

Université de Sherbrooke

**Étude du récepteur nucléaire FXR en contexte épithélial intestinal :  
activité et régulation de l'expression**

Par  
Simon Leclerc  
Département de médecine, service de gastro-entérologie

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  
Décembre, 2012

Membre du jury d'évaluation :  
Pre. Julie Carrier (M.D.), Département de médecine, service de gastro-entérologie  
Pr. François Boudreau (Ph. D.), Département d'anatomie et biologie cellulaire  
Pr. Alfredo Menendez (Ph. D.), Département de microbiologie et infectiologie



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: 978-0-494-93303-9*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-93303-9*

#### 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

# **Étude du récepteur nucléaire FXR en contexte épithélial intestinal : activité et régulation de l'expression**

Par

Simon Leclerc

Département de médecine, service de gastro-entérologie

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

Le récepteur nucléaire FXR (NR1H4) possède quatre isoformes exprimés principalement dans le foie (FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 2) et dans l'intestin (FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4). Le rôle de FXR dans l'homéostasie des acides biliaires au sein du système digestif est bien documenté. Récemment, de nouvelles fonctions ont été attribuées à FXR dans l'intestin et une étude de ChIP-seq montre que les sites de liaison de FXR dans le génome diffèrent entre le foie et l'intestin. Notre hypothèse de recherche est que FXR contribue au maintien d'un épithélium intestinal intègre et fonctionnel en influençant des processus biologiques autres que la régulation de l'absorption des acides biliaires, et ce, par l'activation de la transcription de nouveaux gènes cibles dans l'intestin. Notre premier objectif consistait en l'identification de nouvelles cibles transcriptionnelles de FXR. Le modèle cellulaire Caco-2/15 est utilisé comme modèle d'entérocytes différenciés et l'expression de FXR augmente lors de la différenciation de ces cellules pour atteindre un niveau maximal vers 20 jours post-confluence. Dans ces cellules bien différenciées, une expérience de micro-puce à ADN révèle que l'activation de FXR par son agoniste synthétique le GW 4064 module significativement l'expression de gènes associés à différents processus biologiques tels l'organisation du cytosquelette et l'adhésion biologique. Nous avons confirmé que l'expression des gènes des protéines structurales MYO1A, MYO7A et DST est régulée positivement par l'activation de FXR, sans doute de manière indirecte puisque nous n'avons pas observé par ChIP que FXR se liait au promoteur de ces gènes. Pour identifier de nouvelles cibles directes de FXR, un criblage par qPCR selon divers critères a été réalisé. Ainsi, nous avons confirmé que le gène de SLC20A1, un transporteur de phosphore, est régulé positivement par l'activation de FXR. De plus, selon nos essais de ChIP, FXR se lie au promoteur de SLC20A1 suggérant une activation directe de la transcription. Ces résultats ouvrent la voie à un rôle auparavant insoupçonné de FXR dans des processus liés à l'absorption du phosphore. Notre deuxième objectif qui était d'étudier la régulation de l'expression différentielle des isoforme de FXR a été réalisé par des essais luciférase et nous amène à croire que le promoteur des isoformes intestinaux est régulé par la présence du facteur de transcription Cdx2. En effet, le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 présente un site de liaison à Cdx2 contrairement au promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2. De plus, en contexte où les facteurs hépatiques et intestinaux HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$  sont présents, Cdx2 rétablit un fort niveau d'activité au promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 et non au promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2. Pour conclure, ce projet de recherche montre bien que FXR dans un modèle mimant un contexte physiologique est capable d'activer des gènes cibles jusqu'ici inconnus et que l'expression des isoformes intestinaux est régulée de façon distincte par Cdx2 dans ce tissu.

Mots-clés : FXR, intestin, gènes cibles, promoteur, FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2, FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4, Cdx2

## TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux.....	VI
Liste des figures .....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS (SIGLES ET SYMBOLES).....	VIII
<b>I - INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1. Le système digestif.....	1
1.1. Structure et fonction .....	1
1.2. L'intestin grêle.....	1
1.3. L'axe crypte-villosité.....	2
2. Mécanisme général de la transcription de l'ADN.....	4
3. Les récepteurs nucléaires .....	4
4. Le récepteur nucléaire FXR .....	7
4.1. Famille, isoformes et mode d'action .....	7
4.2. Expression de FXR.....	10
4.3. Régulation de l'expression FXR .....	10
4.4. Modulation de l'activité transcriptionnelle de FXR.....	12
5. Rôles connus du récepteur nucléaire FXR.....	14
5.1. FXR, régulateur principal de la production et de la circulation entérohépatique des acides biliaires .....	14
5.2. Fonctions de FXR spécifiques à l'intestin.....	17
5.2.1. Régulation de la défense antibactérienne dans l'intestin par FXR .....	17
5.2.2. FXR dans le contexte des maladies inflammatoires intestinales .....	18
6. Liaison de FXR au niveau du promoteur de gènes de manière tissu spécifique .....	19
7. Mon projet de recherche.....	21
<b>II - MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>22</b>
1. Culture cellulaire.....	22
1.1. Culture des cellules Caco-2/15 .....	22
1.2. Culture des cellules HEK 293T.....	22
2. Traitement des cellules avec des agonistes .....	23
2.1. Traitement avec le GW4064.....	23
2.2. Traitement avec le 9cRA .....	23
3. Extraction de protéines.....	23
4. Immunobuvardage de type Western.....	24
5. Extraction d'ADN génomique .....	25
6. Extraction d'ARN .....	27
7. Réaction de transcription inverse de l'ARNm .....	28
8. Analyses de PCR quantitatif en temps réel (qPCR).....	29
9. Analyse d'expression génique par micro-puces à ADN .....	32
9.1. Design expérimental .....	32
9.2. Extraction d'ARN pour la micro-puce à ADN.....	32
9.3. Détermination des gènes modulés avec le logiciel FlexArray .....	33
9.4. Formation de classes de gènes avec le logiciel ToppGene Suite .....	34
10. Transfection transitoire des Caco-2/15 .....	34
11. Production de lentivirus et infection de cellules .....	36
11.1. Production de lentivirus.....	36

11.2. Infection de cellules.....	36
12. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) .....	37
13. Résistance transépithéliale .....	40
14. Essais de blessures .....	42
15. Constructions de plasmides des promoteurs de FXR couplés au vecteur rapporteur d'expression de la luciférase .....	43
15.1. Amplification et clonage de la région promotrice de FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 2.....	43
15.2. Amplification et clonage de la région promotrice de FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4.....	45
16. Essais luciférase .....	45
17. Analyses informatiques.....	46
17.1. Études de promoteurs .....	46
17.2. Alignements de séquences.....	46
17.3. Analyses statistiques.....	47
III - RÉSULTATS .....	48
1. Validation de l'expression de FXR dans le modèle cellulaire Caco-2/15 .....	48
2. Détermination des conditions idéales de traitement avec l'agoniste de FXR, le GW 4064, dans les Caco-2/15.....	48
3. L'activation de FXR ne semble pas avoir d'impact sur l'expression de certaines protéines de jonctions épithéliales .....	51
4. L'activation de FXR dans un contexte d'étude à large échelle de l'expression génique révèle que dans les cellules Caco-2/15, différents processus biologiques sont modulés..	51
5. L'activation de FXR n'influence pas la résistance transépithéliale lors du processus de différenciation des cellules Caco-2/15 .....	55
6. La surexpression et l'activation de FXR mènent à une augmentation de la résistance transépithéliale à 20 jours post-confluence dans des cellules Caco-2/15 .....	55
7. L'activation de FXR ne favorise pas la restitution épithéliale après une blessure.....	58
8. Validation de la modulation de l'expression de différents gènes cibles potentiels de FXR identifiés par les résultats de micro-puce à ADN.....	58
9. FXR ne se lie pas aux éléments de réponse potentiels identifiés pour les gènes MYO1A, MYO7A et DST .....	61
10. Présentation des différents gènes testés par expériences de qPCR .....	61
11. L'activation de FXR module l'expression de SLC20A1 dans les cellules Caco-2/15	66
12. FXR se lie au niveau du promoteur de SLC20A1 dans une région contenant deux éléments de réponse potentiels.....	66
13. Le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 contient des éléments de réponse à Cdx2 et l'un d'entre eux est bien conservé .....	68
14. Le facteur Cdx2 favorise une activation de la transcription au niveau du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4.....	71
15. Cdx3-HA est capable de lier l'élément de réponse à Cdx2 dans des cellules Caco-2/15.....	71
16. Les promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 contiennent des éléments de réponse à HNF1 $\alpha$ et HNF4 $\alpha$ .....	73
17. Le facteur de transcription HNF1 $\alpha$ favorise l'activité transcriptionnelle au niveau des promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 .....	73
18. Le facteur de transcription HNF4 $\alpha$ favorise l'activité transcriptionnelle seulement au niveau du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 .....	77

19. La combinaison des facteurs Cdx2, HNF1 $\alpha$ et HNF4 $\alpha$ amène un profil d'activité transcriptionnel différent du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 comparativement au promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2.....	77
IV - DISCUSSION .....	82
1. Le modèle cellulaire Caco-2/15 est un bon modèle pour étudier l'activation de FXR .	82
2. FXR n'est pas impliqué dans la régulation de l'expression de certaines protéines de jonctions et de structure .....	85
3. L'analyse par micro-puce à ADN de l'effet d'une activation de FXR suggère de nouveaux processus biologiques et de nouveaux gènes cibles potentiels pour FXR.....	86
4. Découverte de SLC20A1 comme nouvelle cible transcriptionnelle de FXR dans le modèle Caco-2/15 .....	93
5. Cdx2 favorise l'activation du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 par rapport au promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2.....	95
6. HNF1 $\alpha$ et HNF4 $\alpha$ ont également des sites de liaisons potentiels au niveau du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 et mènent à l'activation de ce promoteur .....	96
7. Cdx2 semble favoriser l'activation du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 dans le contexte où HNF1 $\alpha$ et HNF4 $\alpha$ sont présents.....	98
V - CONCLUSION .....	100
V - PERSPECTIVES .....	101
VI - REMERCIEMENTS .....	103
VII - RÉFÉRENCES .....	104
VIII - ANNEXE.....	112

## Liste des tableaux

Tableau 1. Anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type Western .....	26
Tableau 2. Amorces utilisées pour les qPCR.....	30
Tableau 3. Vecteurs d'expression et d'essais luciférase utilisés .....	35
Tableau 4. Anticorps utilisés pour les immunoprécipitations de la chromatine .....	39
Tableau 5. Amorces utilisées pour les immunoprécipitations de la chromatine .....	41
Tableau 6. Amorces utilisées pour les clonages .....	44
Tableau 7. Classification des processus biologiques dont les gènes sont régulés par l'activation de FXR.....	54

## Liste des figures

Figure 1. L'axe crypte-villosité .....	3
Figure 2. Mécanisme général de l'initiation de la transcription .....	5
Figure 3. Le récepteur nucléaire FXR, structure du gène et isoformes .....	9
Figure 4. Mode d'action de FXR et liaison à l'ADN.....	11
Figure 5. La circulation entérohépatique des acides biliaires et l'activité de FXR dans le foie et l'intestin .....	15
Figure 6. Profil d'expression de FXR dans les cellules Caco-2/15 .....	49
Figure 7. Détermination des conditions de traitement optimales au GW 4064.....	50
Figure 8. Détermination de l'expression de cibles potentielles de FXR dans les cellules Caco-2/15.....	53
Figure 9. Modulation de la résistance transépithéliale par l'activation de FXR lors du processus de différenciation des cellules Caco-2/15 .....	56
Figure 10. Modulation de la résistance transépithéliale par l'activation de FXR dans des Caco-2/15 surexprimant FXR.....	57
Figure 11. Effet d'une activation de FXR en contexte de restitution épithéliale par analyses d'essais de blessures .....	59
Figure 12. Validation d'une modulation de l'expression de gènes cibles potentiels de FXR .....	60
Figure 13. Immunoprécipitation de la chromatine ciblant des régions du génome ayant des FXRE potentiels dans les gènes cibles identifiés.....	63
Figure 14. Immunoprécipitation de la chromatine ciblant des régions du génome où FXR est connu pour se fixer (validation de la technique) .....	64
Figure 15. Représentation graphique des gènes analysés par qPCR pour identifier des cibles modulées par l'activation de FXR .....	65
Figure 16. Modulation de l'expression de l'ARNm de SLC20A1 par l'activation de FXR avec le GW 4064.....	67
Figure 17. Immunoprécipitation de la chromatine ciblant une région où FXR se fixe sur le promoteur de SLC20A1 .....	69
Figure 18. Identification d'éléments de réponse potentiels à Cdx2 sur le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 .....	70
Figure 19. Effet de Cdx2 sur les promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4.....	72
Figure 20. Immunoprécipitation de la chromatine ciblant une région du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 ayant un élément de réponse potentiel à Cdx2 .....	74
Figure 21. Identification d'éléments de réponse potentiels à HNF1 $\alpha$ et HNF4 $\alpha$ sur les promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 .....	75
Figure 22. Effet de HNF1 $\alpha$ sur les promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4.....	76
Figure 23. Effet de HNF4 $\alpha$ sur les promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4.....	78
Figure 24. Effet d'une combinaison des facteurs Cdx2, HNF1 $\alpha$ et HNF4 $\alpha$ sur les promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 .....	81

## LISTE DES ABRÉVIATIONS (SIGLES ET SYMBOLES)

6-ECDC	: (3 $\alpha$ , 5 $\beta$ , 6 $\alpha$ , 7 $\alpha$ )-6-ethyl-3,7-dihydroxy-cholan-24-oic acid
9cRA	: Acide 9-cis rétinolique (9-cis-retinoic acid)
a.a.	: Acides aminés
Ac	: Anticorps
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ASBT	: <i>Ileal apical sodium-dependent bile acid transporter</i>
ASC	: <i>ASC-2/NCOA6 complex</i>
ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i>
BAAT	: <i>Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase</i>
BACS	: <i>Bile acyl-CoA synthetase</i>
Brg-1	: <i>Brahma protein-like 1</i>
BSEP	: <i>Bile salt export pump</i>
CA	: Acide cholique ( <i>Cholic acid</i> )
CAR	: Récepteur constitutive des androstanes ( <i>Constitutive androstane receptor</i> )
CARM1	: <i>Coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i>
CBP	: <i>CREB-binding protein</i>
CDCA	: Acide chénodésoxycholique ( <i>Chenodeoxycholic acid</i> )
Cdx2	: <i>Caudal type homeobox 2</i>
ChIP	: Immunoprécipitation de la chromatine ( <i>Chromatin immunoprecipitation</i> )
CLDN1	: Claudine 1
CMV	: Cytomégalovirus
Ct	: Cycle seuil ( <i>Cycle threshold</i> )
CTD	: Domaine C-terminal ( <i>C-terminal domain</i> )
CYP7A1	: <i>Cholesterol 7-alpha-hydrolase</i>
CYP8B1	: <i>Sterol 12-alpha-hydroxylase</i>
DBD	: Domaine de liaison à l'AND ( <i>DNA binding domain</i> )
DCA	: Acide désoxycholique ( <i>Deoxycholic acid</i> )
DMEM	: Milieu de Eagle modifié par Dulbecco ( <i>Dulbecco modified Eagle's medium</i> )
DMSO	: <i>Dimethyl sulfoxide</i>
DRIP205	: (MED1) <i>Mediator complex subunit 1</i>
DSS	: <i>Dextran sulfate sodium</i>
DST	: Dystonine
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ERR	: Récepteur relié à l'œstrogène ( <i>Estrogen related receptors</i> )
FABP6	: <i>Fatty acid binding protein 6, ileal</i>
FBS	: Sérum bovin fœtal ( <i>Fetal bovine serum</i> )
FGF19	: <i>Fibroblast growth factor 19</i>
FGFR4	: <i>Fibroblast growth factor receptor 4</i>
FXR	: <i>Farnesoid X receptor</i>
GO	: Ontologie de gènes ( <i>Gene ontology</i> )
GR	: Récepteur des glucocorticoïdes ( <i>Glucocorticoid receptor</i> )

GW 4064:	<i>3-[2-[2-Chloro-4-[[3-(2,6-dichlorophenyl)-5-(1-methylethyl)-4-isoxazolyl]methoxy]phenyl]ethenyl]benzoic acid</i>
HA:	Hémagglutinine de l'influenza humaine
HEPES:	<i>2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid</i>
HNF1 $\alpha$ :	<i>Hepatocyte nuclear factor 1-alpha</i>
HNF4 $\alpha$ :	<i>Hepatocyte nuclear factor 4-alpha</i>
HGNC:	<i>HUGO (Human Genome Organisation) Gene Nomenclature Committee</i>
IgG :	Immunoglobuline G
Ip :	Immunoprécipitation
JNK:	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kb:	Kilobase
LCA:	Acide lithocholique ( <i>Lithocholic acid</i> )
LPS:	Lipopolysaccharide
LRH-1:	<i>Liver receptor homolog 1</i>
MDR3:	<i>Multiple drug resistance 3</i>
MRP2:	<i>Multidrug resistance-associated protein 2</i>
MYO1A:	Myosine IA
MYO7A:	Myosine VIIA
NF- $\kappa$ B:	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NP-40 :	Nonidet P-40
NCOA1:	<i>Nuclear receptor coactivator 1</i>
NCoR:	<i>Nuclear receptor corepressor</i>
NPHP1:	Néphrocystine 1
OCLN:	Occludine
OST $\alpha/\beta$ :	<i>Organic solute transporter subunit alpha / subunit beta</i>
pb :	Paire de base
PBS :	Tampon de phosphate salin ( <i>Phosphate-buffered saline</i> )
PCR :	Réaction de polymérase en chaîne ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PGC1- $\alpha$ :	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha</i>
PKC:	Protéine kinase C
PMSF :	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
PPAR $\gamma$ :	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PRMT1 :	<i>Protein arginine N-methyltransferase 1</i>
PXR :	<i>Pregnane X receptor</i>
RAR :	Récepteur à l'acide rétinoïque ( <i>Retinoic acid receptor</i> )
RT :	Transcription inverse ( <i>Reverse transcriptase</i> )
RLU :	Unités de lumière relatives ( <i>Relative light units</i> )
RXR :	Récepteur X de rétinoïdes ( <i>Retinoid X receptor</i> )
SHP:	<i>Small heterodimer partner</i>
SDS:	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SLC20A1:	<i>Sodium-dependent phosphate transporter 1</i>
SV40:	Virus simien 40 ( <i>Simian vacuolating virus 40</i> )
SWI/SNF:	<i>SWItch/Sucrose Non Fermentable</i>
TAF:	Facteurs associés à TBP ( <i>TBP-associated factors</i> )
TBP:	<i>TATA binding protein</i>
TBS/T:	<i>Tris-buffered saline / Tween</i>
TEER:	Résistance transépithéliale ( <i>Trans Epithelial Electric Resistance</i> )

TE :	<i>Tris/EDTA</i>
TEMED :	<i>N,N,N',N'-tetramethyl-ethane-1,2-diamine</i>
TFII :	<i>Facteur de transcription II (Transcription factor II)</i>
TNF $\alpha$ :	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
TP :	<i>Température pièce</i>
TRRAP :	<i>Transformation/transcription domain-associated protein</i>
TSE :	<i>Tris/sodium chloride/EDTA</i>
UTR :	<i>Régions non traduites (Untranslated regions)</i>
VCL :	<i>Vinculine</i>
VDR :	<i>Récepteur de la vitamine D (Vitamin D receptor)</i>
VIL1 :	<i>Villine 1</i>
ZO :	<i>Zonula occludens (tight junction protein)</i>

## I - INTRODUCTION

### 1. Le système digestif

#### 1.1. Structure et fonction

Le système digestif est constitué de différents organes qui fonctionnent de concert pour permettre la digestion de la nourriture ainsi que l'absorption des nutriments. Les nutriments absorbés fournissent les ressources et l'énergie nécessaire à l'ensemble du corps. Les organes du tube digestif sont la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin et le côlon. Il existe également des organes annexes qui assurent une bonne digestion des aliments telles les dents, la langue et la vésicule biliaire. Le foie, le pancréas et les glandes salivaires participent également à la dégradation des aliments en produisant des substances qui favorisent cette dégradation (Marieb, 2005).

Le tube digestif au complet est formé principalement de quatre couches. La première, nommée muqueuse, est la couche la plus interne et se compose d'un épithélium dont les fonctions principales sont la sécrétion de mucus, d'enzymes et d'hormones, l'absorption des nutriments et la protection contre les infections par son étanchéité. La deuxième couche, la sous-muqueuse, renferme les vaisseaux lymphatiques et sanguins tout au long du tube digestif. La troisième couche, la musculuse, est composée de cellules musculaires lisses qui produisent le péristaltisme intestinal et la segmentation du bol alimentaire. La séreuse, qui est la quatrième couche ainsi que la plus externe, fournit un rôle protecteur et est constituée de tissus conjonctifs ainsi que d'un épithélium squameux (Marieb, 2005).

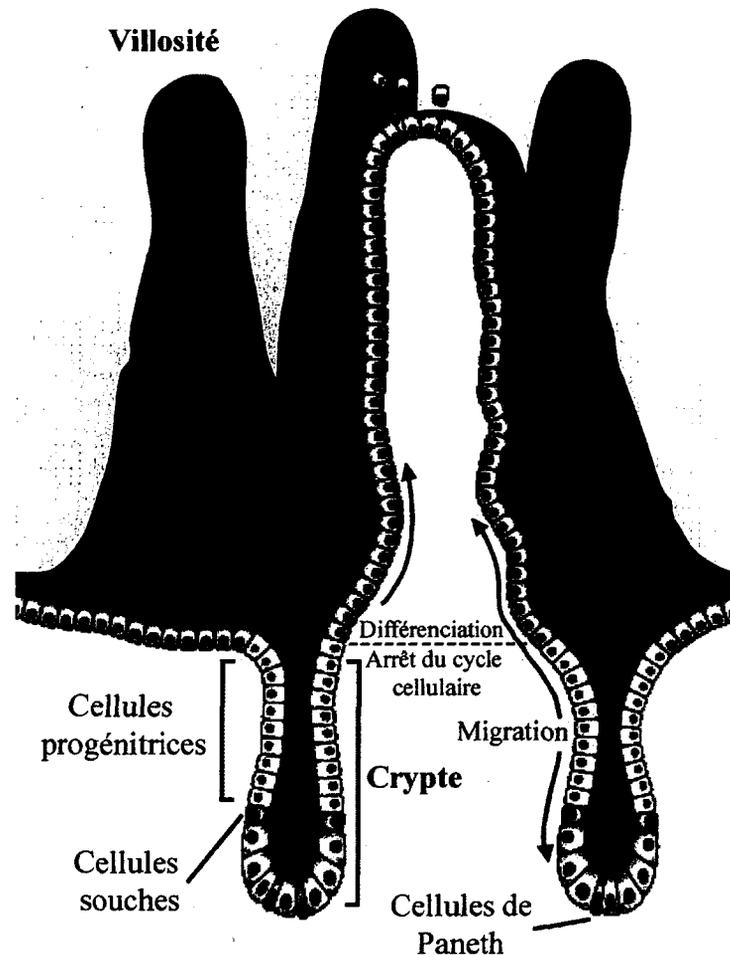
#### 1.2. L'intestin grêle

C'est au niveau de l'intestin grêle que les nutriments sont préparés pour leur transport vers les cellules de l'organisme. Les sécrétions du foie telles la bile et les enzymes

produites par le pancréas sont cependant essentielles à ce processus. L'intestin grêle est divisé en trois segments soit le duodénum, le jéjunum et l'iléon. La muqueuse de l'intestin grêle est adaptée à sa fonction d'absorption des nutriments. En effet, en plus de la longueur de l'intestin grêle, les valvules conniventes qui sont des replis de la muqueuse et de la sous-muqueuse permettent une augmentation significative de la surface de contact. Ces structures sont très présentes au niveau du jéjunum. L'absorption des nutriments s'effectue majoritairement dans la partie proximale de l'intestin grêle (Marieb, 2005). À la jonction entre les cellules de l'épithélium, on retrouve des rassemblements de protéines connus sous le nom de jonctions serrées. La perméabilité de ces jonctions est coordonnée avec les processus de transports d'ions et de nutriments. En effet, l'augmentation du transport des nutriments couplé au  $\text{Na}^+$  mène à l'ouverture de ces jonctions ce qui apporte une meilleure absorption de l'eau et permet le transport de nutriments solubilisés. Les jonctions serrées sont cependant essentielles au maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal et permettent d'assurer la protection contre les agents pathogènes (Yamada, 2009).

