Gronenborn, A. M. 1993. NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. *Science*, **261**(5120), 438-446.

Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkela, R. et Ruskoaho, H. 2004. GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res*, **63**(2), 196-207.

Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R. L. et Isselbacher, K. J. 1979. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol*, **80**(2), 248-265.

Rémillard, A. *Le facteur de transcription GATA-4 et son rôle dans la réponse inflammatoire intestinale chez le rat*. Mémoire, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, 2009, 113 pages.

Robert, N. M., Tremblay, J. J. et Viger, R. S. 2002. Friend of GATA (FOG)-1 and FOG-2 differentially repress the GATA-dependent activity of multiple gonadal promoters. *Endocrinology*, **143**(10), 3963-3973.

Sambrook, J. et Russell, D. W., *Molecular Cloning: A laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

Silberg, D. G., Sullivan, J., Kang, E., Swain, G. P., Moffett, J., Sund, N. J., Sackett, S. D. et Kaestner, K. H. 2002. Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice. *Gastroenterology*, **122**(3), 689-696.

Suh, E. et Traber, P. G. 1996. An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol*, **16**(2), 619-625.

Svensson, E. C., Tufts, R. L., Polk, C. E. et Leiden, J. M. 1999. Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**(3), 956-961.

Svensson, E. C., Huggins, G. S., Dardik, F. B., Polk, C. E. et Leiden, J. M. 2000. A functionally conserved N-terminal domain of the friend of GATA-2 (FOG-2) protein represses GATA4-dependent transcription. *J Biol Chem*, **275**(27), 20762-20769.

Tevosian, S. G., Deconinck, A. E., Cantor, A. B., Rieff, H. I., Fujiwara, Y., Corfas, G. et Orkin, S. H. 1999. FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(3), 950-955.

Tevosian, S. G., Albrecht, K. H., Crispino, J. D., Fujiwara, Y., Eicher, E. M. et Orkin, S. H. 2002. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development*, **129**(19), 4627-4634.

Tremblay, J. J. et Viger, R. S. 2003. Novel roles for GATA transcription factors in the regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **85**(2-5), 291-298.

Tremblay, J. J. et Viger, R. S. 2003. Transcription factor GATA-4 is activated by phosphorylation of serine 261 via the cAMP/protein kinase a signaling pathway in gonadal cells. *J Biol Chem*, **278**(24), 22128-22135.

Tsang, A. P., Visvader, J. E., Turner, C. A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M. J., Crossley, M. et Orkin, S. H. 1997. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*, **90**(1), 109-119.

Tsang, A. P., Fujiwara, Y., Hom, D. B. et Orkin, S. H. 1998. Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev*, **12**(8), 1176-1188.

Turgeon, N., Rousseau, D., Roy, E. et Asselin, C. 2008. GATA-4 modulates C/EBP-dependent transcriptional activation of acute phase protein genes. *Biochem Biophys Res Commun*, **370**(2), 371-375.

van der Flier, L. G. et Clevers, H. 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*, **71**, 241-260.

van Wering, H. M., Bosse, T., Musters, A., de Jong, E., de Jong, N., Hogen Esch, C. E., Boudreau, F., Swain, G. P., Dowling, L. N., Montgomery, R. K., Grand, R. J. et Krasinski, S. D. 2004. Complex regulation of the lactase-phlorizin hydrolase promoter by GATA-4. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **287**(4), G899-909.

Viger, R. S., Guittot, S. M., Anttonen, M., Wilson, D. B. et Heikinheimo, M. 2008. Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease. *Mol Endocrinol*, **22**(4), 781-798.

Villard, J. 2004. Transcription regulation and human diseases. *Swiss Med Wkly*, **134**(39-40), 571-579.

Viterbo, D., Bluth, M. H., Mueller, C. M. et Zenilman, M. E. 2008. Mutational characterization of pancreatitis-associated protein 2 domains involved in mediating cytokine secretion in macrophages and the NF-kappaB pathway. *J Immunol*, **181**(3), 1959-1968.

Watt, A. J., Battle, M. A., Li, J. et Duncan, S. A. 2004. GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(34), 12573-12578.

Whyatt, D. J., deBoer, E. et Grosveld, F. 1993. The two zinc finger-like domains of GATA-1 have different DNA binding specificities. *EMBO J*, **12**(13), 4993-5005.

Yang, H. Y. et Evans, T. 1992. Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains. *Mol Cell Biol*, **12**(10), 4562-4570.