### 1.3. L'axe crypte-villosité

Un moyen supplémentaire pour l'intestin d'augmenter sa surface de contact pour l'absorption des nutriments est la présence de villosités. Ces villosités sont formées à partir de cryptes qui leur permettent un renouvellement continu. La crypte avec une villosité associée est communément appelée l'axe-crypte villosité (Figure 1). Une seule crypte alimente plusieurs villosités en cellules. Il existe quatre types principaux de cellules différenciées au niveau de l'épithélium intestinal. De la lignée absorbante on retrouve les entérocytes et de la lignée sécrétoire, les cellules caliciformes, entéroendocrines et de Paneth (van der Flier et Clevers, 2009). On trouve en grande majorité au niveau de l'épithélium intestinal des entérocytes qui sont des cellules possédant des microvillosités à leur surface apicale. Ce sont ces cellules qui sont responsables de la digestion, grâce à des enzymes spécialisées, et de l'absorption des nutriments. Présents en moins grand nombre, on retrouve les cellules caliciformes qui sécrètent le mucus. De plus, les cellules entéroendocrines, constituées de plus de quinze différents sous types sont responsables de la sécrétion d'hormones qui agissent sur la croissance, la prolifération et l'activité digestive



**Figure 1. L'axe crypte-villosité**

L'intestin est composé de cellules formant des structures nommées axe crypte-villosité. Au niveau des cryptes, on trouve les cellules souches qui permettent de générer les cellules différenciées, soit les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules entéroendocrines, qui migrent elles, vers le haut des villosités. Les cellules progénitrices qui deviennent les cellules de Paneth migrent vers le fond des cryptes. Adaptée de van der Flier et Clevers, 2009.

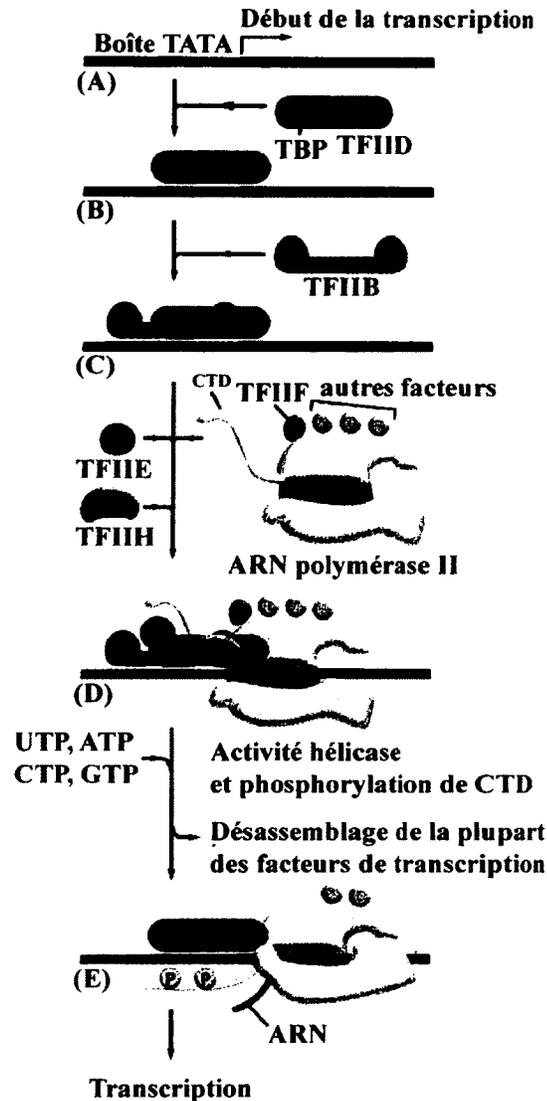
des cellules de l'intestin. Finalement, les cellules de Paneth sont des cellules ayant un rôle dans l'immunité du système digestif car elles sont situées au fond des cryptes et sécrètent des protéines de la famille des défensines qui tuent les bactéries (Alberts *et al.*, 2008).

## **2. Mécanisme général de la transcription de l'ADN**

La transcription de l'ADN est le mécanisme qui permet la synthèse de l'ARN et ultimement à partir de cet ARN l'expression de la protéine associée au gène par le processus de traduction. L'enzyme clé lors de la transcription est l'ARN polymérase II. C'est cette enzyme qui catalyse l'assemblage des nucléotides complémentaires à l'ADN sous forme d'ARN. Pour que l'ARN polymérase II soit recrutée au niveau de l'ADN, une cascade d'évènements doit se produire. Des protéines nommées facteurs de transcriptions généraux vont se lier à l'ADN, notamment à la boîte TATA. Ces facteurs de transcription généraux sont TFIID (composé des sous-unités TBP et TAF), TFIIB, TFIIF, TFIIE et TFIIH. Séquentiellement, suite à la liaison à la boîte TATA, l'assemblage de ce complexe protéique sur l'ADN permet le recrutement de la polymérase et l'initiation de la transcription (Figure 2). En plus des facteurs généraux de transcription, des protéines appelées coactivateurs sont recrutées pour augmenter l'activité transcriptionnelle. Le recrutement de complexes de remodelage de la chromatine est essentiel pour rendre l'ADN accessible à la transcription. En effet, les histones acétyl transférase ajoutent des groupements acétyl sur les résidus lysine des queues N-terminales des histones, ce qui amène la chromatine à se décompacter et expose les sites de liaison pour l'ARN polymérase II (Alberts *et al.*, 2008). Dans l'organisme, en plus des facteurs de transcription généraux, il existe plusieurs facteurs de transcription spécifiques qui déterminent le lieu et les niveaux de la transcription dans différents tissus.

## **3. Les récepteurs nucléaires**

Les récepteurs nucléaires sont des protéines régulatrices de l'expression des gènes qui sont modulés par des ligands (Alberts *et al.*, 2008). Ces protéines définissent une superfamille responsable d'aspects majeurs dans le développement, la différenciation, la



**Figure 2. Mécanisme général de l'initiation de la transcription**

A. Pour initier la transcription, des séquences spécifiques telles la boîte TATA sont reconnus par les facteurs de transcription généraux. B. À l'aide de sa sous-unité TBP, TFIID reconnaît et se lie à la boîte TATA. C. Cela permet la liaison adjacente de TFIIB, menant à une distorsion de l'ADN. D. Les autres facteurs de transcription généraux ainsi que l'ARN polymérase II s'assemblent alors au niveau du promoteur. E. TFIIH utilise alors l'ATP pour séparer les brins d'ADN de la double hélice au niveau du site d'initiation de la transcription ce qui expose le brin cible à la polymérase. TFIIH phosphoryle le domaine C-terminal de la polymérase (CTD), ce qui change sa conformation et la fait se libérer des facteurs de transcription généraux ayant servi à son recrutement. La phase d'élongation de la transcription peut alors débuter. Adaptée de Alberts *et al.*, 2008.

reproduction ainsi que l'homéostasie du métabolisme. La superfamille est divisée en familles selon les divers ligands, soit celle des récepteurs stéroïdiens, celle des thyroïdiens/rétinoïques et celle des orphelins, c'est-à-dire sans ligands connus (Bain *et al.*, 2007). Les 48 récepteurs nucléaires possèdent une structure propre à la famille composée de quatre domaines bien précis.

Le domaine de liaison au ligand (LBD) est composé la majeure partie du temps d'environ 12 hélices  $\alpha$  qui forment une structure tertiaire nommée poche de liaison. La force et la spécificité du complexe ligand-LBD sont basées sur des interactions hydrophobes, un réseau de ponts hydrogène et l'organisation stérique de la poche de liaison. Le LBD possède une fonction de transactivation ligand dépendant (AF2) capable de recruter des coactivateurs. Le changement de conformation de l'hélice  $\alpha$  12 (nommée aussi hélice AF2) amène la création d'un sillon hydrophobe. Les coactivateurs qui possèdent un motif d'acides aminés LXXLL peuvent s'insérer dans ce sillon (Bain *et al.*, 2007). Ces coactivateurs ont des caractéristiques qui permettent un remodelage de la chromatine de manière ATP-dépendante (SWI/SNF), mais également par l'acétylation (NCOA1, CBP et p300) et la méthylation (CARM1 et PRMT1) des queues des histones, ce qui facilite l'assemblage des facteurs de transcription généraux (Xu et Li, 2003). Le LBD contribuerait également à la dimérisation des récepteurs nucléaires (Moore *et al.*, 2006).

Un second domaine important des récepteurs nucléaires est le domaine de liaison à l'ADN (DBD). C'est ce domaine qui permet la reconnaissance de séquences d'ADN précises nommées éléments de réponse grâce à la présence de motifs doigts de zinc ainsi que d'une hélice  $\alpha$  qui interagi avec le sillon majeur de l'ADN (Bain *et al.*, 2007).

Le troisième domaine présent est le domaine charnière qui est situé entre le DBD et le LBD. Il contribue à la dimérisation des récepteurs nucléaires ainsi qu'à la liaison de ceux-ci à l'ADN et présente également des séquences de localisation au noyau (Moore *et al.*, 2006).

Le quatrième domaine des récepteurs nucléaires est le domaine N-terminal qui possède une fonction de transactivation ligand indépendant (AF1). Ce domaine est un des moins bien caractérisé étant donné sa faible homologie de structure entre les membres de la superfamille. Il activerait de manière constitutive la transcription en permettant le recrutement de coactivateurs de manière indépendante de la présence de ligand et serait également le siège de modifications post-traductionnelles telles la phosphorylation (Bain *et al.*, 2007); (Moore *et al.*, 2006).

Ensemble, le domaine N-terminal (avec l'AF1), le DBD, le domaine charnière et le LBD (avec l'AF2) constituent la structure de base des récepteurs nucléaires. La variabilité de ces domaines fait en sorte que différentes cascades d'évènements peuvent se produire d'un récepteur nucléaire à un autre. Cela contribue à la spécificité de chacun des récepteurs pour ce qui est de mener ou non à l'activation de la transcription de gènes spécifiques.

#### **4. Le récepteur nucléaire FXR**

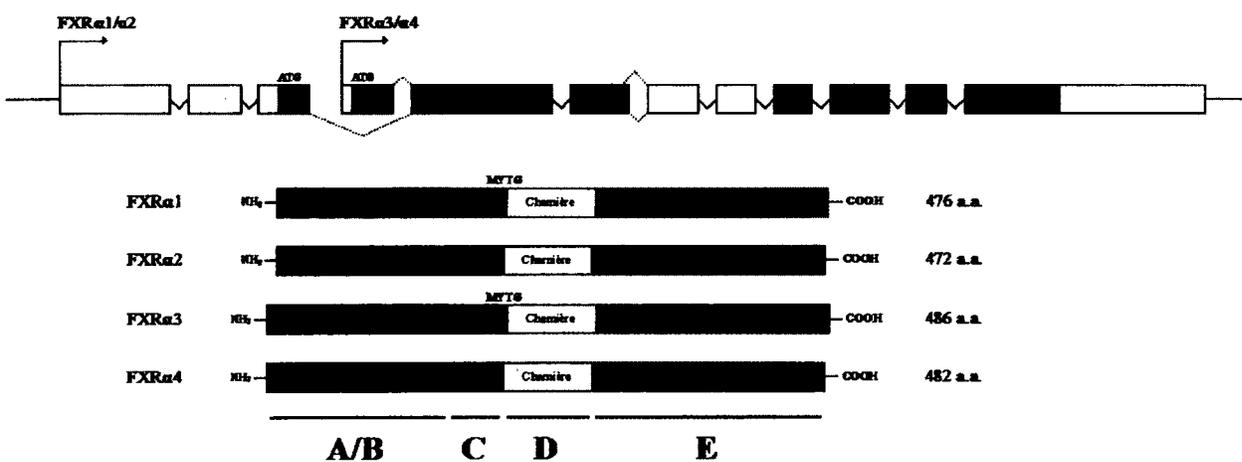
##### **4.1. Famille, isoformes et mode d'action**

FXR est un membre de la famille des récepteurs nucléaires et il en existe deux types connus, soit FXR $\alpha$  et FXR $\beta$ . Le récepteur FXR $\alpha$  a été identifié pour la première fois chez le rat comme récepteur nucléaire étant faiblement activé par le farnésol, un métabolite nécessaire à la synthèse du cholestérol, des acides biliaires, des stéroïdes et des rétinoïdes (Forman *et al.*, 1995). FXR $\beta$  quant à lui a été identifié chez la souris comme protéine senseur de lanostérol, un intermédiaire dans la voie de production du cholestérol. Le gène FXR $\beta$  a cependant été confirmé comme étant un pseudogène chez l'humain étant donné trois décalages du cadre de lecture et l'ajout de deux codons-stops qui rendent le gène non fonctionnel (Otte *et al.*, 2003). Dans ce mémoire, lorsque FXR sera mentionné, ce sera de FXR $\alpha$  dont il sera question. Suite à l'identification de FXR, un ligand naturel spécifique lui a été trouvé, soit les acides biliaires. En effet, il a été montré que la poche de liaison au ligand de FXR possède des caractéristiques qui permettent une discrimination des acides biliaire par rapport aux autres stéroïdes et métabolites du cholestérol. La reconnaissance se

fait par les propriétés amphipathiques des acides biliaires en plus de leur forme distincte. De plus, entre les différents acides biliaires, le CA et le DCA s'insèrent moins bien dans la poche de liaison puisque celle-ci ne fournit pas de chaîne d'acides aminés polaires pour accommoder des groupements présents sur ces acides biliaires. Ainsi, le ligand ayant le plus d'effet pour augmenter l'activité transcriptionnelle de FXR est le CDCA (Parks *et al.*, 1999), puisque sa liaison présente moins de contraintes (Mi *et al.*, 2003). Dans la littérature, plusieurs expérimentations utilisent des agonistes synthétique à FXR pour l'activer plutôt que les acides biliaires qui présentent des risques de toxicité cellulaire. Un agoniste notable de FXR est le GW 4064. Cette molécule à structure non stéroïdienne a été caractérisée comme ayant un potentiel d'activation et une efficacité de 200 fois supérieure au ligand naturel de FXR, le CDCA. De plus, cet agoniste est spécifique à FXR lorsqu'utilisé à des concentrations allant jusqu'à 1  $\mu$ M (Maloney *et al.*, 2000).

Il existe quatre isoformes de FXR identifiés à ce jour et ils sont connus sous l'appellation FXR $\alpha$ 1, FXR $\alpha$ 2, FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4 (Huber *et al.*, 2002). Ces isoformes sont le résultat de l'utilisation de deux promoteurs distincts, ce qui fait en sorte que FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 2 possèdent un domaine N-terminal plus court que FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4. En plus de l'utilisation de deux promoteurs, un épissage alternatif de l'ARN adjacent à la séquence du DBD fait en sorte que les protéines FXR $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 4 ne possède pas quatre acides aminés dans cette région, soit une méthionine, une tyrosine, une thréonine et une glycine (connue comme la séquence MYTG) (Lee *et al.*, 2006) (Figure 3). Ces deux mêmes isoformes sont également ceux qui possèdent l'activité transcriptionnelle la plus importante comparativement à ceux possédant les acides aminés MYTG (FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 3) (Zhang *et al.*, 2003).

FXR est une protéine qui agit comme facteur de transcription lié à l'ADN le plus souvent sous forme d'hétérodimère, son partenaire de prédilection étant le récepteur nucléaire RXR. L'hétérodimère formé est transactivé de manière permissive, c'est-à-dire que la présence du ligand de RXR ou de FXR est suffisante pour mener à la cascade de recrutement de protéines coactivatrices au niveau du promoteur d'un gène cible du récepteur nucléaire. La présence du second ligand est soit additive ou synergique à la



**Figure 3. Le récepteur nucléaire FXR, structure du gène et isoformes**

Le gène FXR, composé de dix exons, permet l'expression des quatre isoformes de FXR par l'utilisation de deux promoteurs distincts ainsi que par épissage alternatif. Les isoformes possèdent tous la structure caractéristique des récepteurs nucléaires avec les domaines associés.

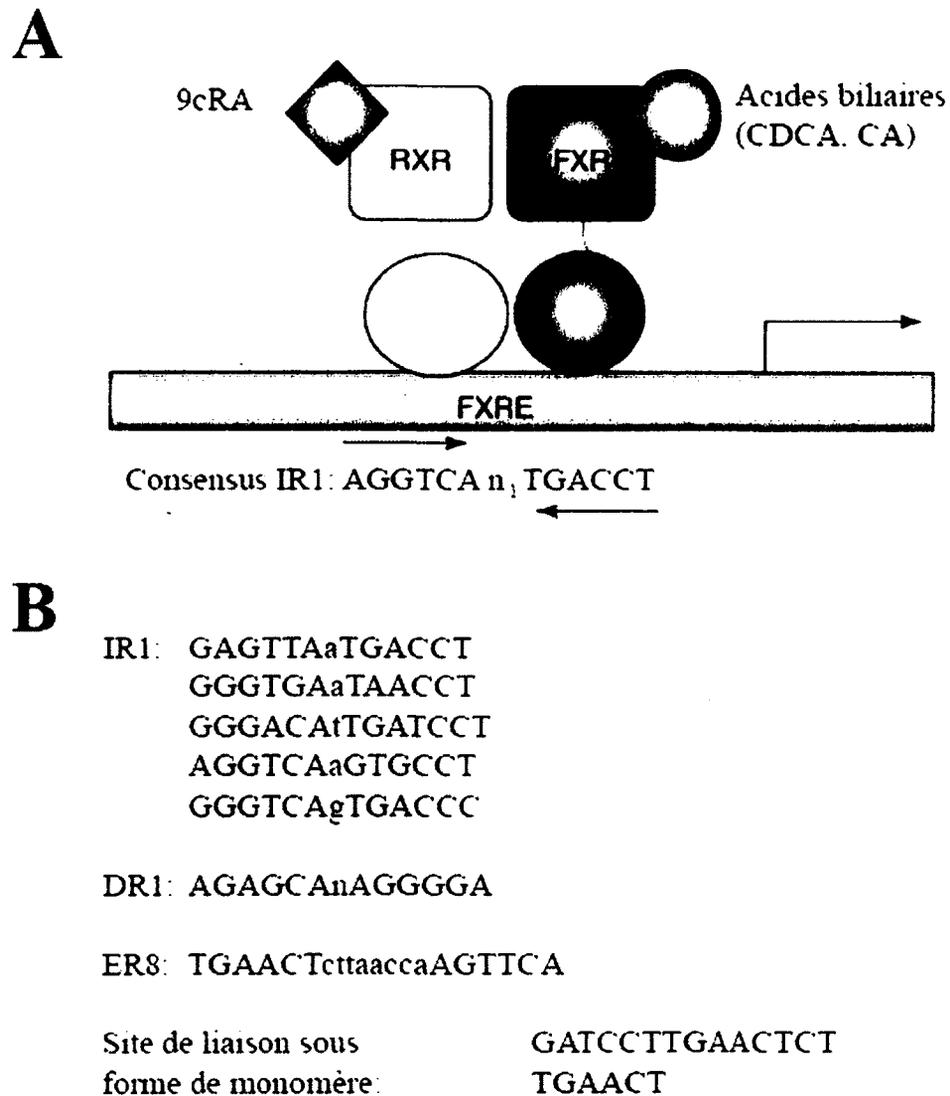
réponse transcriptionnelle déjà entamée (Dawson et Xia, 2012). FXR lie l'ADN à des séquences nommées éléments de réponse à FXR (FXRE). L'élément de réponse de choix pour FXR est une répétition inversée d'un consensus de six nucléotides 5' - AGGTCA - 3' séparés d'un nucléotide (IR1) (Lee *et al.*, 2006). Il existe également d'autres types de répétitions auxquelles FXR peut se fixer telles des répétitions directes (DR) et éversées (ER), FXR pouvant aussi se fixer à l'ADN sous forme de monomère (Wang *et al.*, 2008) (Figure 4). De manière générale, le récepteur nucléaire FXR agit comme facteur de transcription en présence de son ligand et permet l'expression de gènes dans les tissus où il est exprimé.

#### 4.2. Expression de FXR

L'expression de FXR a été bien caractérisée chez l'humain et la souris. FXR est fortement exprimé dans le foie, l'intestin, les reins et les glandes surrénales. Il est faiblement exprimé dans le cœur et les tissus adipeux (Zhang *et al.*, 2003). FXR est présent à divers niveaux dans différents tissus adultes ainsi que dans des tissus fœtaux. Il y a par contre une expression différentielle des isoformes de FXR. En effet, les isoformes FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 2 sont majoritairement exprimés au niveau du foie et des glandes surrénales chez l'adulte, ainsi que fortement exprimés dans le foie fœtal. FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4 sont eux, fortement exprimés au niveau de l'intestin et des reins chez l'adulte, ainsi que dans l'intestin fœtal (Huber *et al.*, 2002). Plus spécifiquement au niveau de l'intestin, il a été montré chez la souris que l'expression de FXR est plus élevée au niveau de l'iléon comparativement au duodénum, jéjunum et côlon. De plus, en ce qui concerne l'axe crypte-villosité, l'expression de FXR se situe seulement au niveau des villosités et diminue graduellement vers l'apex de celles-ci (Inagaki *et al.*, 2006).

#### 4.3. Régulation de l'expression FXR

La régulation de l'expression de FXR a été majoritairement étudiée au niveau du promoteur qui permet l'expression des isoformes FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 2, soit ceux surtout exprimés au foie. Plusieurs sites de liaisons potentiels à différents facteurs de transcription



**Figure 4. Mode d'action de FXR et liaison à l'ADN**

A. FXR est lié à l'ADN sous la forme d'hétérodimère avec RXR. Les deux récepteurs sont activés par leur ligand soit le 9cRA pour RXR et les acides biliaires pour FXR. Adaptée de Lee *et al.*, 2006 B. La liaison se fait sur un FXRE dont il existe plusieurs motifs décrits, soit IR1, DR1, ER8 et même des séquences pour la liaison sous forme de monomère. Adaptée de Wang *et al.*, 2008.

ont été identifiés sur ce promoteur. Dans les hépatocytes, le facteur de transcription HNF1 $\alpha$  se lie au promoteur de FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 2 et peut promouvoir la transcription génique de manière positive (Lou *et al.*, 2007). Il a aussi été montré que le cofacteur SIRT1, une déacétylase, est recruté par HNF1 $\alpha$  sur le promoteur de FXR. Cette interaction impliquant également le recrutement du coactivateur PGC-1 $\alpha$  mène à une augmentation de l'activité transcriptionnelle au promoteur de FXR (Purushotham *et al.*, 2012). Un autre mécanisme transcriptionnel modulant l'expression hépatique de FXR se produit dans un contexte de régulation du métabolisme des triglycérides, plus particulièrement en condition de jeûne. Lors du stress d'une période de jeûne prolongée, l'expression de PGC-1 $\alpha$  et des facteurs de transcriptions HNF4 $\alpha$  et PPAR $\gamma$  est induite. PGC-1 $\alpha$  peut alors coactiver les facteurs HNF4 $\alpha$  et PPAR $\gamma$  qui sont liés à un élément de réponse DR1 présent dans les deux promoteurs de FXR. Cela mène à une induction de l'expression de FXR, celui-ci pouvant lui aussi être coactivé par PGC-1 $\alpha$  sur le promoteur de ces gènes cibles. Dans ce contexte de jeûne, l'activation de FXR au niveau du foie mène à une diminution des niveaux de triglycérides plasmatiques et une augmentation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras pour la production d'énergie (Zhang *et al.*, 2004).

#### 4.4. Modulation de l'activité transcriptionnelle de FXR

FXR, comme facteur de transcription, peut être transactivé par différents coactivateurs et tel que mentionné plus tôt, PGC-1 $\alpha$  est un de ceux-ci (Zhang *et al.*, 2004). D'autres coactivateurs ont été identifiés comme régulateurs positifs de l'activité transcriptionnelle de FXR, soit : p300 (Fang *et al.*, 2008), Brg-1 (Miao *et al.*, 2009), CARM1 (Ananthanarayanan *et al.*, 2004), PRMT1 (Rizzo *et al.*, 2005), ASCOM (Kim *et al.*, 2009), DRIP205 (Pineda Torra *et al.*, 2004) et TRRAP (Unno *et al.*, 2005). Ces coactivateurs amènent tous au final une modification de la structure de la chromatine qui favorise la transcription des gènes cibles de FXR. L'activité transcriptionnelle peut aussi être diminuée, et ce, en présence de facteurs nommés corépresseurs. Pour ce qui est de FXR, les sous-unités ADN dépendantes de protéines kinases, Ku80 et Ku70 ont été identifiées comme corépresseurs. Les protéines Ku interagissent avec le DBD de FXR mais aussi avec sa région charnière. Cette interaction diminuerait l'activité au promoteur de

gènes cibles de FXR possiblement par l'inhibition de l'hétérodimérisation de FXR ou de sa liaison à l'ADN (Ohno *et al.*, 2009). Les expérimentations effectuées pour identifier ces coactivateurs et corépresseurs ont toutes été faites dans un contexte hépatique, soit en utilisant le foie d'animaux ou la lignée cellulaire HepG2, bien établie comme modèle d'hépatocyte.

Diverses modifications post-traductionnelles ont été identifiées pour la protéine FXR. Ces modifications affectent aussi son activité transcriptionnelle. Par exemple, la protéine p300 est capable d'acétyler FXR au niveau du DBD, mais aussi dans sa région charnière, lorsque celui-ci est activé par son ligand. Cela mène respectivement à une moins bonne liaison avec l'ADN, mais aussi une moins bonne hétérodimérisation avec RXR, diminuant donc le potentiel de transactivation de FXR (Kemper *et al.*, 2009). Comme autre modification post-traductionnelle étudiée, des sites de phosphorylation ont été identifiés au niveau du DBD de FXR. De manière plus précise, la sérine 135 et la sérine 154 sont phosphorylées par les PKC calcium-dépendantes. Cette phosphorylation du DBD favorise l'interaction de FXR avec le coactivateur PGC-1 $\alpha$  et augmente ainsi sa transactivation (Gineste *et al.*, 2008). Des modifications post-traductionnelles telles l'ubiquitination et la sumoylation ont aussi été étudiées. À priori, l'ubiquitination ne régule pas le potentiel de transactivation de FXR mais plutôt sa dégradation. En effet, le traitement avec un inhibiteur du protéasome augmente les niveaux d'expression de FXR, celui-ci étant alors fortement ubiquitinylé. Cependant, les résidus qui sont ubiquitinylés ne sont pas connus (Kemper *et al.*, 2009). Pour ce qui est de la sumoylation de FXR, la lysine 277 dans le LBD de FXR est un site potentiel de sumoylation au niveau de cellules immunitaires telles les macrophages. Cette sumoylation pourrait affecter la régulation de l'immunité intestinale en conditions inflammatoires puisqu'elle est requise dans le rôle qu'à FXR pour maintenir le corépresseur NCoR au niveau du promoteur de gènes pro-inflammatoires (Vavassori *et al.*, 2009).

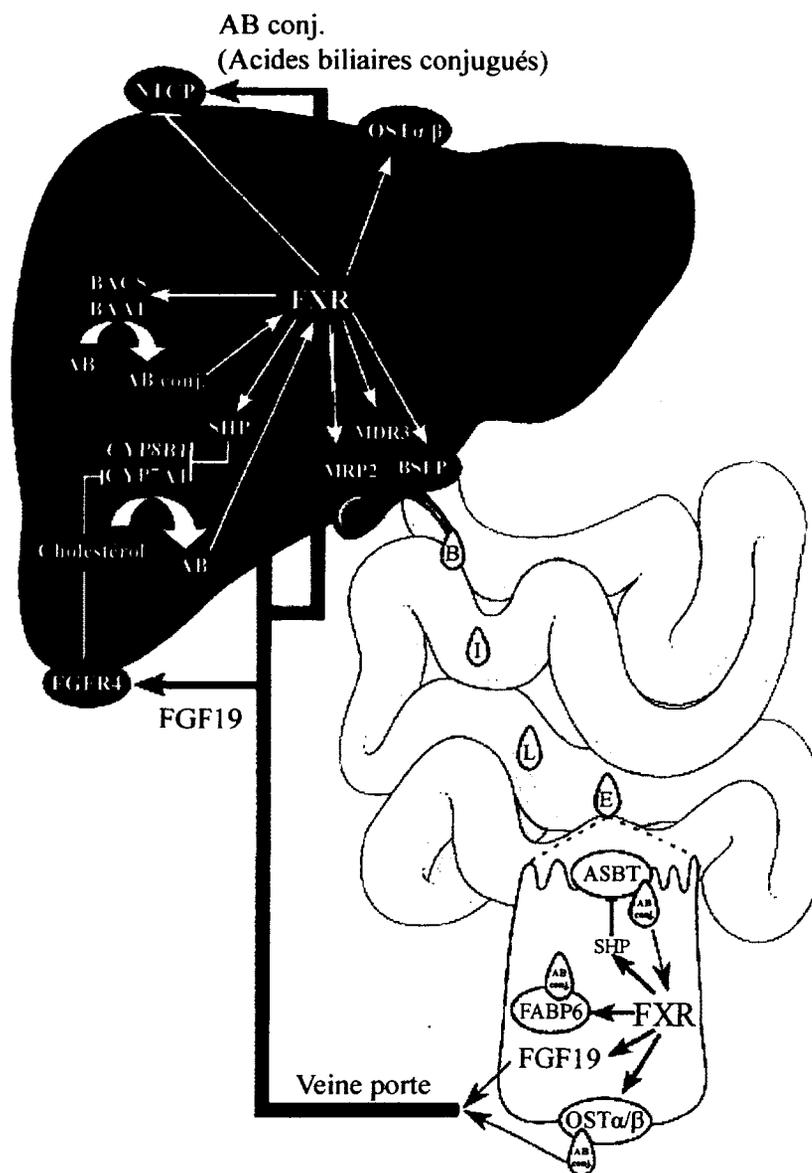
## 5. Rôles connus du récepteur nucléaire FXR

### 5.1. FXR, régulateur principal de la production et de la circulation entérohépatique des acides biliaires

La fonction principale de FXR est de réguler la synthèse hépatique des acides biliaires et leur réabsorption par l'intestin.

Les acides biliaires sont des produits du catabolisme du cholestérol et sont classifiés comme étant primaires, tel que le CDCA et le CA produits par le foie, ou secondaires tel le DCA et le LCA produits par les bactéries intestinales à partir des acides biliaires primaires (Modica *et al.*, 2010). Sous des conditions physiologiques normales, la composition en acides biliaires de la bile est de 70 % d'acide cholique et ses dérivés et les 30 % restants consistent en l'acide chénodésoxycholique. La conjugaison des acides biliaires avec la taurine ou la glycine après leur synthèse augmente leur solubilité. Le rôle des acides biliaires est de faciliter la digestion et l'absorption des lipides. La micellisation des lipides les rend plus accessibles aux enzymes digestives dans le duodénum. Par la suite, ces micelles de lipides très hydrophobes provenant de la digestion atteignent le jéjunum et ont besoin de la présence des acides biliaires qui favorisent leur solubilisation en diminuant leur hydrophobicité. Les micelles peuvent alors traverser la fine interface aqueuse à la surface des entérocytes et être absorbées par ceux-ci (Yamada, 2009).

Le processus de recyclage des acides biliaires qui implique le foie et l'intestin se nomme circulation entérohépatique des acides biliaires et FXR y joue un rôle majeur (Figure 5). Au niveau du foie, les acides biliaires sont produits à partir du cholestérol grâce aux enzymes CYP7A1 et CYP8B1 (CYP8B1 permet plus spécifiquement le maintien du ratio CA : CDCA). Ces acides biliaires sont alors conjugués par l'action des enzymes BACS et BAAT, dont l'expression est régulée positivement par FXR, la conjugaison étant donc régulée par la production des acides biliaires. Une régulation négative par les acides biliaires de leur propre synthèse se produit dans le foie, et ce, indirectement via FXR. En effet, l'activation de FXR mène à la synthèse du récepteur nucléaire atypique SHP.



**Figure 5. La circulation entérohépatique des acides biliaires et l'activité de FXR dans le foie et l'intestin**

Au niveau du foie FXR inhibe la synthèse des acides biliaires en diminuant l'expression de CYP7A1 et CYP8B1 via l'induction de l'expression du facteur de transcription SHP. FXR favorise également la conjugaison des acides biliaires par l'induction de l'expression de BACS et BAAT. La sécrétion de ces acides biliaires conjugués est contrôlée par des transporteurs de type ABC tels MDR3, MRP2 et BSEP, qui sont des gènes cibles de FXR. En atteignant l'iléon distal, les acides biliaires sont réabsorbés par ASBT à l'apex des entérocytes. Le transporteur cytosolique FABP6 séquestre alors les acides biliaires et les envoie au niveau du transporteur basolatéral OST $\alpha/\beta$  pour que ceux-ci retournent au foie via la veine porte, où un mécanisme de régulation négative de la production des acides biliaires est déjà entamé par FGF19. Adaptée de Modica *et al.*, 2010.

SHP s'hétérodimérise sur les promoteurs de CYP7A1 et CYP8B1 et ce respectivement avec les facteurs LRH-1 (Goodwin *et al.*, 2000) et HNF4 $\alpha$  (Zhang et Chiang, 2001). Étant donnée l'absence de domaine de liaison à l'ADN pour la protéine SHP, l'hétérodimère est non-fonctionnel et cela mène à une diminution de l'activité transcriptionnelle sur ces promoteurs et donc ultimement, à la diminution de la synthèse des acides biliaires. Cette boucle de rétroaction négative permet un contrôle de la synthèse hépatique des acides biliaires. De plus, l'activation de FXR au niveau du foie permet aussi la régulation positive de l'expression des transporteurs MDR3, MRP2 et BSEP, localisés dans les cellules des canaux biliaires, évitant ainsi l'accumulation des acides biliaires dans le foie en favorisant leur concentration dans la vésicule biliaire et leur excrétion vers le duodénum.

Au niveau du segment iléal distal de l'intestin, les acides biliaires sont absorbés par les entérocytes grâce au transporteur apical ASBT. De manière générale, 95 % des acides biliaires sont absorbés, le reste étant éliminé. La perte est compensée par le foie qui synthétise les 5 % non réabsorbés. L'entrée active des acides biliaires au niveau des entérocytes est négativement contrôlée par FXR via le récepteur nucléaire SHP. En effet, par un mécanisme similaire à ce qui est présent dans le foie, SHP inhibe l'action de l'hétérodimère RAR/RXR au niveau du promoteur de ASBT chez l'humain, inhibant ainsi l'absorption active des acides biliaires au niveau iléal (Neimark *et al.*, 2004). À l'intérieur des entérocytes, la protéine FABP6 agit comme transporteur des acides biliaires en les séquestrant, alors qu'ils seraient toxiques si libre dans le cytosol, et en les transportant du côté apical vers le côté basal de la cellule. Le mécanisme exacte du transport est encore mal compris, mais on sait que FABP6 interagit de façon transitoire avec ASBT (Kramer *et al.*, 1995). La liaison des acides biliaires à FABP6 est faite par leur noyau stéroïdien profondément lié dans le creux de la protéine. La chaîne de charge négative des acides biliaires est quant à elle liée près de l'entrée de ce creux (Kramer *et al.*, 2001). Au niveau basal des cellules, le transporteur OST $\alpha/\beta$  permet le passage des acides biliaires des entérocytes à la veine porte où ceux-ci seront réacheminés vers le foie. Les gènes FABP6 et OST $\alpha/\beta$  sont des cibles transcriptionnelles directes de FXR et sont fréquemment utilisés pour la validation de l'activité transcriptionnelle de celui-ci. Au niveau de l'intestin, l'activation de FXR mène également à la régulation négative de la production des acides

biliaires au niveau du foie. Cette régulation est possible grâce à la production de FGF19 au niveau de l'intestin. L'activation de FXR amène une augmentation de la transcription et de la sécrétion du facteur de croissance FGF19 qui est transporté par la veine porte jusqu'au niveau du foie. La liaison subséquente de FGF19 au récepteur tyrosine kinase transmembranaire hépatique FGFR4 mène à l'activation de la voie JNK et à la répression des gènes CYP7A1 et CYP8B1, ce qui diminue la synthèse des acides biliaires. La production des acides biliaires est un processus finement régulé au niveau du foie et le maintien de l'homéostasie de la production de ces acides biliaires est possible en partie par la signalisation entérohépatique contrôlée par le récepteur nucléaire FXR (Lee *et al.*, 2006); (Modica *et al.*, 2010).

## 5.2. Fonctions de FXR spécifiques à l'intestin

Beaucoup d'études non abordées ici se penchent sur des rôles physiologiques de FXR qui sont spécifiques au niveau du foie tels le maintien de l'homéostasie cholestérol-triglycérides et la régulation du métabolisme du glucose (Modica *et al.*, 2010). De plus, au niveau de l'intestin, FXR aurait des rôles qui pourraient être essentiels et spécifiques à cet organe. Puisque ce mémoire concerne l'étude de FXR en contexte intestinal, les fonctions principales de FXR dans l'intestin, autres que de contribuer à la circulation entérohépatique des acides biliaires, sont présentées.

### 5.2.1. Régulation de la défense antibactérienne dans l'intestin par FXR

De manière générale, il est connu que les acides biliaires amènent un effet protecteur en contrant la prolifération bactérienne au niveau de l'intestin (Hofmann et Eckmann, 2006). Les propriétés de détergent des acides biliaires seraient en grande partie responsables de cet effet, mais un contrôle plus précis serait fait par l'activation de FXR à l'iléon distal. En effet, il a été montré dans une étude chez la souris que l'activation de FXR par un agoniste synthétique, le GW 4064, apporte un effet protecteur contre la surpopulation bactérienne (Inagaki *et al.*, 2006). Dans cette étude, des souris ayant subi une ligature du cholédoque voient la prolifération et la translocation bactérienne intestinale

associée à cette opération disparaître lorsqu'elles sont traitées avec le GW 4064. Par des résultats de micro-puce à ADN, il a été montré que l'activation de FXR par son ligand mène à la régulation positive de cibles ayant des propriétés antibactériennes reconnues telles l'angiogénine (ANG1), l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS), l'anhydrase carbonique 12 (CAR12) et l'interleukine 18 (IL18). Cette étude ne montre cependant pas que l'augmentation du transcrite de ces cibles est le résultat transcriptionnel direct de l'action de FXR dans les entérocytes. Cette augmentation pourrait résulter de cascades plus complexes impliquant FXR ou être le résultat de l'activation de FXR dans d'autres types cellulaires présents dans l'intestin. Par contre, une autre étude a montré que chez le rat et l'humain, FXR peut moduler directement l'expression de la protéine C3 du complément dans les entérocytes (modèle cellulaire Caco-2 pour l'humain). FXR peut se lier à un élément de réponse potentiel de type IR1 sur le promoteur du gène de la protéine C3, menant à l'augmentation de son expression. La protéine C3 du complément est connue comme ayant un rôle dans l'immunité innée, ce qui en fait une cible intéressante de FXR dans un contexte de lutte contre des pathogènes au niveau de l'intestin (Li *et al.*, 2005).

#### 5.2.2. FXR dans le contexte des maladies inflammatoires intestinales

Dans un modèle de souris présentant une colite induite par l'agent chimique DSS, une étude a été faite pour vérifier si l'activation de FXR pouvait contrer les effets néfastes de l'inflammation (Gadaleta *et al.*, 2011). Chez la souris traitée sept jours au DSS, le traitement avec un agoniste synthétique de FXR a résulté en une moins grande perméabilité intestinale *in vivo*, cet effet étant FXR dépendant puisqu'il n'était pas observé chez des souris déficientes pour l'expression de FXR. Les analyses histologiques ont aussi démontré une moindre colite induite par le DSS dans le groupe où FXR est activé. Le phénotype d'atténuation de l'inflammation observé suite à l'activation de FXR par son agoniste est explicable par son action dans deux types cellulaires où FXR est exprimé : dans les cellules immunitaires (Vavassori *et al.*, 2009) et dans les entérocytes.

Dans divers modèles de cellules immunitaires (lignées cellulaires immortalisées, PBMC, monocytes CD14 et cellules dendritiques dérivées de monocytes), l'activation de

FXR réduit l'expression de TNF $\alpha$  produit par ces cellules immunitaires (Vavassori *et al.*, 2009); (Gadaleta *et al.*, 2011). De plus, pour des cibles comme l'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et iNOS, FXR se lie au promoteur de ces gènes et stabilise le corépresseur NCoR au niveau des éléments de réponse au facteur NF- $\kappa$ B, menant à l'inhibition de leur transcription par NF- $\kappa$ B (Vavassori *et al.*, 2009).

Dans les entérocytes, l'inhibition de la production de cytokines comme TNF $\alpha$ , connue pour augmenter la perméabilité cellulaire en perturbant l'intégrité des jonctions serrées (Ma *et al.*, 2005), pourrait contribuer à l'action anti-inflammatoire de FXR. De plus, les entérocytes peuvent servir d'effecteurs de l'immunité par la sécrétion de cytokines et chimiokines (Kagnoff et Eckmann, 1997). Il a été montré que FXR inhibe l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B et la production de la cytokine proinflammatoire IL-1 $\beta$  et ce, dans la lignée cellulaire HT29 (Gadaleta *et al.*, 2011). Cette inhibition de production d'IL-1 $\beta$  qui se produirait dans une cellule d'origine intestinale (modèle cellulaire HT29) supporte la contribution d'une composante épithéliale à la réduction de l'inflammation observée chez les souris soumises au DSS et où FXR est activé. De plus, outre l'effet de FXR qui inhibe la production d'IL-1 $\beta$  dans les entérocytes, FXR pourrait avoir un effet direct sur l'intégrité de la muqueuse intestinale étant donné que lorsqu'il est activé au niveau d'une monocouche de cellules Caco-2 traitées au DSS, le détachement de cette monocouche est de beaucoup diminué comparé aux conditions où FXR n'est pas activé (Gadaleta *et al.*, 2011). Les mécanismes par lesquels FXR contribuerait au maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal sont encore imprécis, mais ce pourrait être par un effet transcriptionnel direct au niveau des entérocytes.

## **6. Liaison de FXR au niveau du promoteur de gènes de manière tissu spécifique**

Une étude à large échelle de localisation de sites occupés par FXR au niveau du génome de la souris dans l'intestin et le foie a été réalisée par technique d'immunoprécipitation de la chromatine couplée à du séquençage à haut débit (ChIP-seq) (Thomas *et al.*, 2010). Dans cette étude, les souris sont traitées avec l'agoniste de FXR, le GW 4064, afin de favoriser l'activation de la protéine FXR sur le promoteur de ces cibles.

Le CHIP-seq révèle un total de 6 345 sites potentiels de liaison à l'ADN spécifiques au foie et 3 872 spécifiques à l'intestin. Seulement 1 449 sites potentiels sont partagés au niveau des deux organes. Cette disparité montre que bien que FXR soit présent dans ces deux organes, il a la possibilité d'activer des cibles distinctes. Par exemple, le site de liaison pour FXR situé dans le promoteur de FABP6 est réellement occupé par FXR au niveau de l'intestin, alors que l'analyse CHIP-seq ne détecte pas d'occupation de FXR au niveau du foie pour ce même site (<http://genome.ucsc.edu>). Le gène FABP6 tel que mentionné plus tôt est une cible transcriptionnelle de FXR au niveau de l'intestin. L'identification de ces cibles peut suggérer des patrons de régulation transcriptionnelle qui sont spécifiques au tissu et donc des fonctions distinctes pour FXR dans ces tissus.

## 7. Mon projet de recherche

En prenant en considération les différents points déjà été présentés, à savoir que :

- 1) FXR est un récepteur nucléaire possédant quatre isoformes exprimés dans différents tissus, entre autres au niveau du foie (FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 2) et de l'intestin (FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4);
- 2) dans le foie, l'expression de FXR est régulée par différents facteurs tels HNF1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , HNF4 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ ;
- 3) au niveau de l'intestin, FXR est exprimé dans les villosités de l'iléon et sa fonction principale est la régulation de l'absorption des acides biliaires;
- 4) des études montrent des rôles pour FXR dans la défense antibactérienne et la préservation de l'intégrité épithéliale dans un modèle de colite;
- 5) une étude à large échelle de sites de liaison de FXR à l'ADN (ChIP-seq) montre une différence entre les cibles potentielles de FXR dans le foie comparativement à celles présentes dans l'intestin;

nous posons l'hypothèse de recherche suivante : L'expression d'isoformes de FXR enrichis dans l'intestin contribue au maintien d'un épithélium intestinal intègre et fonctionnel par l'activation de la transcription de gènes cibles affectant des processus biologiques additionnels à la régulation de l'absorption des acides biliaires.

Deux objectifs ont été fixés pour la réalisation de ce projet :

- 1) Étudier dans un modèle physiologique le rôle de FXR dans la régulation de fonctions intestinales non liées au métabolisme des acides biliaires, via l'identification de nouvelles cibles transcriptionnelles.
- 2) Étudier la régulation de l'expression différentielle des isoformes de FXR dans le contexte épithélial intestinal.

## II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Culture cellulaire

#### 1.1. Culture des cellules Caco-2/15

La lignée cellulaire Caco-2/15 est un clone de la lignée parentale Caco-2 (ATCC Numéro: HTB-37). L'origine de la lignée est un carcinome de côlon humain. Le clone Caco-2/15 a été produit et caractérisé par le passé (Beaulieu et Quaroni, 1991). Il présente la même propriété caractéristique que la lignée parentale, soit d'entamer un processus de différenciation entérocytaire à l'atteinte de la confluence. Dans notre laboratoire, les cellules Caco-2/15 ont été généreusement fournies par Dre Nathalie Rivard (Département d'anatomie et biologie cellulaire, Université de Sherbrooke, Qc, Canada). Les cellules Caco-2/15 sont cultivées dans du DMEM (Wisent), contenant 10 % de FBS (Wisent), 0,01 M d'HEPES (Wisent), 2 mM de L-glutamine (Gibco), 1 I.U./mL de pénicilline et 100 µg/mL streptomycine (Wisent), à 37 °C dans une atmosphère de 95 % air et 5 % CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est renouvelé aux deux jours et les passages sont effectués avant l'atteinte de la confluence avec des ratios allant de 1:4 à 1:6.

#### 1.2. Culture des cellules HEK 293T

La lignée cellulaire HEK 293T ou tout simplement 293T est une lignée fœtale de reins humains. Ces cellules possèdent une haute efficacité de transfection et dérivent de la lignée cellulaire parentale HEK 293 dans laquelle le gène codant pour l'antigène T du virus SV40 est ajouté. La présence de l'antigène T permet la réplication de plasmides possédant un promoteur SV40, et ce, à même les cellules transfectées. Ces cellules sont cultivées dans les mêmes conditions que pour les Caco-2/15 et sont divisées avec des ratios de 1:10 à 1:15 pour le maintien de la lignée en culture.

## **2. Traitement des cellules avec des agonistes**

### **2.1. Traitement avec le GW4064**

Le GW 4064 (Tocris Bioscience) est dissous dans du DMSO (Sigma-Aldrich) pour obtenir une solution mère concentrée de 100 mM. Cette solution mère est diluée et aliquotée en solution d'utilisation de 1 mM. Le traitement au GW 4064 est effectué sur les cellules Caco-2/15 lorsque celles-ci atteignent l'état de confluence désiré pour le traitement. Le milieu de culture est alors remplacé par du milieu contenant 10 % de FBS traité au charbon actif-dextran (Wisent) plutôt que le FBS utilisé pour la culture routinière. Puisque ce FBS est dépourvu d'hormones stéroïdiennes, cela limite les risques de réponses autres que par l'agoniste. Dans ce milieu, une concentration voulue de GW 4064 est préalablement ajoutée et les cellules sont laissées en culture avec ce milieu le temps désiré. Dans tous les cas, le traitement contrôle consistait à ajouter dans le milieu le même volume de DMSO que celui de la solution d'utilisation de 1 mM de GW 4064.

### **2.2. Traitement avec le 9cRA**

Le 9cRA (Sigma-Aldrich) est dissous dans du DMSO pour produire une solution mère de 25 mM. Le traitement avec le 9cRA est effectué sur les cellules Caco-2/15 lorsqu'elles atteignent l'état de confluence désiré pour le traitement. Le milieu de culture est alors changé par du milieu contenant 10 % de FBS traité au charbon actif-dextran. Dans ce milieu, on ajoute la quantité voulue de 9cRA et les cellules sont mises en culture le temps voulu.

## **3. Extraction de protéines**

L'extraction des protéines est réalisée avec du tampon de lyse Triton (1 % Triton X-100 (ICN Biomedicals), 50 mM Tris-HCl (Invitrogen) pH 7,5, 100 mM NaCl (Fisher), 5 mM EDTA (Fisher) pH 8,0, 40 mM  $\beta$ -glycérophosphate (Sigma-Aldrich), 50 mM NaF (Sigma-Aldrich), 200  $\mu$ M d'orthovanadate de sodium (Sigma-Aldrich), 5 % glycérol

(Fisher)) supplémenté d'inhibiteurs de protéases (aprotinine 0,5 mg/mL, utilisation 1:1000 (Roche Diagnostics), leupeptine 0,5 mg/mL, utilisation 1:1000 (Sigma-Aldrich), pepstatine 0,7 mg/mL, utilisation 1:1000 (Sigma-Aldrich) et PMSF 17,4 mg/mL, utilisation 1 :100 (Sigma-Aldrich)). Les protéines sont extraites dans des volumes allant de 100 à 200  $\mu$ L de tampon de lyse Triton selon la grosseur des culots de cellules. Suite à une incubation sous agitation à 4 °C pendant 5 à 10 minutes, un traitement-choc de 2 minutes d'incubation à l'azote liquide, 2 minutes d'incubation à 37 °C et 5 secondes de vortex à intensité moyenne est répété 10 fois afin d'avoir également une bonne lyse nucléaire. Les échantillons sont alors centrifugés à 13 500 rpm à 4 °C pendant 5 minutes pour culoter les débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines est alors récupéré et la concentration est dosée par la méthode de Bradford à l'aide de la trousse Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1 (Bio-Rad). Les extraits de protéines sont alors conservés à -80 °C jusqu'à leur utilisation en immunobuvardage de type Western.

#### **4. Immunobuvardage de type Western**

Les échantillons de protéines sont tout d'abord préparés en diluant 50  $\mu$ g de protéines pour un volume final de 45  $\mu$ L dans du Laemmli 2 X (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4,6 % SDS (Laboratoire MAT), 20 % glycérol, 0,01 % bleu de bromophénol (VWR), 5 %  $\beta$ -mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich)). La dénaturation des échantillons s'effectue par la suite en plaçant les échantillons 7 minutes dans de l'eau bouillante. Pour séparer les protéines selon leur poids moléculaire, celles-ci sont migrées sur un gel d'acrylamide avec le marqueur de poids moléculaire Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas). Les gels d'acrylamide sont utilisés à des concentrations optimales selon les poids moléculaires des protéines à séparer. Les gels ont majoritairement été effectués avec une concentration d'acrylamide de 10 % ou 15 %. Les gels de séparation (volume de 30 mL) sont préparés comme suit : 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 33 % (pour gel 10 %) et 50 % (pour gel 15 %) d'une solution d'acrylamide/Bis 30 % (Bio-Rad), 0,1 % SDS, 0,1 % persulfate d'ammonium (EMD Chemicals), 0,07 % TEMED (EMD Chemicals). Après une solidification d'au moins 1 heure, le gel de concentration (volume de 10 mL) est préparé comme suit : 375 mM Tris-HCl pH 6,8, 13,4 % (pour un gel de concentration de 4 %)

d'une solution d'acrylamide/Bis 30 %, 0,1 % SDS, 0,1 % persulfate d'ammonium, 0,1 % TEMED. Une fois les gels prêts et les échantillons chargés, la migration est effectuée à 10 mA (Power Source 300V, VWR) pour 16 heures durant la nuit dans un tampon de migration (25 mM Tris (Invitrogen), 190 mM glycine (Roche Diagnostics), 0,1 % SDS. Une fois les protéines séparées, celles-ci sont transférées sur une membrane de PVDF 0,45 µm (GE Healthcare) pendant 5 heures à 220 mA dans du tampon de transfert (25 mM Tris, 190 mM glycine, 10 % éthanol (Les Alcools de commerce)). Suite à cela, l'efficacité du transfert est visualisée grâce à une coloration au rouge de Ponceau 0,2 % (Sigma-Aldrich). Une fois décolorée, la membrane est alors incubée avec une solution de blocage (blotto) composée de 10 % de lait en poudre (Carnation, Nestlé) dilué dans du TBS/T (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 140 mM NaCl, 0,1 % Tween-20 (EMD Chemicals)). Suite à ce blocage, la membrane est incubée sous agitation toute la nuit à 4 °C dans l'anticorps primaire dilué dans du blotto (Tableau 1). Par la suite, le lendemain, 3 lavages de 10 minutes sous agitation sont effectués avec du TBS/T. Les membranes sont alors incubées 1 heure à TP avec l'anticorps secondaire approprié (Tableau 1) couplé à la peroxydase de raifort dilué dans du blotto. Suite à l'incubation, la membrane est lavée 3 fois pour 10 minutes sous agitation avec du TBS/T. Après ces lavages, le complexe protéine/anticorps est alors révélé par radiographie en utilisant le réactif Western Lightning® Plus-ECL (PerkinElmer) et les films radiographiques Biomax Light (Kodak) Le MIN-R Mammography Processor device (Kodak) est l'appareil utilisé pour révéler les films. L'analyse de l'expression des protéines est alors effectuée de manière semi-quantitative en utilisant le logiciel gratuit ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) pour la densitométrie des bandes d'intérêt.

## **5. Extraction d'ADN génomique**

Le culot des cellules récoltées est resuspendu dans 500 µL de tampon A (300 mM de sucrose (Sigma- Aldrich), 60 mM KCl (Fisher), 15 mM NaCl, 60 mM Tris-HCl pH 8, 0, 2 mM EDTA pH 8,0, 0,5 mM spermidine (Sigma-Aldrich), 0,15 mM spermine (Sigma-Aldrich)). Par la suite, 500 µL de tampon A avec NP-40 (Sigma-Aldrich) 1 % est ajouté et le tout est mélangé. Les tubes sont incubés 5 minutes sur glace puis centrifugés 15 minutes

**Tableau 1. Anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type Western**

	Protéine reconnue	Anticorps	Dilution	Espèce	Compagnie
Anticorps primaires	CLDN1	sc-22932	1 : 200	Mouton	Santa Cruz Biotechnology
	FXR	sc-13063	1 : 200	Lapin	Santa Cruz Biotechnology
	GAPDH	14C10	1 : 10 000	Lapin	Cell Signaling
	HA	sc-7392	1 : 500	Souris	Santa Cruz Biotechnology
	OCLN	sc-5562	1 : 200	Lapin	Santa Cruz Biotechnology
	VIL1	sc-28283	1 : 500	Lapin	Santa Cruz Biotechnology
	ZO-1	sc-10804	1 : 500	Lapin	Santa Cruz Biotechnology
	ZO-2	sc-11448	1 : 200	Lapin	Santa Cruz Biotechnology
	ZO-3	sc-11449	1 : 200	Lapin	Santa Cruz Biotechnology
Anticorps secondaires	IgG lapin (couplé HRP)	NA931V	1 : 5 000	Âne	GE Healthcare
	IgG souris (couplé HRP)	NA934V	1 : 5 000	Mouton	GE Healthcare

à 7 000 rpm à 4 °C. Le surnageant est retiré jusqu'au niveau du culot, 1 mL de Tampon A est ajouté et le tout est mélangé pour défaire le culot. Une centrifugation de 15 minutes à 7 000 rpm à 4 °C est alors effectuée puis le surnageant est retiré. Suite à ces extractions, les noyaux cellulaires obtenus sont resuspendus dans 1 volume ( $\approx 400 \mu\text{L}$ ) de tampon B (150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 7,8). Le même volume de tampon C (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM NaCl, 20 mM EDTA pH 7,8, 1 % SDS) est par la suite ajouté. À ce mélange, 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de protéinase K (Concentration stock de 10 mg/mL) (Roche Diagnostics) est ajouté puis le tout est incubé 3 heures à 37 °C. Par la suite 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNase A (Concentration stock à 5 mg/mL) (Roche Diagnostics) est ajoutée et incubé 1 heure à 37 °C. Suite à ces traitements, pour ce qui est de l'extraction d'ADN en tant que telle, un volume équivalent de phénol (Ambion) est ajouté au volume présent dans le tube et le tout est agité 5 minutes puis centrifugé 5 minutes à 13 500 rpm à 4 °C. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube, une seconde extraction au phénol peut être effectuée si nécessaire. Par la suite, un demi-volume de phénol est ajouté et le tout est agité manuellement pendant 5 minutes. À cela, un demi-volume de chloroforme (Fisher) est ajouté et le tout est agité manuellement 1 minute puis centrifugé 5 minutes à 13 500 rpm à 4 °C. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube puis, afin de faire précipiter l'ADN génomique, 0,2 M de NaCl est ajouté avec 2 à 2,5 volumes d'éthanol 100 % froid. Le flocon d'ADN est transféré dans un nouveau tube contenant de l'éthanol 70 % puis culotté via une centrifugation de 8 minutes à 13 500 rpm à 4 °C. L'éthanol est alors retiré et le culot est séché à l'air avant d'être resuspendu dans un volume approprié d'eau sans DNases, RNases et protéases. L'ADN est alors dosé avec un spectrophotomètre SmartSpec™ Plus (Bio-Rad) ou NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) et conservé à -20 °C.

## **6. Extraction d'ARN**

L'ARN est extrait avec la trousse ToTALLY™ RNA Kit d'Ambion (Cedarlane). Le culot de cellules récoltées est resuspendu dans un volume de 600  $\mu\text{L}$  de solution dénaturante (Ambion) et un volume (600  $\mu\text{L}$ ) de Phénol:Chloroforme:IAA (Ambion) est par la suite ajouté. Les échantillons sont par la suite vortexés à intensité moyenne pendant 1 minute puis incubés sur glace pendant 5 minutes. Les échantillons sont alors centrifugés à

13 500 rpm à 4 °C pendant 5 minutes. La phase aqueuse est par la suite prélevée et transférée dans un autre tube et un volume d'acétate de sodium (Ambion) correspondant à 10 % du volume initial est ajouté (60 µL). Après un léger mélange des tubes par inversion, un volume (600 µL) de Phénol:Chloroforme:Acide (Ambion) est ajouté puis les échantillons sont vortexés à intensité moyenne pendant 1 minute et incubés sur la glace pendant 5 minutes. Les échantillons sont alors centrifugés à 13 500 rpm à 4 °C pendant 5 minutes. La phase aqueuse est prélevée et transférée dans un nouveau tube dans lequel est ajouté un volume équivalent d'isopropanol (Fisher). Après mélange par inversion, la préparation est incubée à -80 °C pour un minimum de 30 minutes. Suivant une centrifugation de 15 minutes à 13 500 rpm à 4 °C, le surnageant est retiré et le culot d'ARN est lavé avec 300 µL d'éthanol 100 %. Le tout est à nouveau centrifugé 15 minutes à 13 500 rpm à 4 °C. L'éthanol est alors retiré et le culot séché quelques minutes à l'air avant d'être resuspendu dans un volume approprié (≈60 à 100 µL) de solution d'éluion (Ambion). L'ARN est alors dosé avec un spectrophotomètre SmartSpec™ Plus ou NanoDrop 2000 et conservé à -80 °C.

## **7. Réaction de transcription inverse de l'ARNm**

C'est une réaction de transcription inverse qui permet la synthèse d'ADNc (ADN complémentaire) à partir de 2 µg d'ARN préalablement extrait. La réaction est réalisée comme suit : 1 µg d'Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer 0,5 µg/µL (Fermentas) pour la liaison spécifique aux ARNm et 1 µL de dNTP 10 mM (Fermentas) sont ajoutés aux 2 µg d'ARN et le tout est complété à un volume total de 12 µL en utilisant de l'eau sans DNases, RNases et protéases (Wisent). Une incubation de 5 minutes à 65 °C est effectuée suivie d'une incubation de 5 minutes sur glace. Par la suite, un mélange contenant 4 µL d'AMV buffer 5X (Roche Diagnostics), 2 µL de DTT 0,1 M (Sigma-Aldrich) et 1 µL de RNaseOUT 40 U/µL (Invitrogen) est ajouté. Le mélange est alors incubé à 42 °C pour 2 minutes, puis 1 µL de RT AMV (Roche Diagnostics) est ajouté et l'incubation à 42 °C se poursuit pour 50 minutes. Comme dernière étape, les tubes sont incubés à 70 °C pour une durée de 15 minutes puis refroidis sur glace pour un minimum de 5 minutes. Le volume de 20 µL

d'ADNc est alors dilué avec de l'eau sans DNases, RNases et protéases pour obtenir un ratio de 1:10. L'ADNc dilué est alors conservé à -80 °C pour utilisations lors de PCR.

### 8. Analyses de PCR quantitatif en temps réel (qPCR)

Les analyses de qPCR sont effectuées avec l'appareil Mx3000P (Stratagene). Le pré requis aux analyses qPCR est en tout premier temps de caractériser les amorces utilisées. Cette caractérisation se fait par l'utilisation d'une courbe d'efficacité des amorces qui se traduit par une valeur d'efficacité de ladite paire d'amorces. Cette valeur doit se situer le plus près possible de 100 %. La courbe d'efficacité représente le niveau d'ADN amplifié par rapport à la quantité d'ADNc présente dans chacune des dilutions et celle-ci est réalisée en utilisant de l'ADNc de Caco-2/15 à 20 jours post-confluence diluée en série à 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 et 1:160. La courbe de dissociation est vérifiée pour s'assurer que les amorces ne produisent pas de dimères. Les produits PCR sont migrés sur gel d'agarose 2 % (EMD Chemicals) pour s'assurer que c'est bien le produit avec la bonne longueur qui est amplifiée. Une fois l'efficacité des amorces confirmée, il est possible d'analyser l'expression de gènes en comparant les conditions traitées aux conditions contrôles. L'expression du gène d'intérêt est alors normalisée grâce à l'expression du gène de référence utilisé. Le ratio d'expression relatif est calculé avec l'efficacité (E) et le cycle seuil (Ct) selon l'équation suivante :

$$Ratio = \frac{(E_{\text{gène d'intérêt}})^{\Delta Ct_{\text{gène d'intérêt}}(\text{contrôle-traité})}}{(E_{\text{référence}})^{\Delta Ct_{\text{référence}}(\text{contrôle-traité})}}$$

(Pfaffl, 2001). Le mélange réactionnel pour un échantillon est composé de 10 µL de Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), de 1 µL de l'amorce sens et de 1 µL de l'anti-sens (IDT) (Tableau 2). À cela est ajouté 0,38 µL du colorant de référence ROX (solution mère diluée 1:500 dans de l'eau) (Agilent Technologies) et le tout est complété par 5,63 µL d'eau sans DNases, RNases et protéases pour un volume final de 18 µL. Ce mélange est multiplié selon le nombre d'échantillons à analyser et est distribué dans des microtubes de plastique pour qPCR (Agilent Technologies). Par la suite, 2 µL d'ADNc est distribué dans les tubes destinés aux échantillons tandis que 2 µL d'eau sans DNases, RNases et protéases est ajouté au tube qui sert de contrôle négatif sans ADNc. Suite à une brève centrifugation des tubes, ceux-ci sont

Tableau 2. Amorces utilisées pour les qPCR

Amorces				Taille du produit PCR
Symbole	Nom	Sens	Antisens	(pb)
ABC1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	5'-CTTCAGGGTTTCACATTTGGC-3'	5'-GGTAGTC AATGCTCCAGTGG-3'	135
ACTB	Actin, beta	5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'	5'-CAGCGGAACCGCTCATGCCC AATGG-3'	295
AGPAT2	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (lysophosphatidic acid acyltransferase, beta)	5'-GGACGGTGGAGAACATGAG-3'	5'-GGTTGGAGACGATGACACAG-3'	129
AKR1B10	Aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)	5'-ACCTGTTCATCGTCAGCAAG-3'	5'-CATCCCCAGACTTGAATCCC-3'	147
ALDH1B1	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	5'-CCCAAGCGTGTATCTGAAC-3'	5'-ATGCTGGGTTCCAGAATGGG-3'	150
ALPI	Alkaline phosphatase intestinal	5'-GCCAACCCTCCAGACCATCG-3'	5'-CCACTCTACTGACTTTCCTG-3'	124
APOA4	Apolipoprotein A-IV	5'-ATGTTCTCTGAAGGCCCTGTG-3'	5'-TGGAAGAGGGCATTGAGTTG-3'	188
APOB	Apolipoprotein B	5'-TCATGTTCCTTAAAGCCGTG-3'	5'-GGACTCGCTGTTC TCAATG-3'	148
CAPRIN1	Cell cycle associated protein 1	5'-TGAGTGGACAGITGAAACGG-3'	5'-CCATAAGGCTTGTACTCGCTG-3'	149
CD9	CD9 molecule	5'-GGTTCCTCTTGGTGATATTCG-3'	5'-GGCTCATCTTGGTTTTCAG-3'	134
CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A	5'-TGTTGAAGAGACCAGAACCATC-3'	5'-GGGAAGATGCCAGGGATAAAG-3'	150
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	5'-CCTGGACGCTCGGCCCTGAAG-3'	5'-CATAAGCCGGGCTGTGGGG-3'	158
CHD9	Chromodomain helicase DNA binding protein 9	5'-ATGTGTCGGAGGGTTTGTG-3'	5'-CCTGTTCCTGACTTTCCTTAG-3'	136
CDKN1A (p21)	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	5'-TGTCCGTCAGAACCATG-3'	5'-TGGGAAGGTAGAGCTTGG-3'	218
CLDN1	Claudin 1	5'-TTGACTCTTGTGTAATCTGAG-3'	5'-TTCGCACTCATCGTCTTC-3'	145
CNNM3	Cyclin M3	5'-AGCACCATCACTCGTTTCTAC-3'	5'-TGTTCACCTTTCGACGATG-3'	124
CTNNA1	Catenin (cadherin-associated protein), alpha 1	5'-TTCGGAGTACATGGCAATG-3'	5'-CAGGAAAGAAATCTGAAACGTGG-3'	142
CUX1	Cut-like homeobox 1	5'-ACCTGAAAACCAATACGATGAAG-3'	5'-CGATGAGAGCTGTTCCTTAAG-3'	140
DBNDD2	Dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing 2	5'-TCTTCCATCGTGCCTC-3'	5'-TCTGGCTGTAAAATGTCCTCG-3'	135
DCAF6	DDB1 and CUL4 associated factor 6	5'-GATTGTATCTGCTCTGGAGATG-3'	5'-GAAAAGTGAAGGGTCAATTGGG-3'	143
DEPTOR	DEP domain containing MTOR-interacting protein	5'-TTAGAAAGGATGACGGCACC-3'	5'-CTCATACTGACCCCTTCTC-3'	137
DGKD	Diacylglycerol kinase, delta	5'-GTCTTCGACCTCATGAACCGG-3'	5'-TTATGAAGTTGAGGCTGTCG-3'	140
DST	Dystonin	5'-GAAACAGAGCAAAATGGACGAG-3'	5'-TTCGGCTTTCACCTGGAG-3'	134
FABP6	Fatty acid binding protein 6, ileal	5'-TCAC TTGGTCCAGCACTA-3'	5'-CTTGTCAACCACGATCTCT-3'	182
FASN	Fatty acid synthase	5'-CAAGCTGAAGGACCTGTCTAG-3'	5'-CGGAGTGAATCTGGGTTGATG-3'	147
FAT2	FAT tumor suppressor homolog 2	5'-GTCAATGCTGAGGTCCACTAC-3'	5'-CTGCTTCTACTGTCAGAGTATG-3'	142
FGD4	Frabin	5'-ACATGACAGAACGTATTTCCC-3'	5'-CTTAAGGAGCATCTCATACCGG-3'	137
FGF19	Fibroblast growth factor 19	5'-CATTTGGGCTGTGACCCG-3'	5'-GTGGACTCAGGACTGTTC TTG-3'	149
FLAD1	Flavin adenine dinucleotide synthetase	5'-CTCTGCACTCTTTCATG-3'	5'-TCCTGTAGAACTGTTC CAGC-3'	119
FOXA1	Forkhead box A1	5'-AGGGCTGGATGGTTGATTTG-3'	5'-TGAGTTCATGTTGCTGACCG-3'	145
GANC	Glucohydrolase, alpha, neutral C	5'-TCTGTCTTACCATGCACACG-3'	5'-GTGGCTTTTGGTCTGTGAC-3'	150
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5'-ACATCGCTCAGACACCATGG-3'	5'-GTAGTTGAGGTC AATGAAGGG-3'	142
GAS7	Growth arrest-specific 7	5'-AGAATCTTTGGCTTTCACAG-3'	5'-AGCTTGGCAGAGAACTTGAAG-3'	109
GDI2	GDP dissociation inhibitor 2	5'-AGACTTGGGAACAGAAAGCC-3'	5'-GCGCTTCAATTTCTCAAAAGT-3'	139
GOLGA2	Golgin A2	5'-GTTAGAGATGACGGAACCTCTG-3'	5'-CTAACCGACTCCATTACCTGC-3'	138
GSN	Gelsolin	5'-GTCTTACCTTTCAGCCATATC-3'	5'-TGTTGGAACCTTGATTCTCC-3'	149
GUCY2C	Guanylate cyclase 2C (heat stable enterotoxin receptor)	5'-GGTGTCTCTGTATACCTCTGTG-3'	5'-CCCCGGCTGTAAATATCATTAG-3'	147
HSPB1	Heat shock 27kDa protein 1	5'-ATGTCAACCACCTTCGCC-3'	5'-GTGAAGCACC GGGAGATG-3'	118
IFIH1	Interferon induced with helicase C domain 1	5'-TTGATGGTCTC AAGTGAAG-3'	5'-CTTCTGCCAAACTTGTGTCTG-3'	150
ITGAV	Integrin, alpha V	5'-GGCATAGATGACTTGTGTTTCCAGG-3'	5'-TGGCAGCTACAGAAAATCCG-3'	145
LAMB2	Laminin, beta 2 (laminin 5)	5'-GCTGCCCTTAGAGCCCAAGG-3'	5'-GGGCACCTTCCCTGTCCGT-3'	236
LCOR	Ligand dependent nuclear receptor corepressor	5'-ACTCACCTCTGGACCTTACTG-3'	5'-GCCCGTTCCTTGAGTAC-3'	150
LEPR	Leptin receptor	5'-TCAACCAGTACAATCCAGTAC-3'	5'-TTTGGGCTCAGATATGGGATG-3'	111
LIPA	Lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase	5'-TGGTTTTCAGCTGTGGATGG-3'	5'-TGAAGTTAATGGAAGCTGGTAGG-3'	143
LPIN3	Lipin 3	5'-GGAGAAGTGGTAGACATTGAG-3'	5'-CAAGGGATGGGTGAGGTG-3'	147
LRP1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1	5'-TCTTACAGCGACATCCATTTG-3'	5'-TGTCGTGTAGCTTGTCCCAATAG-3'	146
MEP1A	Meprin A, alpha (PABA peptide hydrolase)	5'-GATGTTCCTGTCCTAAGTCTG-3'	5'-GGCC AATGAAATGTCTGTCT-3'	134
MOGAT2	Monoacylglycerol O-acyltransferase 2	5'-GACTATTTCCTCATCTCGCTG-3'	5'-AAGATCGAAGAGAAGCCGTGTG-3'	143
MSLN	Mesothelin	5'-CTTCGTGAAGATCCAGTCTTTC-3'	5'-CCTCAGCCACAGTCAACG-3'	140
MTTP	Microsomal triglyceride transfer protein	5'-TCAGAAACTTCTCGCCCTTC-3'	5'-AATGGCTTCTAATGAGTCTGAGG-3'	149
MUC13	Mucine 13	5'-AGGAAGATGCTAATGGAACTG-3'	5'-GAATGACATGCCAGCGATG-3'	117

MYCBP	Myc binding protein	5'-GCTGTC ACTATGGCCATTAC-3'	5'-AGC ACTGTAGGTTTC TGG-3'	141
MYO1A	Myosin 1A	5'-TTTTGTGAGAGGGTGAAGG-3'	5'-TC TAAGACGTTTGTGGATGGC-3'	150
MYO5B	Myosin VB	5'-ACC ACATCTTTTACCAGCTCG-3'	5'-TTC TCAAGTCC TCAAGCATCG-3'	145
MYO7A	Myosin 7A	5'-AC AAAGCCATCACCACAG-3'	5'-GC ATAGCCCGTAGTTCTT-3'	150
MYO7B	Myosin VIIIB	5'-AGACAAGACTGGAAAGCG-3'	5'-AAGGACTTTC TGGATGCTGAG-3'	121
NAPA	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha	5'-GCCATTGAC ATCTACGAACAGG-3'	5'-TCC TCACTATTTTGGACAGCC-3'	149
NCOA7	Nuclear receptor coactivator 7	5'-GGAAATC GGCATC ACTAGACAG-3'	5'-AATGAGGGCTGAATGTGTAGAG-3'	150
NOSTRIN	Nitric oxide synthase trafficker	5'-CTGAGAAGGAGAAGCGAAAG-3'	5'-CTGGTAGCAGTCTCTAGTGTG-3'	146
NPHP1	Nephrocystin 1	5'-AGCTCATGCC TTCACAACTG-3'	5'-AACCTGTATGCTC ATTCTGG-3'	146
NPNT	Nephroectin	5'-ATAGCCAGGATAAGGTGCCAGCT-3'	5'-GGGGCTTACAGCCACACTCATT-3'	148
NR0B2 (SHP)	Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	5'-GCTGTCTGGAGTCTTCTGG-3'	5'-GAATGGACTTGAGGGTGGAG-3'	231
NR1H4 (FXR)	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	5'-CGCGTC AGCAGGGAGGATCA-3'	5'-CCATCACACAGTTC CCCCCG-3'	170
NR1I2 (PXR)	Nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2	5'-CGCCATTACTCTGAAGTCTTAC-3'	5'-GGGTGTATGCTCTGGATGC-3'	150
NRIP1	Nuclear receptor interacting protein 1	5'-GGGAAGTGTTTGGATTGTGAG-3'	5'-AAAGTAGCTTGATGTCATCCG-3'	145
OCN	Occludin	5'-AAGCAAGTGAAGGGATCTGC-3'	5'-GGGGTATGCTCC AAAGTC A-3'	204
OSGIN1	Oxidative stress induced growth inhibitor 1	5'-CATGGTATCTGAGCCAAAG-3'	5'-ACGTAGTCCCTGTAGTAGTGG-3'	138
PLEKHG6	Pleckstrin homology domain containing family G (with RhoGef domain) member 6	5'-TTTTGGGATGAGGTGTGG-3'	5'-CATGGTCTCTTCACTCGG-3'	150
PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	5'-GCTATCATTCAGGAGTCCACG-3'	5'-TCGC ACTTGTCATACACCAG-3'	88
PPARGC1A (PGC-1α)	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	5'-AGCAGCAGAGAGGGAACTTTG-3'	5'-CAGCCATCAAGAAAGGACACA-3'	128
PPRC1 (PRC)	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator-related 1	5'-CTTCTCTATCTCATCATCCA-3'	5'-CCTCTGTTTCACTCTGATCG-3'	215
PYY	Peptide YY	5'-AGCGGTATGGGAAAGAGAC-3'	5'-CGTGGTGGCAGATCTCC-3'	147
RBM15	RNA binding motif protein 15	5'-TCATGATCATTGTCCGTGGG-3'	5'-CCGCTGTCAACCAGTTTGG-3'	149
RBP2	Retinol binding protein 2, cellular	5'-ACAACCCCTCACCGAAC-3'	5'-AGTGAGAGCTACTGCAATCTTG-3'	145
ROCK1	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	5'-AGAGAAGGCTGAAATTCGGG-3'	5'-TCCAGTTGCAAGGTTAGATT-3'	150
RWDD3	RWD domain containing 3	5'-GCCGC GATTTTCTGCAG-3'	5'-TCCGCATCCATAAATCTTTCAG-3'	107
SDC1	Syndecan 1	5'-GAAGATCAAGATGGCTCTGGG-3'	5'-GTTCTGGAGACGTGGGAATAG-3'	145
SEC31A	SEC31 homolog A	5'-TCGCCAGGATGAAGTTAAAGG-3'	5'-TCTCAAGGGAAGCATTCGTAC-3'	141
SI	Sucrase-isomaltase (alpha-glucosidase)	5'-GAGGACACTGGCTGGAGAC-3'	5'-ATCCAGCGGTACAGAGATG-3'	157
SLC20A1	Solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1	5'-GCCTGCACAGTTGGAATAAAC-3'	5'-GGGACATACAAAGAACCAGACG-3'	150
SLC26A3	Solute carrier family 26, member 3	5'-TCGTGCTGATGTGCTTCTAG-3'	5'-AATCATATTTGCTCTTCGCCAC-3'	147
SLC35D1	Solute carrier family 35 (UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine dual transporter), member D1	5'-CTCTGACTTGGCATTTGATCTG-3'	5'-AGAGCAGTCCATATTTCCAG-3'	128
SLC9A8	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 8	5'-TGTTGCAATTTCTGGCCCTG-3'	5'-GGAGGTAGGAAAGAGGGAAAATG-3'	126
SNX17	Sorting nexin 1	5'-TTCCATTTCCGAAACCAGAG-3'	5'-CCATACTCTTCCGAAGCTG-3'	147
SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	5'-CCTGGAACCTCACATCAACG-3'	5'-GCTATCTGGGCTGTAACTCTC-3'	138
SOX12	SRY (sex determining region Y)-box 12	5'-CTAGCATCCAGACCTGG-3'	5'-GCCCAATACCTGATTCCTG-3'	100
TGIF2	TGFB-induced factor homeobox 2	5'-CACCGCTACAACGCCTAC-3'	5'-TCTTTGCCATCTTCCGAAG-3'	143
TJP1 (ZO-1)	Tight junction protein 1 (zona occludens 1)	5'-TGCTGAGTCTTTGGTGTAG-3'	5'-AATTTGGATCTCGGGAAGAC-3'	123
TJP2 (ZO-2)	Tight junction protein 2 (zona occludens 2)	5'-GCTTATGAGAGGGTTTTGCTG-3'	5'-CCTGCATCTTTGGTTCG-3'	146
TJP3 (ZO-3)	Tight junction protein 3 (zona occludens 3)	5'-TGAAGTCAGTCTGGTGAAG-3'	5'-CCCCTGATCTGTAGAATGAG-3'	150
TLE3	Transducin-like enhancer of split 3	5'-GAATAACTCTGTGTCACCCCTCG-3'	5'-CACTCTTGCTCTCATCATGTC-3'	143
TLR3	Toll-like receptor 3	5'-TCAACTTCTGATAAAACCTTTGCC-3'	5'-AGATGACAAGCCATATGAGACA-3'	148
TREH	Trehalase (brush-border membrane glycoprotein)	5'-GATTCAGATGCCAAACTGCG-3'	5'-GCACAATGAAGGGATGTTCTG-3'	140
USP9X	Ubiquitin specific peptidase 9, X-linked	5'-AGATCACCTGTGCTGAAG-3'	5'-GACGAAGGAGAATACAAATGC-3'	149
UTRN	Utrophin	5'-GTGAATGTCTTGTGGATGC-3'	5'-TCTGCTGTTTCCGTC AATG-3'	148
VAV3	Vav 3 guanine nucleotide exchange factor	5'-ACAAGGAGCCAGAACATTCAG-3'	5'-TTGCACAGAATCATACCGAG-3'	108
VCL	Vinculin	5'-AACCAAGGCATAGAGGAAQC-3'	5'-TCTCTTCAATGGCTTCAAGTTC-3'	147
VIL1	Villin 1	5'-AGCTGCATCTACACCACAC-3'	5'-ACCTTCCAGCTACACAGTT-3'	228
ZNF148	Zinc finger protein 148	5'-AACAAATCAGAGACCAGTAGAC-3'	5'-CATTGCAGTCTCAAAACG-3'	138
ZNF292	Zinc finger protein 292	5'-GTGAAAATGTAGCTTGGTTCG-3'	5'-GCCATTTCCATCAGCTTTTC-3'	146

La concentration d'utilisation des amorces est de 10 ng/μL.

installés dans l'appareil. Les conditions d'amplification sont comme suit : 1 cycle de dénaturation initiale à 95 °C pour 10 minutes et 40 cycles de plateaux successifs de 95 °C pour 30 secondes; 60 °C pour 20 secondes et 72 °C pour 30 secondes. Après ces 40 cycles, une courbe de dissociation est incorporée selon les conditions suivantes : 95 °C pour 1 minute, 60 °C pour 30 secondes et augmentation graduelle de la température jusqu'à la maintenir à 95 °C pour 30 secondes. Les calculs sont effectués par la suite avec les valeurs de Ct obtenues.

## **9. Analyse d'expression génique par micro-puces à ADN**

### **9.1. Design expérimental**

Les cellules Caco-2/15 sont cultivées jusqu'à 20 jours post-confluence puis traitées avec le GW 4064 tel que décrit précédemment. Trois répliquas de cellules Caco-2/15 traitées 24 heures au GW 4064 1 µM sont alors comparés à trois répliquas de cellules Caco-2/15 traitées 24 heures au DMSO (contrôle). L'ARN extrait de ces conditions est utilisé pour des analyses sur des micro-puces de type Human Gene 1.0 ST de la compagnie Affymetrix, effectuées au centre d'Innovation Génome Québec de l'Université McGill.

### **9.2. Extraction d'ARN pour la micro-puce à ADN**

L'extraction d'ARN pour la micro-puce est effectuée de la même manière que l'extraction normale, sauf qu'une étape de purification de l'ARN sur colonne est effectuée avec le RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen). L'ARN extrait préalablement avec le ToTALLY™ RNA Kit d'Ambion est resuspendu dans 100 µL d'eau sans DNases, RNases et protéases. L'ARN est dilué par l'ajout de 350 µL de tampon RLT (Qiagen) et 250 µL d'éthanol 100 %. Le tout est bien mélangé par inversion puis transféré dans une colonne RNeasy (Qiagen). Les colonnes sont centrifugées à TP 15 secondes à 10 000 rpm et l'éluat est par la suite jeté. Par la suite, 80 µL de DNase 1 (mélange de 10 µL de DNase I (Qiagen) avec 70 µL de tampon RDD (Qiagen)) est ajouté à chaque colonne et celles-ci sont incubées 15 minutes à 35 °C. Par la suite, 350 µL de tampon RW1(Qiagen) est ajouté aux colonnes

et une centrifugation de 15 secondes 10 000 rpm à TP est effectuée. Une fois l'éluat jeté, 500 µL de tampon RPE (Qiagen) est ajouté à la colonne le tout suivit d'une centrifugation de 15 secondes 10 000 rpm à TP. Un dernier lavage avec 500 µL de tampon RPE est effectué en centrifugeant 2 minutes 10 000 rpm à TP. La colonne est par la suite centrifugée à sec à vitesse maximale pendant 1 minute. Une fois cette dernière centrifugation effectuée, la colonne est placée dans un nouveau tube et on y ajoute 30 µL d'eau sans DNases, RNases et protéases. Suite à une incubation de 1 minute à TP, les colonnes sont centrifugées 1 minute 10 000 rpm à TP pour éluer l'ARN. Le volume d'ARN élué est par la suite replacé sur la colonne et élué à nouveau pour concentrer l'ARN. Finalement, l'ARN est dosé avec un spectrophotomètre SmartSpec™ Plus et conservé à -80 °C avant d'être envoyé au centre d'Innovation Génome Québec.

### 9.3. Détermination des gènes modulés avec le logiciel FlexArray

Le logiciel FlexArray (Blazejczyk *et al.*, 2007) est utilisé pour analyser les données brutes de la micro-puce. Les fichiers .CEL sont en premier lieu groupés selon le design expérimental (traitement au DMSO et traitement au GW 4064). Les données brutes sont alors traitées sous l'algorithme APT (Affymetrix Power Tools). Les fichiers requis sont le HuGene-1\_0-st-v1.r4.pgf (Probe Group File), le HuGene-1\_0-st-v1.r4.clf (CEL Layout File) et le HuGene-1\_0-st-v1.r4.all.ps (Probeset List File). La méthode de normalisation choisie est la RMA (Robust Multichip Average) et le fichier HuGene-1\_0-st-v1.r4.bgp est utilisé comme fichier de sonde d'arrière-plan (Background Probe File). Une fois les données traitées à l'algorithme APT, un test de student avec variance égale est effectué en comparant les données des cellules traitées par rapport aux cellules contrôles. Les données sont alors annotées pour pouvoir associer des gènes aux sondes, et ce, avec le fichier HuGene-1\_0-st-v1.na30.1.hg19.probeset.csv. Une fois annotées, les données comme le nom du gène, l'induction (*fold change*) et la valeur p sont exportées et la liste de gènes modulés peut être faite selon les critères désirés. Les divers fichiers utilisés pour les analyses ont été obtenus de la compagnie Affymetrix.

#### 9.4. Formation de classes de gènes avec le logiciel ToppGene Suite

Le logiciel en ligne ToppGene Suite (<http://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>) est utilisé pour classer les gènes en classes fonctionnelles. Avant tout, la liste de gènes est faite avec ceux qui présentent une valeur  $p < 0,05$ . La liste à classer est alors entrée selon le format d'abréviation HGNC et analysée selon les paramètres de ToppGene suivant : Catégories : Processus Biologiques, Correction : Bonferroni, Limite de la valeur  $p$  : 0,01, Limite du nombre de gènes :  $1 \leq n \leq 1500$ . Pour terminer, les 10 classes régulées les plus significativement sont regroupées ensemble dans un tableau. Les codes d'identifications GO sont présents à titre d'annotations des processus biologiques et ce, dans l'optique du projet de l'ontologie de gènes qui est de standardiser la représentation de processus biologiques entre les espèces et les banques de données (<http://www.geneontology.org/>).

#### 10. Transfection transitoire des Caco-2/15

Les cellules Caco-2/15 sontensemencées dans des pétris 100 mm (Corning) avec une quantité de 3 000 000 de cellules par pétris afin d'être à 80 % de confluence le jour de la transfection, soit le lendemain. La transfection est effectuée avec la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, 10  $\mu\text{g}$  de vecteur d'expression (Tableau 3) est ajouté à 4,5 mL d'OPTI-MEM (Gibco). À ce milieu est ajouté un mélange de Lipofectamine 2000 équivalent au double de la quantité d'ADN transfecté et d'OPTI-MEM (20  $\mu\text{L}$  dans 480  $\mu\text{L}$ ) préalablement incubé 5 minutes à température pièce. Une fois les deux mélanges combinés pour un volume final de 5 mL, le tout est incubé 20 minutes à température pièce pour permettre la formation de liposomes. Par la suite le milieu de transfection est ajouté aux cellules préalablement lavées au PBS 1X. Après une incubation de 4 heures dans l'incubateur à cellules (37 °C à 5 % de  $\text{CO}_2$ ), le milieu est changé pour 10 mL de milieu de culture habituel et la transfection se poursuit pour un minimum de 48 heures.

**Tableau 3. Vecteurs d'expression et d'essais luciférase utilisés**

	Vecteur	Promoteur du vecteur	Protéine exprimée	Résistance
Pour l'expression de protéines	pLenti + hFXR HA	CMV	FXR humain couplé à l'étiquette HA	Ampicilline
	pcDNA/Cdx2	CMV	Cdx2 humain	Ampicilline
	pBAT Cdx3-HA	$\beta$ -globine (ajoutée au vecteur pBluescript KS <sup>+</sup> )	Homologue de Cdx2 chez le hamster couplé à l'étiquette HA	Ampicilline
	pLenti HNF1 $\alpha$	CMV	HNF1 $\alpha$ de rat	Ampicilline
	pBabe puro HNF4 $\alpha$	SV40	HNF4 $\alpha$ de rat	Ampicilline
Pour l'étude de promoteurs	pGL3-Basic+ FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2	FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2	Luciférase	Ampicilline
	pGL3-Basic+ FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4	FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4	Luciférase	Ampicilline
	phRL-SV40 Renilla	SV40	Rénilla synthétique (hRluc)	Ampicilline

Les cartes générales des vecteurs sont présentées dans la section annexe.

## 11. Production de lentivirus et infection de cellules

### 11.1. Production de lentivirus

La production de lentivirus est effectuée en transfectant à la Lipofectamine 2000 selon le protocole de transfection déjà établi, des vecteurs spécifiques à la production de lentivirus. Cette transfection s'effectue dans les cellules 293Tensemencées dans des pétris 100 mm. 10 µg de chacun des vecteurs pLP1, pLP2, pLP/VSVG ainsi que du vecteur pLenti permettant l'expression de la protéine d'intérêt (Tableau 3) sont ajoutés au mélange de transfection. Les vecteurs pLP1, pLP2 et pLP/VSVG permettent l'expression des protéines de structure et de réplication du virus alors que le vecteur pLenti présente la séquence codante du gène qui va être intégrée au génome des cellules via l'infection. Après 2 jours de transfection, le milieu de culture (6 mL) des pétris est filtré à l'aide d'un filtre 0,45 µm (Millipore) et aliquoté en échantillons de 1 mL dans des microtubes. Ces tubes contiennent alors les particules virales et sont congelés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

### 11.2. Infection de cellules

Du polybrène (concentration finale de 4 µg/µL) (Sigma-Aldrich) est ajouté au 1 mL de suspension virale avant son utilisation. Cela annule la présence de charges répulsives entre la surface de la cellule et les virus, permettant une optimisation de l'infection. Ce 1 mL de suspension virale est ajouté aux cellules à infecter desquelles le milieu a été préalablement retiré. Une incubation d'une heure s'en suit et par la suite 4 mL de milieu de culture DMEM 10 % FBS contenant du polybrène (concentration de 4 µg/µL) est ajouté. Les cellules en infection sont incubées pour 48 heures et par la suite elles sont sélectionnées avec l'utilisation de l'antibiotique blasticidine (Invitrogen). À titre d'exemple, pour des Caco-2/15 infectées, les cellules sont traitées à 8 mg/mL d'antibiotiques pendant 10 jours, et ce, avec passages. Une fois la sélection terminée, les cellules peuvent être utilisées.

## 12. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Pour l'immunoprécipitation de la chromatine, le traitement avec agoniste est préalablement effectué sur les cellules cultivées en pétri de 100 mm dans un volume final de 10 mL de milieu de culture. Le complexe ADN-protéine est fixé par l'ajout de 270  $\mu$ L de formaldéhyde 37 % (Fisher) pour une concentration finale de 1 %. Le tout est agité faiblement pendant 15 minutes à TP. Par la suite, 500  $\mu$ L de glycine 2,5 M est ajouté puis incubé 5 minutes pour cesser le processus de fixation causé par le formaldéhyde. Le milieu est retiré puis les cellules sont lavées deux fois avec 2 mL de PBS 1X froid contenant des inhibiteurs de protéases. Les cellules sont ensuite détachées du pétri avec 1 mL de PBS 1X froid contenant des inhibiteurs de protéases et le tout est placé sur glace dans un tube de 1,5 mL. Les tubes sont ensuite centrifugés 2 minutes à 5 000 rpm à 4 °C et le surnageant est jeté après cette centrifugation. Le culot est alors resuspendu dans 1 mL de tampon de lyse cellulaire à TP (5 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 85 mM KCl, 0,5 % NP-40 contenant des inhibiteurs de protéases : aprotinine 0,5 mg/mL, utilisation 1:1000, leupeptine 0,5 mg/mL, utilisation 1:1000, pepstatine 0,7 mg/mL, utilisation 1:1000 et PMSF 17,4 mg/mL, utilisation 1:100. Les tubes sont alors incubés 20 minutes à 4 °C sous agitation suivie d'une centrifugation 5 minutes à 2 000 rpm à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est alors retiré jusqu'au niveau du culot. Par la suite, le culot est lavé avec 500  $\mu$ L de PBS 1X froid contenant des inhibiteurs de protéases et centrifugé 5 minutes à 2 000 rpm. Le surnageant est alors retiré et un deuxième lavage est effectué. Suite aux lavages, le culot est resuspendu dans 400  $\mu$ L de tampon de lyse nucléaire (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 % SDS) contenant des inhibiteurs de protéases. Le tout est incubé 20 minutes à 4 °C sous agitation. Viens alors l'étape de sonication du lysat qui doit être faite selon des conditions préalablement déterminées pour obtenir des fragments d'ADN dont la taille se situe de 500 à 1000 pb (dans le cas des Caco-2/15 20 jours post-confluence, quatre sonications de 10 secondes sont suffisantes). Les lysats sont par la suite centrifugés 10 minutes à 13 000 rpm à 4 °C puis le surnageant est alors aliquoté en fraction de 200  $\mu$ L dans de nouveaux tubes de 2 mL. Les aliquots de surnageant sont alors dilués dix fois en ajoutant 1800  $\mu$ L de tampon de dilution pour ChIP (16,7 mM Tris-HCl, 1,2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 1,1 % Triton X-100, 0,01 % SDS) contenant des inhibiteurs de protéases.

Par la suite, 80  $\mu$ L de protéine A agarose / ADN de sperme de saumon (50 % slurry) (Millipore) est ajouté à chaque tube pour une étape de clarification qui consiste en une agitation 1 heure à 4 °C. Suite à cette incubation, l'agarose est culotté grâce à une centrifugation de 5 minutes à 2 000 rpm à 4 °C et le surnageant est transféré dans un nouveau tube de 2 mL. L'input est alors prélevé, soit 2  $\mu$ L (0,1 %) ou 20  $\mu$ L (1 %) et conservé à -80 °C pour être délié en même temps que les autres échantillons. Les tubes pour l'expérimentation sont alors préparés comme suit : 5  $\mu$ g d'anticorps (Tableau 4) sont ajoutés à la fraction pour l'immunoprécipitation de la protéine d'intérêt, 5  $\mu$ g d'IgG sont ajoutés à la fraction pour le contrôle et un tube sans ajout d'IgG est conservé dans le but d'être le contrôle avec l'agarose seul. Tous les tubes sont alors incubés sous agitation à 4 °C pendant la nuit. Le lendemain, 80  $\mu$ L de protéine A agarose / ADN de sperme de saumon (50 % slurry) est ajouté aux tubes et ceux-ci sont incubés sous agitation à 4 °C pendant 2 heures ce qui a pour effet de récolter le complexe anticorps-protéine-ADN. L'agarose est alors culotté par une centrifugation de 3 minutes à 6 000 rpm à 4 °C. Le surnageant est retiré en évitant de toucher à l'agarose. Par la suite, 1 mL de solution de lavage est ajouté et le tout est incubé 5 minutes sous agitation à 4 °C. Les tubes sont alors centrifugés 3 min à 6 000 rpm à 4 °C et le surnageant retiré. Ce lavage est refait une autre fois avec 1 mL de solution. Les solutions de lavage utilisées séquentiellement sont : le TSE-150 (0,1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl), le TSE-500 (0,1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl), le détergeant LiCl (1 % NP-40, 1 % désoxycholate de sodium (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 250 mM LiCl (Fisher)) et le TE (0,5 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl). Après les lavages, 200  $\mu$ L de tampon d'élution (100 mM NaHCO<sub>3</sub> (Fisher), 1 % SDS) fraîchement préparé est ajouté à chaque tube. Ces tubes sont alors incubés à 65 °C 20 minutes en vortexant toutes les 2 minutes pour une durée de 10 secondes à intensité moyenne. Les tubes sont alors centrifugés 1 minute à 13 000 rpm et le surnageant est transféré dans un nouveau tube. À ce moment, 10  $\mu$ L de NaCl 5 M est ajouté à chaque tube et ceux-ci sont vortexés quelques secondes à intensité moyenne. À cette étape, le volume de l'input est complété à 200  $\mu$ L avec le tampon d'élution en plus de 10  $\mu$ L de NaCl 5M. Les tubes sont alors incubés à 65 °C pendant la nuit. Le lendemain, les tubes sont vortexés quelques secondes, puis 2  $\mu$ L de RNase A, (Concentration stock de 5 mg/mL) est ajouté et

**Tableau 4. Anticorps utilisés pour les immunoprécipitations de la chromatine**

	Protéine descendue	Anticorps	Quantité (µg)	Espèce	Compagnie
Anticorps contre la protéine cible	FXR	sc-13063	5	Lapin	Santa Cruz Biotechnology
	HA	sc-7392	5	Souris	Santa Cruz Biotechnology
Anticorps contrôle	IgG de lapin	sc-2027	5	Lapin	Santa Cruz Biotechnology
	IgG de souris	12-371	5	Souris	Millipore

les tubes sont incubés 30 minutes à 37 °C. Par la suite, 2 µL de protéinase K (Concentration stock de 10 mg/mL) est ajoutés et chacun des tubes sont incubés 2 heures à 37 °C. Suite à ces traitements, les échantillons sont purifiés avec le QIAquick PCR Purification kit (Qiagen). La purification s'effectue selon les étapes suivantes : 5 volumes de tampon PB sont ajoutés à 1 volume d'ADN à purifier. Le mélange est ajouté à une colonne et centrifugé à 13 000 rpm pour 1 minute à TP, puis l'éluat est jeté. Ensuite, 750 µL de tampon PE est ajouté et les colonnes sont centrifugées à 13 000 rpm pour 1 minute à TP, puis l'éluat est jeté. Une centrifugation à sec est alors effectuée à 13 000 rpm pour 1 minute à TP. Les colonnes sont alors placées dans des tubes de 1,5 mL puis 30 µL de tampon EB est incubé dans chaque colonne 1 minute à TP. Le tout est centrifugé 13 000 rpm pour 1 minute à TP puis 20 µL de tampon EB est ajouté dans les colonnes et incubé 1 minute à TP. Une centrifugation finale de 13 000 rpm pour 1 minute à TP est faite et cela permet d'avoir un volume final de 50 µL d'ADN purifié. Les échantillons sont alors prêts pour la réaction de qPCR qui s'effectue en utilisant des amorces spécifiques aux régions étudiées (Tableau 5). Les résultats de qPCR sont alors analysés pour déterminer l'enrichissement. Brièvement, ces calculs consistent en l'enrichissement de l'immunoprécipitation dans la région d'intérêt comparé à l'enrichissement d'une région où la protéine cible ne se lie pas (région contrôle). Ces calculs sont effectués pour les conditions de CHIP utilisant un anticorps spécifique et un anticorps contrôle (IgG).

$$\Delta Ct (\text{Pour CHIP}) = Ct_{\substack{(Ac \text{ spécifique, IgG}) \\ \text{ou sans Ac}}} - Ct_{(Input)}$$

$$\text{Enrichissement} = \left( \left( \Delta Ct_{\substack{\text{Région} \\ \text{contrôle}}} \right) - \left( \Delta Ct_{\substack{\text{Région} \\ \text{d'intérêt}}} \right) \right)^{E_{\substack{(\text{Région d'intérêt} + \\ \text{Région contrôle})}}}$$

### 13. Résistance transépithéliale

Pour les études de résistance transépithéliale (TEER), les cellules Caco-2/15 sont ensemencées à une concentration de 70 000 cellules par puits dans des transwell de 12 mm de diamètre et de 0,4 µM de grosseur de pores (Corning). Il est alors possible de mesurer la résistance transépithéliale en mesurant aux moments désirés avec le volt-ohmmètre épithélial EVOM<sup>2</sup> (World Precision Instruments) équipé de l'électrode STX2 (World

**Tableau 5. Amorces utilisées pour les immunoprécipitations de la chromatine**

Élément de réponse cible et localisation	Amorces		Taille du produit PCR (pb)
	Sens	Antisens	
FXRE -71 pb, promoteur FABP6	5'-TCCTCAAACCCGTTGCCATC-3'	5'-ACCCCACTTCTTCTCCCTCC-3'	154
FXRE +3 321 pb, promoteur FGF19	5'-AGTAAACACACTGCAGGACG-3'	5'-TTAGCACAGGTACCTCGTCA-3'	93
FXRE +221 pb, gène MYO1A	5'-AATGTGACTGGTTGAGGGTG-3'	5'-CCAAGGACAGTGAAGTTATACCC-3'	141
FXRE +772 pb, gène MYO1A	5'-CTGTAAACTTCTGGCATGGAC-3'	5'-CCGGGTTCCAGAGATGCAATAG-3'	297
FXRE +1 868 pb, gène MYO7A	5'-CTCTTGAGAGGTTTCAGGCAG-3'	5'-TGGGTGACAAGGACAAGC-3'	89
FXRE +16 761 pb, gène MYO7A	5'-ACTGCCCTGGTTACACTTTG-3'	5'-ACCCCATTTAACAGTGACGAG-3'	165
FXRE -266 pb, promoteur DST	5'-AACTCAGATGCCTCACAGATG-3'	5'-AACATTACTGGGAGCGTGTC-3'	300
FXRE -48 299 pb, promoteur DST	5'-GCAAGGTGTAGCGGTGTATAT-3'	5'-GTTTTATGAGGGTTAGTGTGCG-3'	92
FXRE -1 277 et -1 374 pb, promoteur SLC20A1	5'-TGCCAGGATTACACTACGG-3'	5'-GCTGCCTGAGTCATTTATAGAG-3'	166
Cdx2 RE -38 pb, promoteur SI	5'-GATCAAGGAAAGCTGCTTAGG-3'	5'-AATAGTTCACAGCTTTGAGAAATCA-3'	217
Cdx2 RE -201 pb, promoteur FXRa3/a4	5'-ACCATTCTGCCACCTTTTG-3'	5'-TTAAGAACTTTTAGAGGGTGGG-3'	114
Région contrôle, chromosome 11 protéine hypothétique LOC25858	5'-GTGGCCACAGGTGTCGCTCAAGTCTTC-3'	5'-GGATGCAGTGCTTCTCCCCAGATT-3'	329

La concentration d'utilisation des amorces est de 10 ng/μL sauf pour les amorces de la région contrôle qui sont utilisées à 100 ng/μL.

Precision Instruments). Brièvement, la procédure est de laisser tempérer les cellules à température pièce pendant 30 minutes et par la suite on peut insérer l'électrode en position verticale sans toucher le fond du transwell (à environ 1 mm du fond). Le côté le plus court de l'électrode est en contact avec le milieu du compartiment apical et le côté le plus long avec le milieu du compartiment basal. Avec l'appareil placé sur l'option OHMS, il est possible de mesurer la résistance. Un transwell sans cellules avec du milieu de culture est utilisé comme blanc et cette valeur est soustraite à toutes les autres mesures. La mesure de résistance transépithéliale relative est calculée en comparant les mesures à une valeur qui est définie comme le niveau de base. Cette mesure est mise arbitrairement à 1 et il est ainsi possible de comparer les modulations de résistance transépithéliale relatives.

#### **14. Essais de blessures**

Ces essais ont été réalisés sur des cellules Caco-2/15 ayant atteint la confluence. Après avoir aspiré le milieu des cellules en cultures, jusqu'à 6 blessures sont effectuées sur la monocouche de cellules en cultures en pétris de 100 mm. Les blessures sont réalisées par une lame de rasoir taillée d'une largeur d'environ 3 mm, préalablement stérilisée dans l'éthanol 100 %, fixée à une pince-étau. La monocouche est alors rincée deux fois avec du PBS 1X et du milieu de culture DMEM sans FBS supplémenté avec 20 mM d'hydroxyurée (Sigma-Aldrich), afin d'inhiber la prolifération cellulaire. Ces cellules avec blessures sont alors soumises à divers traitements au GW 4064 et laissées en cultures à différents temps avec prise de photos toutes les 24 heures. Les résultats sont compilés en effectuant la moyenne de la distance parcourue par les cellules à partir de la marque causée par la blessure.

## 15. Constructions de plasmides des promoteurs de FXR couplés au vecteur rapporteur d'expression de la luciférase

### 15.1. Amplification et clonage de la région promotrice de FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 2

La région promotrice de FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 2 a été amplifiée par PCR à partir de 250 ng d'ADN génomique de Caco-2/15 extrait selon le protocole déjà détaillé en utilisant les amorces appropriées (Tableau 6). L'amplification est réalisée avec le thermocycleur MyCycler™ (Bio-Rad) en utilisant la Cloned Pfu DNA Polymerase (Stratagene). L'amplification est réalisée comme suit : 1 cycle de dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 minutes; 40 cycles comprenant une dénaturation de 1 minute à 95 °C, un appariement des amorces de 1 minute à 60 °C et une élongation de 4 minutes à 72 °C le tout se terminant avec une élongation finale de 10 minutes à 72 °C suivit du refroidissement de la réaction PCR jusqu'à 4 °C. Un produit PCR de 1 532 pb est obtenu suite à la migration sur gel d'agarose 1 %. Le produit amplifié est extrait de l'agarose en utilisant le QIAEX II® Gel Extraction Kit (Qiagen) selon le protocole du manufacturier.

Le promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 amplifié et purifié ainsi que le vecteur luciférase pGL3-Basic ont été digérés avec les enzymes de restriction BglII et HindIII avant d'être purifiés par migration sur gel d'agarose 1 % avec le QIAEX II® Gel Extraction Kit. Le promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 est inséré dans le vecteur pGL3-Basic grâce à une ligation des extrémités cohésives du fragment purifié et du vecteur plasmidique via la T4 DNA ligase (Roche Diagnostics) dans une réaction à 16 °C réalisée pendant la nuit. Les plasmides ainsi ligués sont transfectés chez les bactéries compétentes *Escherichia coli* TOP10 et ce, par choc thermique. La validité de la construction est effectuée par analyse de patrons de digestion avec enzymes de restriction. La construction finale validée est nommée pGL3-Basic+FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2.

**Tableau 6. Amorces utilisées pour les clonages**

Amorces			Taille du produit PCR
Nom	Sens	Antisens	(pb)
Promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2	5'-AGGCACTGTGCTAAGACAAAGGGT-3'	5'-CGGA <u>AAGCTT</u> AACCCACTCCCAAAGGAA-3' Extension: <u>HindIII</u>	1 532
Promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4	5'-ATAG <u>GAGCTC</u> TGCTGGGTCTGCTGTAAC-3' Extension: <u>SacI</u>	5'-CCTGGGAAGTGAAGACTTGCCATT-3'	1 612

La concentration d'utilisation des amorces est de 100 ng/ $\mu$ L.

## 15.2. Amplification et clonage de la région promotrice de FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4

La région promotrice de FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4 a été amplifiée en utilisant les mêmes conditions que pour celle de FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 2 excepté que des amorces spécifiques à cette région ont été utilisées (Tableau 5). Au final, un produit PCR de 1 612 pb est obtenu. Le clonage du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 présente les mêmes étapes que pour le promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 avec pour modification le fait que seule l'enzyme de restriction SacI est utilisée pour digérer le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 amplifié et purifié ainsi que le vecteur luciférase pGL3-Basic. La construction finale validée est nommée pGL3-Basic+ FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4.

## 16. Essais luciférase

Les cellules 293T sont ensemencées dans des plaques de 12 puits (Corning) avec une quantité de 400 000 cellules par puits afin d'être à 80 % de confluence le jour de la transfection. Différents vecteurs sont transfectés en différentes quantités (Tableau 3). De manière générale, selon les expériences, les vecteurs pGL3-Basic+ FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et pGL3-Basic+ FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 sont utilisés comme vecteurs rapporteurs de l'activité luciférase. Pour activer les promoteurs, divers vecteurs d'expressions sont transfectés, soit pcDNA/Cdx2, pLenti HNF1 $\alpha$  et pBabe puro HNF4 $\alpha$ . Tous ces vecteurs d'expression ont été généreusement fournis par le laboratoire du Dr François Boudreau. Ces vecteurs permettent respectivement l'expression de la protéine Cdx2 humaine, de HNF1 $\alpha$  de rat et de HNF4 $\alpha$  de rat. Le vecteur pRL-SV40 Renilla est transfecté à titre de contrôle pour normaliser l'activité luciférase afin de compenser pour les variations expérimentales telles l'efficacité variable de transfection. Les ADN sont préparés en triplicata selon les conditions expérimentales et transfectés en utilisant la Lipofectamine 2000 ou le X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics) selon les recommandations du fournisseur. La transfection des vecteurs dans les 293T est effectuée pendant 48 heures dans l'incubateur à cellules.

Après la transfection de 2 jours, le milieu est retiré et les cellules sont lysées dans 250  $\mu$ L de tampon de lyse passive 1X (Promega) en étant agitées faiblement pendant

15 minutes. Les lysats cellulaires sont resuspendus, transférés dans un microtube, centrifugés 5 minutes à 16 000 g à 4 °C et le surnageant (environ 250 µL) est transféré dans un nouveau microtube. Les essais luciférase ont été réalisés avec 20 µL de lysat protéique de chacun des échantillons qui ont été distribués dans une plaque de 96 puits. L'activité luciférase a par la suite été mesurée avec le luminomètre Microplate Luminometer ORION (Berthold Detection Systems) selon le protocole établi de Dual luciferase assay. Ce protocole consiste brièvement en une première injection de 50 µL du substrat pour la luciférase, le LAR II (Promega), ce qui permet l'acquisition d'un compte de RLU. Par la suite 50 µL de substrat pour la luciférase rénilla, le tampon Stop'n'Glow (Promega), permet d'effectuer un compte de RLU mais cette fois-ci pour la luciférase rénilla. Les valeurs de RLU luciférase sont normalisées à celles de RLU rénilla pour obtenir un ratio luciférase/rénilla relatif.

## 17. Analyses informatiques

### 17.1. Études de promoteurs

Ces études sont effectuées avec le logiciel MatInspector (Genomatix Software) pour ce qui est de l'identification de divers éléments de réponse sur les promoteurs étudiés. De plus, le logiciel NUBIScan (<http://www.nubiscan.unibas.ch/>) est utilisé plus spécifiquement pour caractériser les éléments de réponse à FXR. Également, la banque de données du ChIP-seq de FXR chez la souris (Thomas *et al.*, 2010) publiquement disponible (<http://genome.ucsc.edu>, *Custom Tracks : FXR intestine*) a servi à localiser et confirmer la présence d'éléments de réponse potentiels à FXR, et ce, en alignant les séquences d'ADN de la souris avec celles de l'humain.

### 17.2. Alignements de séquences

L'alignement de séquences d'ADN est réalisé avec le logiciel BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) en utilisant l'algorithme intégré, *ClustalW Multiple alignment*.

### 17.3. Analyses statistiques

C'est avec l'hypothèse que les données analysées suivent une distribution normale que le test de Student non pairé avec intervalles de confiance de 95 % est effectué sur les variables s'exprimant en moyennes avec écart type. Les résultats sont présentés comme non significatif (Ns) ou significatifs, soit : \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  et \*\*\* =  $p < 0,001$ .

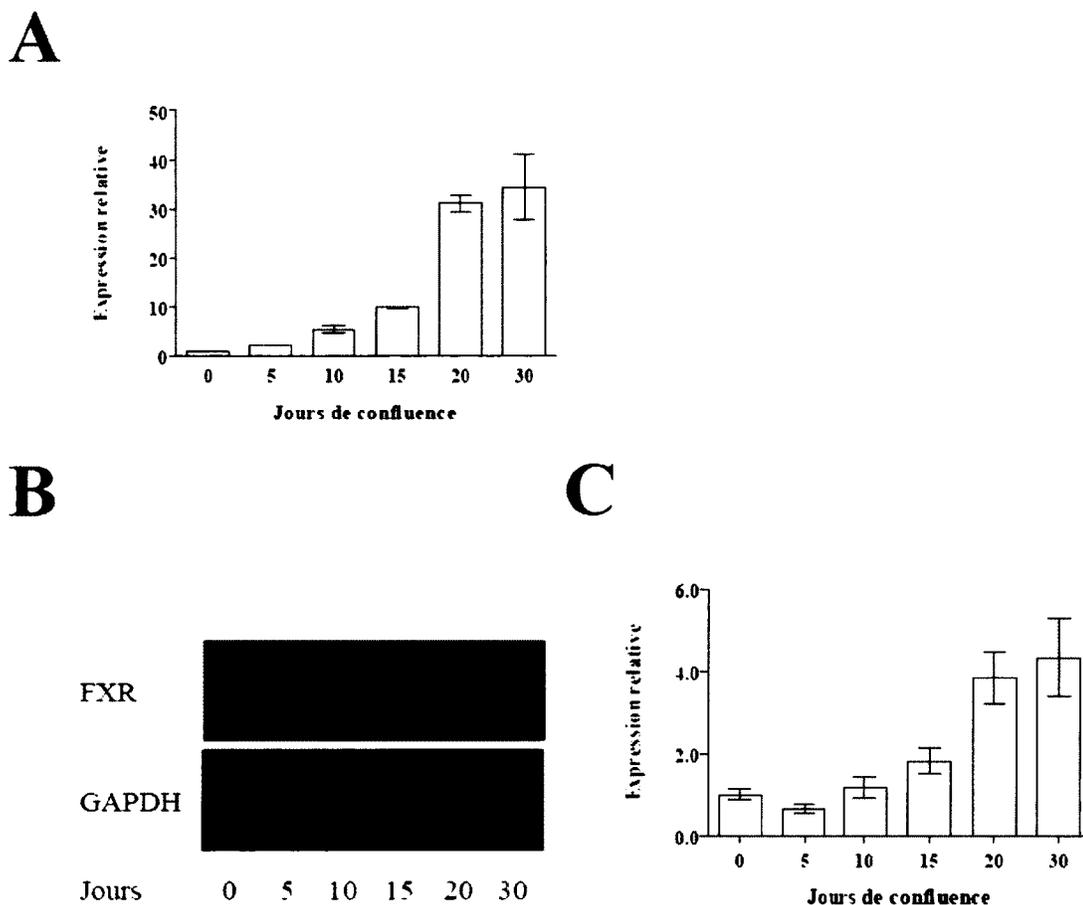
### III - RÉSULTATS

#### 1. Validation de l'expression de FXR dans le modèle cellulaire Caco-2/15

Pour valider la pertinence de l'utilisation de notre modèle cellulaire, les Caco-2/15, nous avons vérifié les niveaux d'expression de FXR dans ces cellules lors du processus de différenciation cellulaire suite à l'atteinte de la confluence. Les résultats montrent que tant au niveau de l'expression protéique qu'au niveau de l'expression de l'ARNm (tout isoformes de FXR confondus), FXR est présent dès le début du processus de différenciation des cellules Caco-2/15 (atteinte de la confluence, 0 jour). L'expression de FXR est plus marquée à partir de 15 jours post-confluence pour être maximale à 20 et 30 jours suivant l'atteinte de la confluence par les Caco-2/15. (Figure 6).

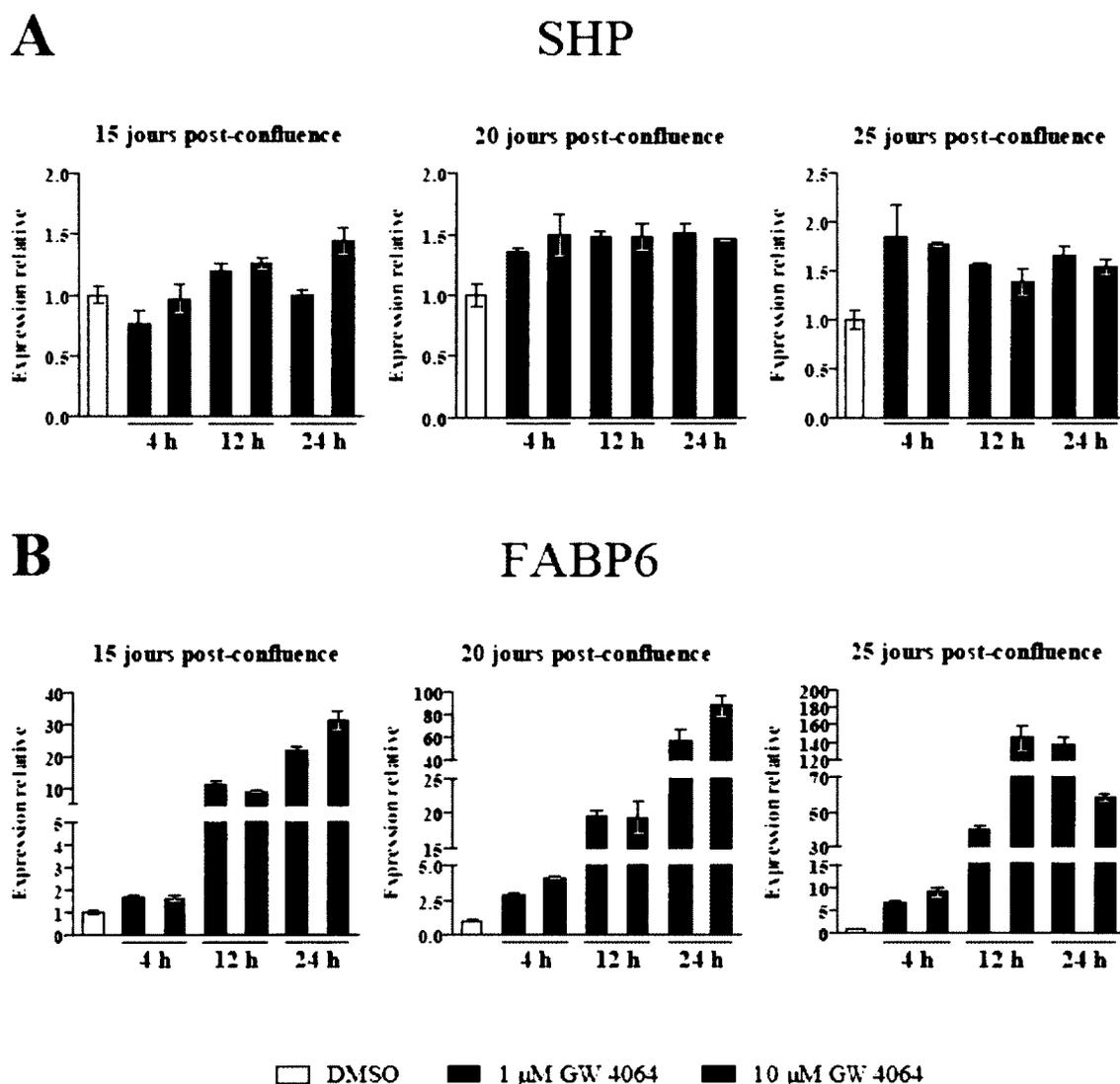
#### 2. Détermination des conditions idéales de traitement avec l'agoniste de FXR, le GW 4064, dans les Caco-2/15

Le GW 4064, agoniste synthétique de FXR, permet l'activation de la protéine et mène à la transcription de gènes cibles. Pour déterminer les conditions optimales d'activation de FXR dans les Caco-2/15, des cellules à différents niveaux de confluences (15, 20 et 25 jours post-confluence) ont été traitées pendant différents temps avec le GW 4064 (4, 12 et 24 heures) et ce, à deux concentrations (1 ou 10  $\mu$ M). La quantification de l'expression génique de SHP et FABP6, des cibles connues de FXR, révèle que l'expression de SHP est beaucoup moins induite que celle de FABP6 suite à l'activation de FXR. Au final, la majorité des expériences subséquentes ont été effectuées sur des cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence avec un traitement de 24 heures de 1  $\mu$ M de GW 4064 (Figure 7).



**Figure 6. Profil d'expression de FXR dans les cellules Caco-2/15**

Expérimentation préliminaire pour évaluer l'expression de FXR au long du processus de différenciation des cellules Caco-2/15 lors de l'atteinte de la confluence (0 jour) jusqu'à 30 jours post-confluence. **A.** Expression relative par qPCR de l'ARNm de FXR tout isoformes confondus, normalisée à l'expression de l'ARNm de la GAPDH. La moyenne avec l'écart type présentée est obtenue d'un triplicata du même échantillon. **B.** Immunobuvardage de type Western sur des protéines totales de cellules Caco-2/15 durant le processus de différenciation. Le panneau du haut présente la détection de FXR et celui du bas la détection de la GAPDH à titre de contrôle. **C.** Expression relative de la protéine FXR normalisée à l'expression de la GAPDH. Les valeurs sont obtenues avec des mesures de densitométrie réalisées sur l'immunobuvardage de type Western présenté en B. La moyenne avec l'écart type est obtenue d'un triplicata de la mesure de densitométrie du même immunobuvardage.



**Figure 7. Détermination des conditions de traitement optimales au GW 4064**

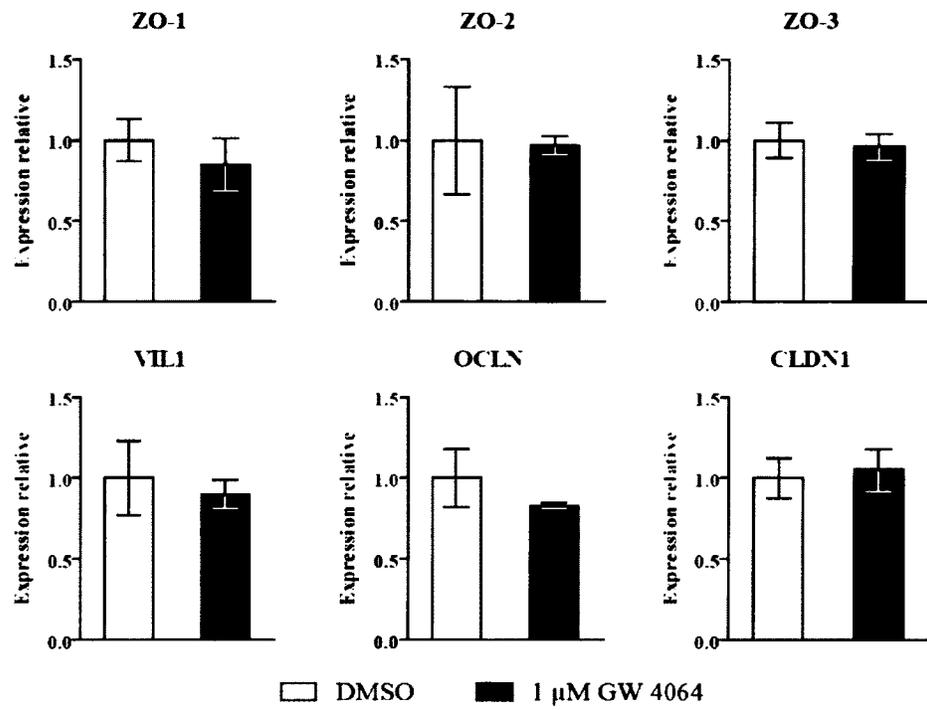
Expérience préliminaire afin d'évaluer l'activité transcriptionnelle optimale de FXR suite à l'activation par son agoniste, le GW 4064, dans les cellules Caco-2/15. **A.** Expression de l'ARNm de SHP relative à celle du contrôle *GAPDH*, par qPCR, dans des cellules Caco-2/15, à 15, 20 et 25 jours post-confluence. Les cellules traitées durant 4, 12 et 24 heures avec 1  $\mu\text{M}$  (colonnes grises) ou 10  $\mu\text{M}$  (colonnes noires) de GW 4064 sont comparées aux cellules contrôles traitées 12 heures avec le DMSO (colonnes blanches). Les moyennes avec écarts types présentées sont obtenues d'un triplicata du même échantillon. **B.** Expression relative de l'ARNm de FABP6 évaluée dans les mêmes conditions que pour SHP.

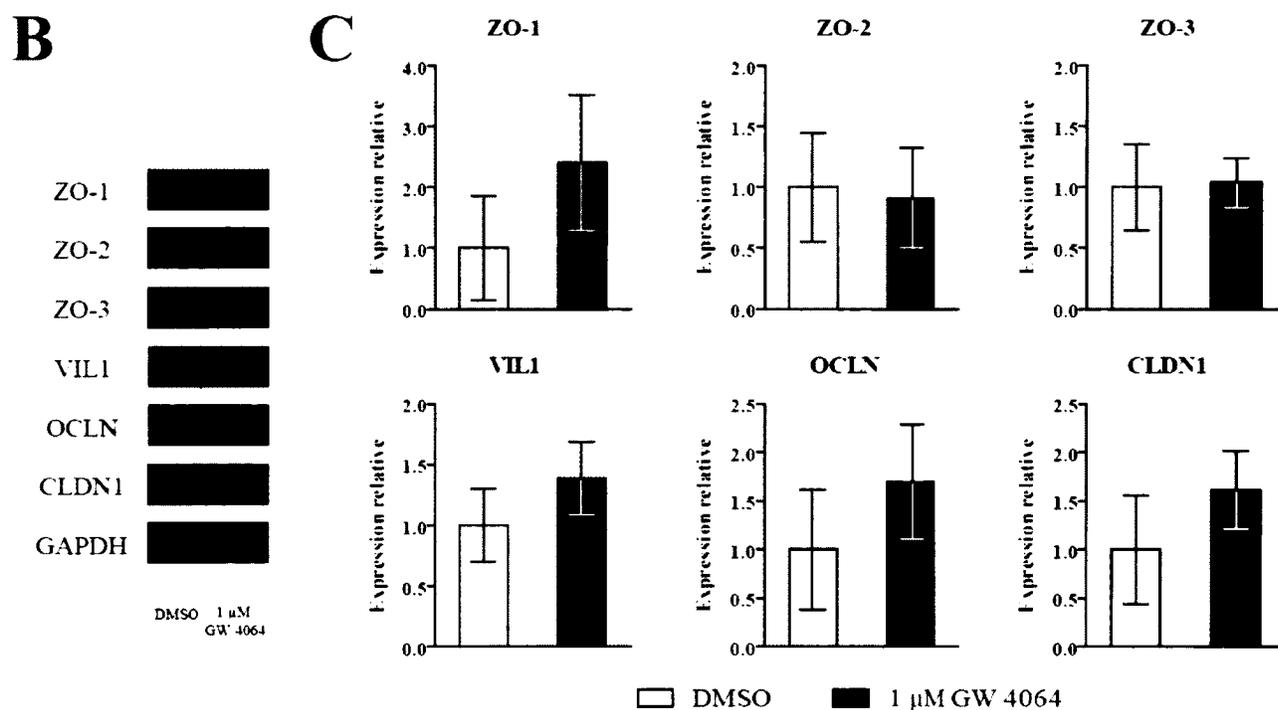
### **3. L'activation de FXR ne semble pas avoir d'impact sur l'expression de certaines protéines de jonctions épithéliales**

Dans le but d'explorer si l'activation de FXR modulerait la transcription de cibles importantes pour le maintien de l'intégrité et de la structure de la barrière épithéliale intestinale, les niveaux d'expression des protéines de jonctions ZO-1, ZO-2, ZO-3, OCLN et CLDN1 ainsi que de la protéine structurale VIL1 ont été analysés dans les cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence et traitées 24 heures au GW 4064 (1  $\mu$ M). Pour toutes ces cibles potentielles, que ce soit au niveau de l'expression de l'ARNm ou des protéines, nous n'observons pas d'expression différentielle suite à l'activation de FXR (Figure 8). L'obtention de ces résultats nous a menés vers une approche à large échelle de type micro-puce à ADN dans le but d'identifier des processus biologiques autres que la régulation de l'absorption des acides biliaires dans lesquels FXR pourrait être impliqué.

### **4. L'activation de FXR dans un contexte d'étude à large échelle de l'expression génique révèle que dans les cellules Caco-2/15, différents processus biologiques sont modulés**

Avec l'objectif de trouver de nouveaux gènes cibles à FXR ainsi que des processus biologiques associés, une analyse par micro-puce à ADN a été effectuée en comparant en triplicata des cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence traitées pour 24 h au GW 4064 (1  $\mu$ M) et des cellules contrôles traitées au DMSO. L'analyse des niveaux d'expression suite à la micro-puce à ADN suggère qu'une activation de FXR dans ce modèle régule de nombreux gènes. En effet, avec une limite significative fixée à  $p < 0,05$  on obtient 3 675 gènes régulés positivement et 4 314 gènes régulés négativement. Ces gènes peuvent être regroupés selon des classes fonctionnelles de processus biologiques. Cette analyse de regroupements suggère que des processus tels l'organisation du cytosquelette, les processus métaboliques liés au phosphore, l'adhésion biologique et les processus reliés aux filaments d'actine sont dans les 10 processus les plus significativement modulés par l'activation de FXR dans les cellules Caco-2/15 (Tableau 7). Suite à l'obtention de ces processus biologiques par les analyses de micro-puce à ADN, nous nous sommes demandé s'il existait

**A**



**Figure 8. Détermination de l'expression de cibles potentielles de FXR dans les cellules Caco-2/15**

**A.** Analyse de l'expression relative par qPCR de l'ARNm de gènes cibles potentiels de FXR. Des cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence sont traitées avec 1  $\mu$ M de GW 4064 pour 24 heures (colonnes noires) versus au DMSO (colonnes blanches). L'expression des cibles est normalisée à l'expression de l'ARNm de la GAPDH dans tous les cas. Les résultats sont présentés comme une moyenne avec l'écart type associé de trois expériences indépendantes. **B.** Immunobuvardage de type Western sur des protéines totales de Caco-2/15 à 20 jours post-confluence traitées avec 1  $\mu$ M de GW 4064 pour 24 heures versus au DMSO. L'expression de la GAPDH est présentée à titre de contrôle. Des immunobuvardages représentatifs de trois expériences indépendantes sont présentés. **C.** Expression relative des protéines normalisée à l'expression de la GAPDH. Les valeurs sont obtenues avec des mesures de densitométrie réalisées à partir de trois immunobuvardages de type Western indépendants pour les cibles testées. Les colonnes noires représentent le traitement et les blanches la condition contrôle. La moyenne est présentée avec l'écart type.

**Tableau 7. Classification des processus biologiques dont les gènes sont régulés par l'activation de FXR**

Processus biologiques	Identification GO	Valeur p
Organisation du cytosquelette	GO:0007010	$2,778 \times 10^{-13}$
Processus métaboliques liés au phosphore	GO:0006793	$8,061 \times 10^{-13}$
Adhésion biologique	GO:0022610	$1,475 \times 10^{-10}$
Processus reliés aux filaments d'actine	GO:0030029	$1,148 \times 10^{-8}$
Modification de la chromatine	GO:0016568	$9,006 \times 10^{-7}$
Morphogenèse de composantes cellulaires	GO:0032989	$1,498 \times 10^{-6}$
Mouvement de composantes cellulaires	GO:0006928	$1,951 \times 10^{-5}$
Voies de signalisation intracellulaire	GO:0023034	$2,127 \times 10^{-5}$
Localisation cellulaire	GO:0051674	$4,766 \times 10^{-5}$
Cycle cellulaire	GO:0007049	$6,176 \times 10^{-5}$

La liste de processus biologiques comporte des gènes présentant une modulation significative ( $p < 0,05$ ) de l'expression suite à l'activation de FXR dans les cellules Caco-2/15. Ces gènes sont classés en processus biologiques avec une correction pour comparaisons multiples de type Bonferroni. La limite significative est fixée à  $p < 0,01$ . Les 10 processus biologiques les plus significatifs sont présentés dans le tableau avec leurs identifications GO et leurs valeurs p associées.

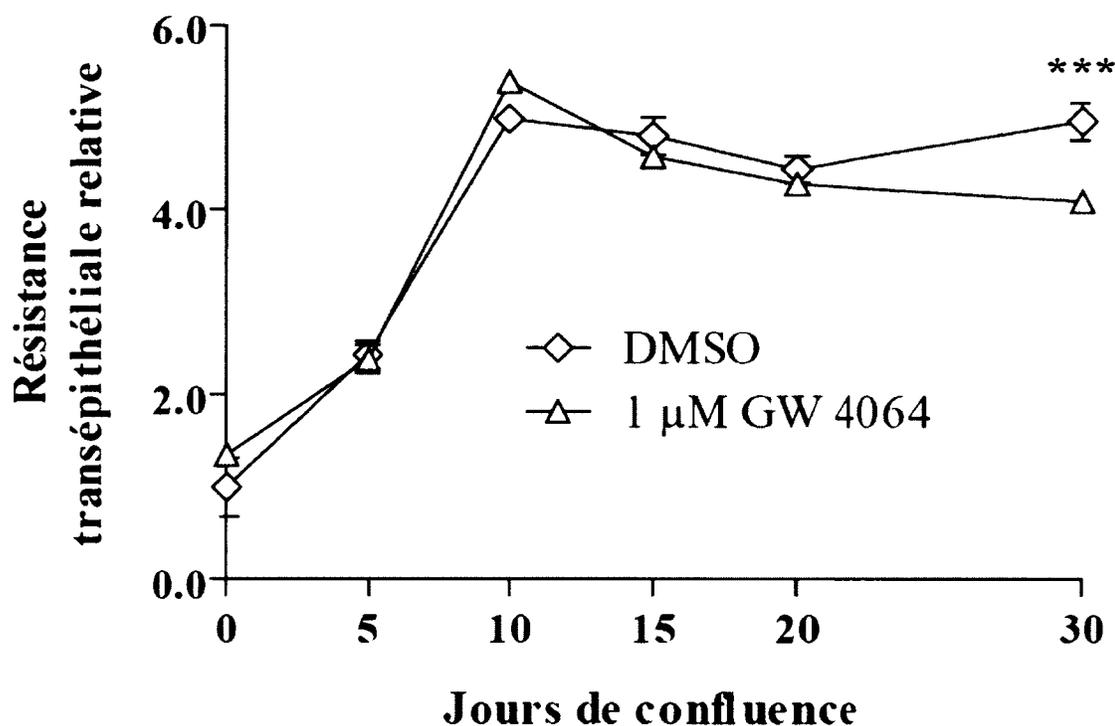
une corrélation entre la classification fonctionnelle des gènes modulés par l'activation de FXR et un phénotype observable lors d'essais cellulaires.

### **5. L'activation de FXR n'influence pas la résistance transépithéliale lors du processus de différenciation des cellules Caco-2/15**

Nous avons réalisé des essais de résistance transépithéliale dans les cellules Caco-2/15 puisque le profilage d'expression génique de celles-ci suite à l'activation de FXR a révélé la modulation des classifications ontologiques suivantes : l'organisation du cytosquelette et l'adhésion biologique, deux processus biologiques que l'on peut associer à l'intégrité épithéliale. Ces essais montrent qu'un traitement continu au GW 4064 à concentration de 1  $\mu$ M lors de la différenciation des cellules Caco-2/15 n'amène pas d'augmentation significative de la résistance transépithéliale, et ce, de la confluence jusqu'à 20 jours post-confluence. De façon surprenante, à 30 jours post-confluence, on observe une diminution significative d'environ 18 % de la résistance transépithéliale des cellules traitées au GW 4064 (Figure 9). Ces résultats suggèrent que l'intégrité épithéliale n'est pas affectée par l'activation de FXR du moins jusqu'à 20 jours post-confluence.

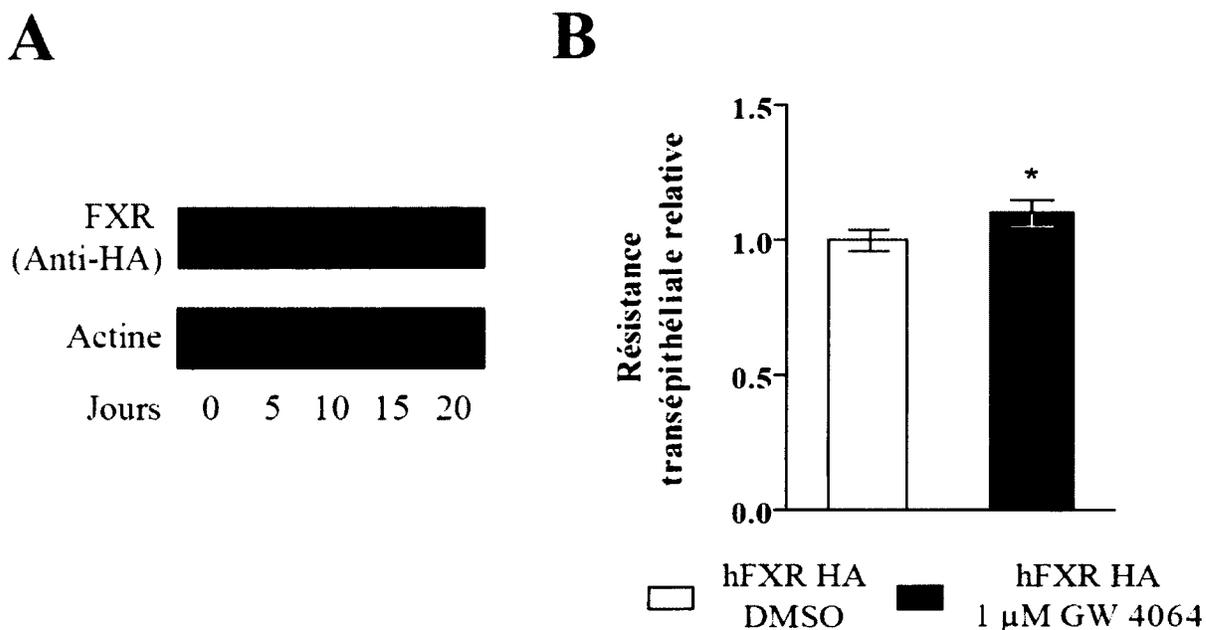
### **6. La surexpression et l'activation de FXR mènent à une augmentation de la résistance transépithéliale à 20 jours post-confluence dans des cellules Caco-2/15**

Puisque la résistance transépithéliale des cellules Caco-2/15 est déjà très forte à 10 jours post-confluence, alors que FXR n'est que peu induit, nous avons utilisé des conditions expérimentales où FXR peut être activé dès l'atteinte de la confluence. Dans des conditions où la surexpression de FXR est constante (Figure 10A) et non physiologiquement induite durant la différenciation, la résistance transépithéliale est légèrement, mais significativement augmentée de 1,10 fois lorsque les cellules sont traitées au GW 4064 (1  $\mu$ M) pendant 24 heures, par rapport à la condition contrôle (Figure 10B). Suivant l'obtention des résultats de résistance transépithéliale, nous nous sommes tournés vers un autre processus qui concerne aussi l'organisation du cytosquelette et l'adhésion biologique, soit le mécanisme de restitution épithéliale.



**Figure 9. Modulation de la résistance transépithéliale par l'activation de FXR lors du processus de différenciation des cellules Caco-2/15**

La résistance transépithéliale d'une monocouche de cellules Caco-2/15 est mesurée à différents temps durant une cinétique de différenciation, de 0 à 30 jours suivant l'atteinte de la confluence. Ces cellules sont traitées au GW 4064 ou au DMSO (contrôle). Toutes les valeurs de résistance transépithéliale sont relatives à une valeur du contrôle DMSO obtenue au jour 0. Les valeurs présentées sont la moyenne avec écart type de trois cinétiques de différenciation indépendantes (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ).



**Figure 10. Modulation de la résistance transépithéliale par l'activation de FXR dans des Caco-2/15 surexprimant FXR**

L'essai de résistance transépithéliale est réalisé sur des cellules Caco-2/15 surexprimant la protéine FXR humaine couplée à l'étiquette HA (hFXR HA). **A.** Immunobuvardage de type Western confirmant la stabilité de la surexpression de hFXR HA tout au long du processus de différenciation des cellules Caco-2/15. Le panneau du haut présente la détection de hFXR HA par un anticorps Anti-HA et celui du bas la détection de l'actine à titre de contrôle. **B.** Résistance transépithéliale relative mesurée sur des cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence surexprimant hFXR HA et traitées 24 heures au GW 4064 (1  $\mu$ M) (colonne noire) ou au DMSO (colonne blanche). Les résultats sont la combinaison de quatre expériences indépendantes et sont présentés comme une moyenne avec l'écart type (\* =  $p < 0,05$ ).

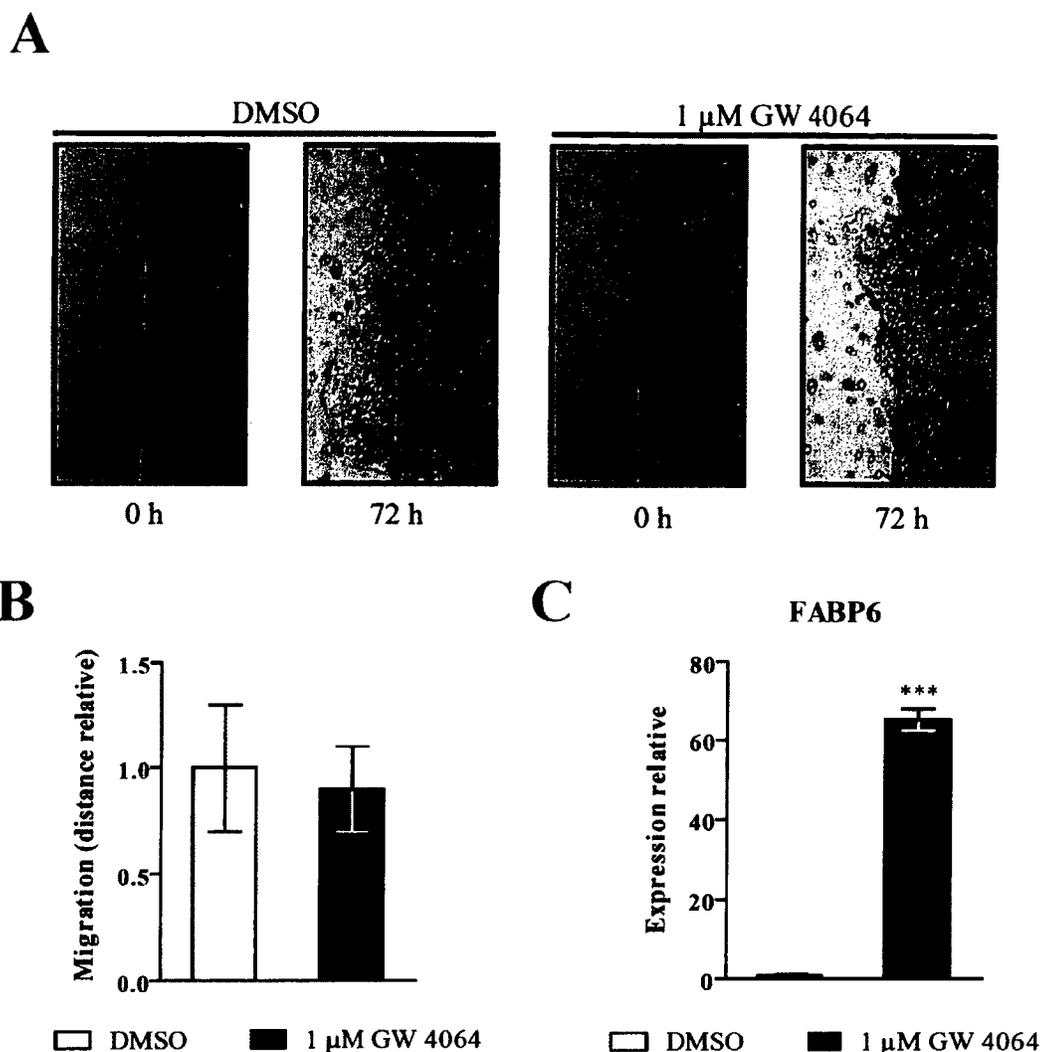
## **7. L'activation de FXR ne favorise pas la restitution épithéliale après une blessure**

Un essai de la restitution épithéliale après une blessure a été effectué afin d'évaluer une possible correspondance physiologique entre la modulation, par l'activation de FXR, de gènes ayant un rôle dans les processus biologiques reliés aux filaments d'actine et à l'organisation du cytosquelette. Pour se faire, nous avons traité des cellules Caco-2/15 à 5 jours post-confluence, avec du GW 4064 (1  $\mu$ M) pour les 72 heures suivant les blessures. L'hypothèse d'une optimisation de la restitution épithéliale par l'activation de FXR n'a pas été confirmée puisqu'il n'y a pas de différence significative de migration des cellules traitées par rapport à celles contrôles (Figure 11A et B). On peut cependant affirmer que FXR est bien activé dans ces conditions puisque l'expression de l'ARNm d'un gène cible de FXR, FABP6, y est fortement induite (Figure 11C).

Avec les résultats de résistance transépithéliale et ceux des essais de blessures, peu révélateurs quant à la signification des processus biologiques identifiés par notre micro-puce à ADN, nous avons décidé de cibler des gènes précis présents dans la classe d'organisation du cytosquelette. Le but de cette manœuvre étant de confirmer la modulation de la transcription de certains gènes ciblés par l'activation de FXR.

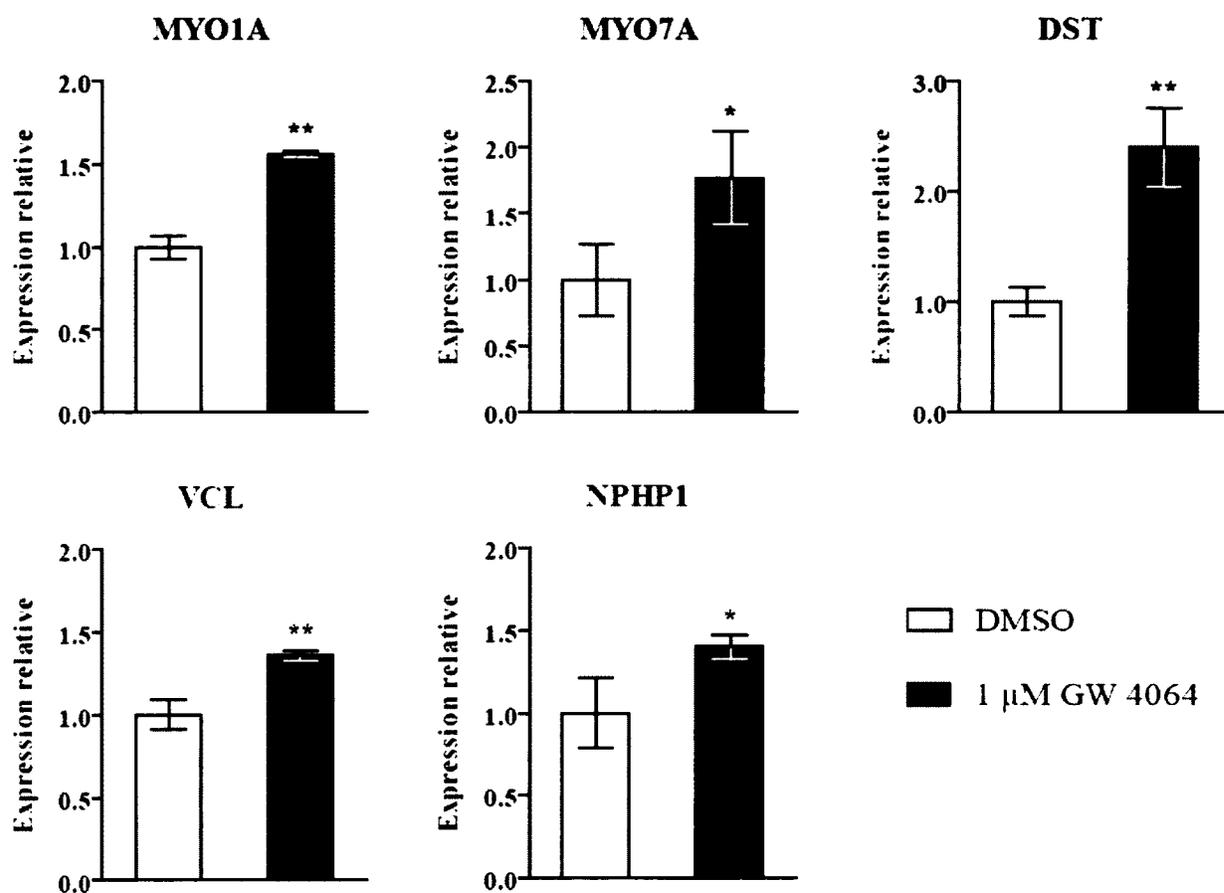
## **8. Validation de la modulation de l'expression de différents gènes cibles potentiels de FXR identifiés par les résultats de micro-puce à ADN**

Pour identifier et valider de nouvelles cibles transcriptionnelles à FXR à partir des nombreux gènes modulés dans notre analyse de micro-puce à ADN, nous avons ciblé ceux classés dans le processus biologique d'organisation du cytosquelette. Nous avons confirmé que les gènes MYO1A, MYO7A, DST, VCL et NPHP1 ont une expression significativement plus grande dans les cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence traitées pendant 24 heures avec 1  $\mu$ M de GW 4064 comparativement aux cellules contrôles. En effet, on observe pour MYO1A et MYO7A une augmentation respective de 1,56 et 1,77 fois de l'expression de l'ARNm. Les niveaux d'expression pour DST, VCL et NPHP1 sont quant à eux augmentés de 2,40, 1,36 et 1,40 fois respectivement (Figure 12).



**Figure 11. Effet d'une activation de FXR en contexte de restitution épithéliale par analyses d'essais de blessures**

A. Essais de blessures réalisés sur des Caco-2/15 à 5 jours post-confluence. Photographies de blessures prises au plus fort grossissement par microscopie confocale. Suite aux blessures, les cellules ont été traitées pendant 72 heures avec 1  $\mu$ M de GW 4064 ou au traitement contrôle DMSO. B. Mesure de la migration en 72 heures, en distance relative par rapport à la marque de la blessure, faite à partir de six blessures indépendantes pour la condition traitée (colonne noire) et contrôle (colonne blanche). Les moyennes avec écart type sont présentées. C. Analyse de l'expression relative par qPCR de l'ARNm de FABP6 dans les cellules Caco-2/15 à 5 jours post-confluence utilisées pour les essais de blessures. L'expression de *FABP6* est normalisée à l'expression de la *GAPDH*, avec présentation de moyenne  $\pm$  écart type (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ).



**Figure 12. Validation d'une modulation de l'expression de gènes cibles potentiels de FXR**

Analyse de l'expression relative par qPCR de l'ARNm de gènes identifiés pour être modulés par l'activation de FXR dans une micro-puce à ADN. Les résultats proviennent de la combinaison de trois expérimentations indépendantes comparant des cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence traitées avec 1 µM de GW 4064 pour 24 heures (colonnes noires) à des cellules contrôles traitées au DMSO (colonnes blanches). L'expression des cibles est normalisée à l'expression de la *GAPDH* et les résultats sont présentés comme une moyenne  $\pm$  écart type (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ ).

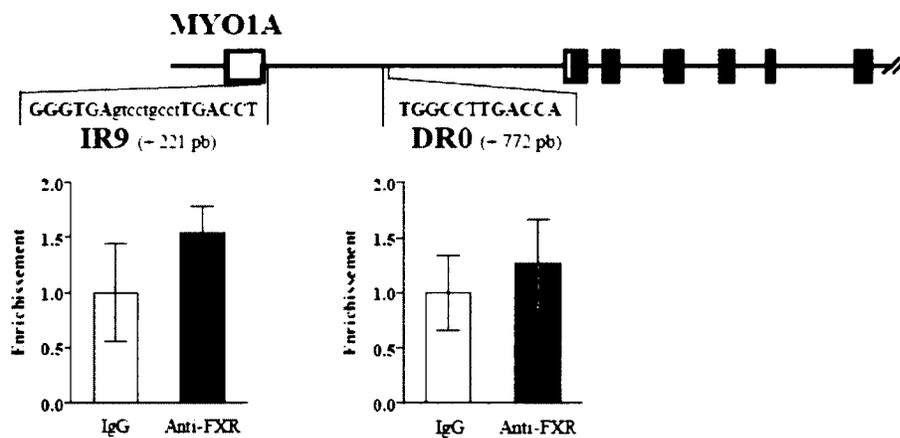
## 9. FXR ne se lie pas aux éléments de réponse potentiels identifiés pour les gènes MYO1A, MYO7A et DST

Afin de déterminer si les cibles confirmées par expériences indépendantes de qPCR sont des cibles transcriptionnelles directes de FXR, des analyses informatiques ont été faites pour repérer des FXRE au niveau du promoteur de ces gènes. Ces analyses ont mené à l'identification d'éléments de réponse potentiels à FXR pour les gènes MYO1A, MYO7A et DST. Brièvement, ces FXRE ont été identifiés comme étant de type IR9 et DR0 pour MYO1A, respectivement à 221 et 772 pb en aval du site d'initiation de la transcription (Figure 13A). Pour MYO7A, des éléments IR0 et DR1 ont été identifiés respectivement à 1 868 et 16 761 pb en aval (Figure 13B). Finalement, pour le gène DST, des sites DR1 et DR8 ont été localisés respectivement à 48 299 et 266 pb en amont du site d'initiation de la transcription (Figure 13C). Des analyses d'immunoprécipitation de la chromatine pour FXR, effectuées dans des cellules Caco-2/15 20 jours post-confluence et traitées au GW 4064 (1  $\mu$ M), démontrent que les régions d'ADN ayant des FXRE potentiels ne sont pas significativement enrichies pour la présence de FXR (Figure 13). La technique utilisée est cependant bien au point puisque pour le promoteur de cibles connues de FXR, telles FABP6 et FGF19, nous observons des enrichissements pour la présence de FXR de 11,49 et 26,24 fois par rapport au contrôle IgG (Figure 14). Les éléments de réponse ciblés pour ces deux contrôles proviennent, dans le cas de *FABP6*, de comparaisons informatiques avec les données du ChIP-seq (<http://genome.ucsc.edu>) et dans le cas de *FGF19*, d'informations de la littérature (Holt *et al.*, 2003).

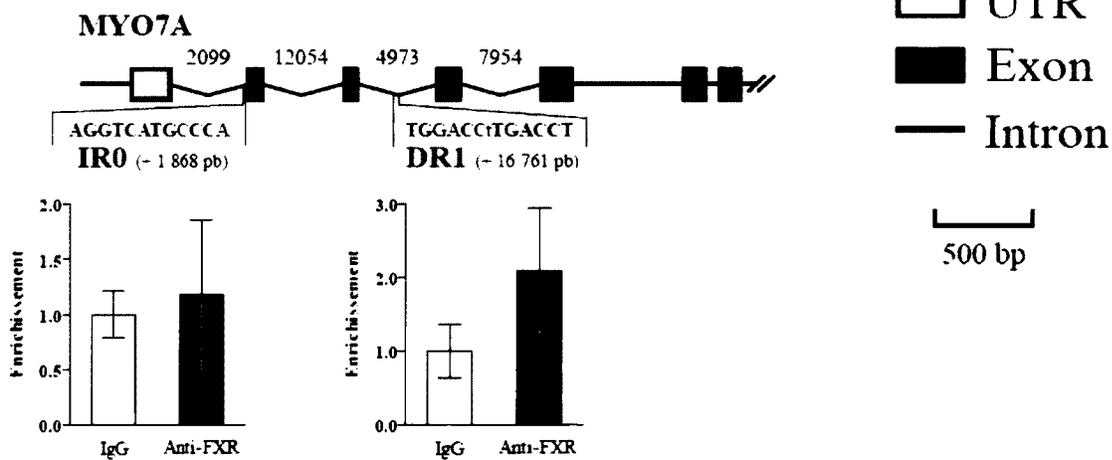
## 10. Présentation des différents gènes testés par expériences de qPCR

Pour tenter d'identifier de nouvelles cibles transcriptionnelles à FXR, plusieurs expériences de qPCR ont été faites sur des échantillons d'ADNc de cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence traitées au GW 4064 (1  $\mu$ M). La pertinence qui sous-tend l'analyse de ces cibles potentielles est illustrée sous forme de diagramme de Venn (Figure 15). En effet, 56 cibles potentielles testées sont modulées par l'activation de FXR dans

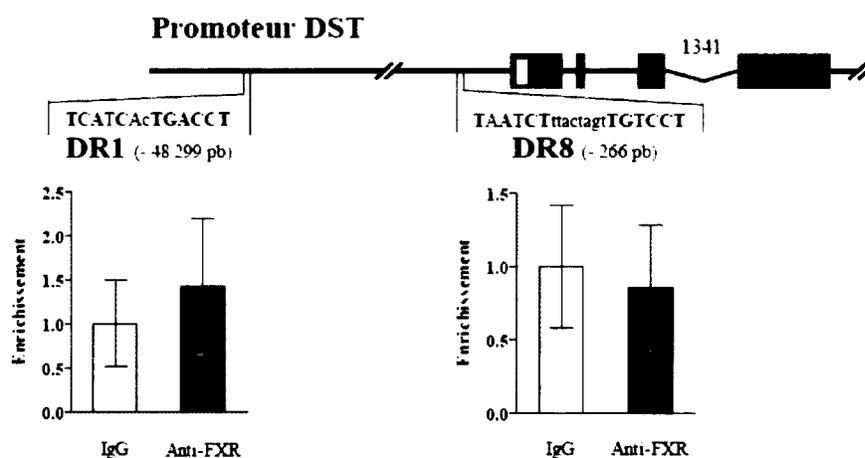
A



B

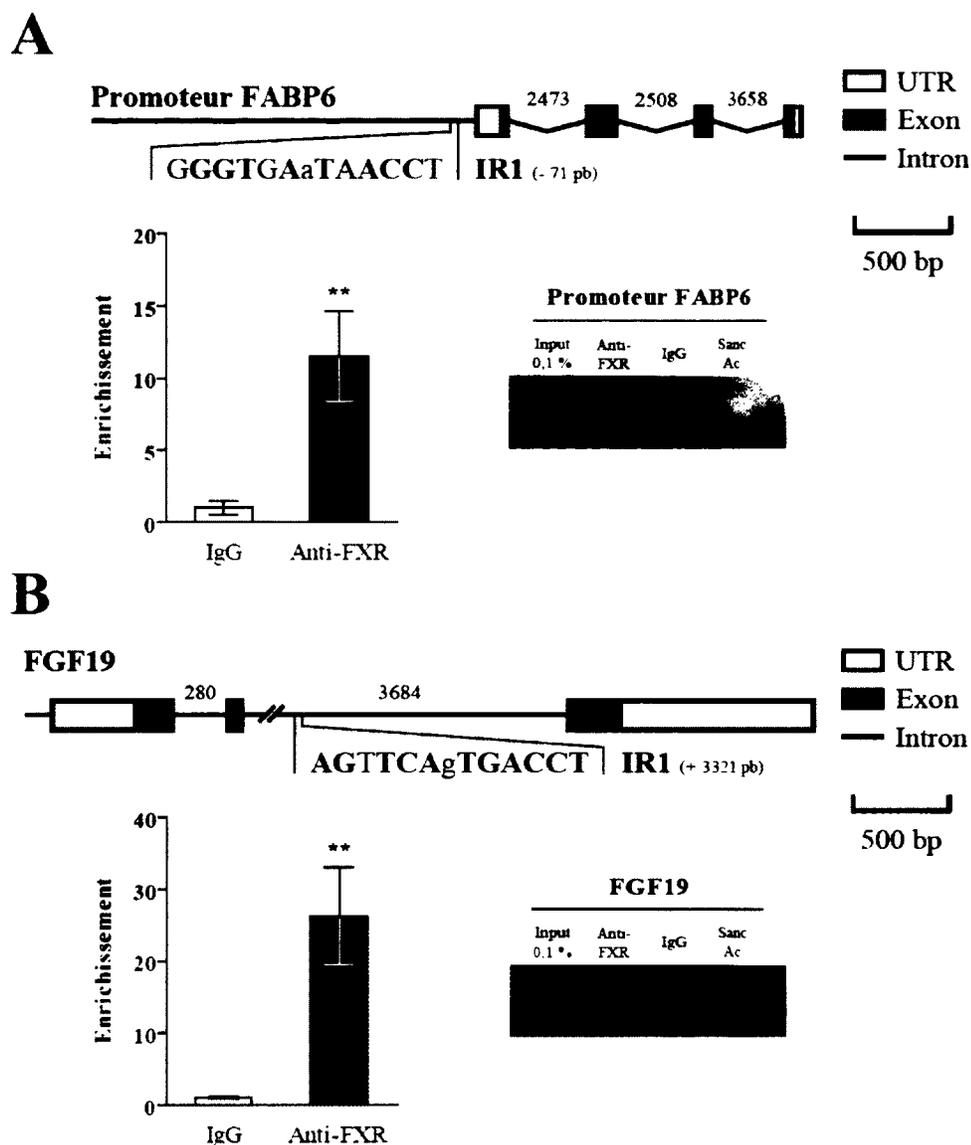


C



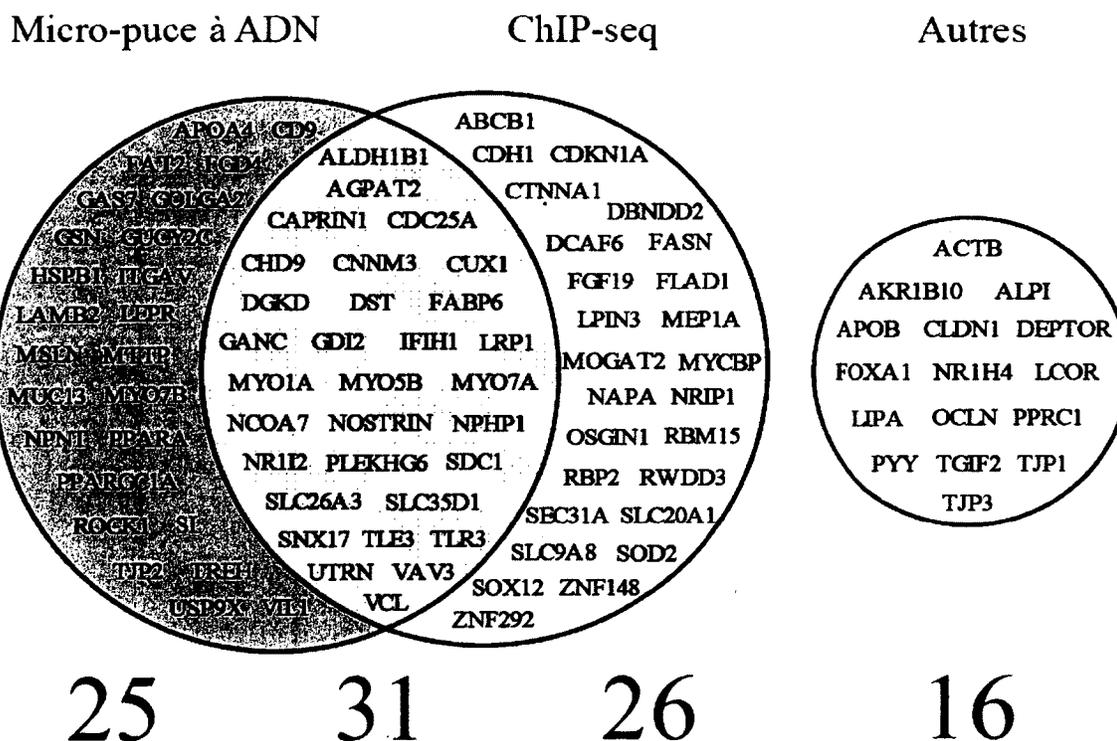
**Figure 13. Immunoprécipitation de la chromatine ciblant des régions du génome ayant des FXRE potentiels dans les gènes cibles identifiés**

La ChIP est faite sur des cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence traitées 24 heures avec 1  $\mu$ M de GW 4064. Les résultats sont obtenus de trois expériences indépendantes (moyenne et écart type). Les histogrammes montrent l'enrichissement de la région ciblée lorsqu'un anticorps Anti-FXR est utilisé (colonnes noires) comparativement à un IgG (colonnes blanches). Cet enrichissement est normalisé par rapport à l'enrichissement d'une région contrôle où il n'y a pas de FXRE potentiel. Représentation schématique du génome et histogrammes de ChIP effectués sur deux sites potentiels pour A. *MYO1A*, B. *MYO7A* et C. *DST*.



**Figure 14. Immunoprécipitation de la chromatine ciblant des régions du génome où FXR est connu pour se fixer (validation de la technique)**

ChIP de FXR réalisée sur des cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence et traitées 24 heures avec 1  $\mu$ M de GW 4064. L'élément de réponse potentiel à FXR est présenté dans le schéma des gènes et promoteurs de **A. FABP6** et **B. FGF19**. Le panneau de gauche présente l'enrichissement de la région ciblée lorsqu'un anticorps Anti-FXR est utilisé (colonnes noires) comparativement à un IgG de même isotype (colonnes blanches). Cet enrichissement est calculé en tenant compte de l'enrichissement d'une région contrôle où il n'y a pas de FXRE potentiel. Les résultats proviennent de la combinaison de trois expériences indépendantes (la moyenne  $\pm$  écart type est présentée (\*\* =  $p < 0,01$ )). Le panneau de droite illustre une expérience représentative de ChIP où l'ADN enrichi et amplifié par PCR est migré sur gel d'agarose 2 %.



**Figure 15. Représentation graphique des gènes analysés par qPCR pour identifier des cibles modulées par l'activation de FXR**

Classification selon trois critères de sélection des gènes analysés pour leur modulation d'expression suite à l'activation de FXR dans les cellules Caco-2/15, par analyses de qPCR. Les gènes choisis proviennent soit de nos résultats de micro-puce à ADN, soit de la banque de données publique d'un ChIP-seq pour FXR effectué sur l'intestin de souris ou ont été choisis selon d'autres critères.

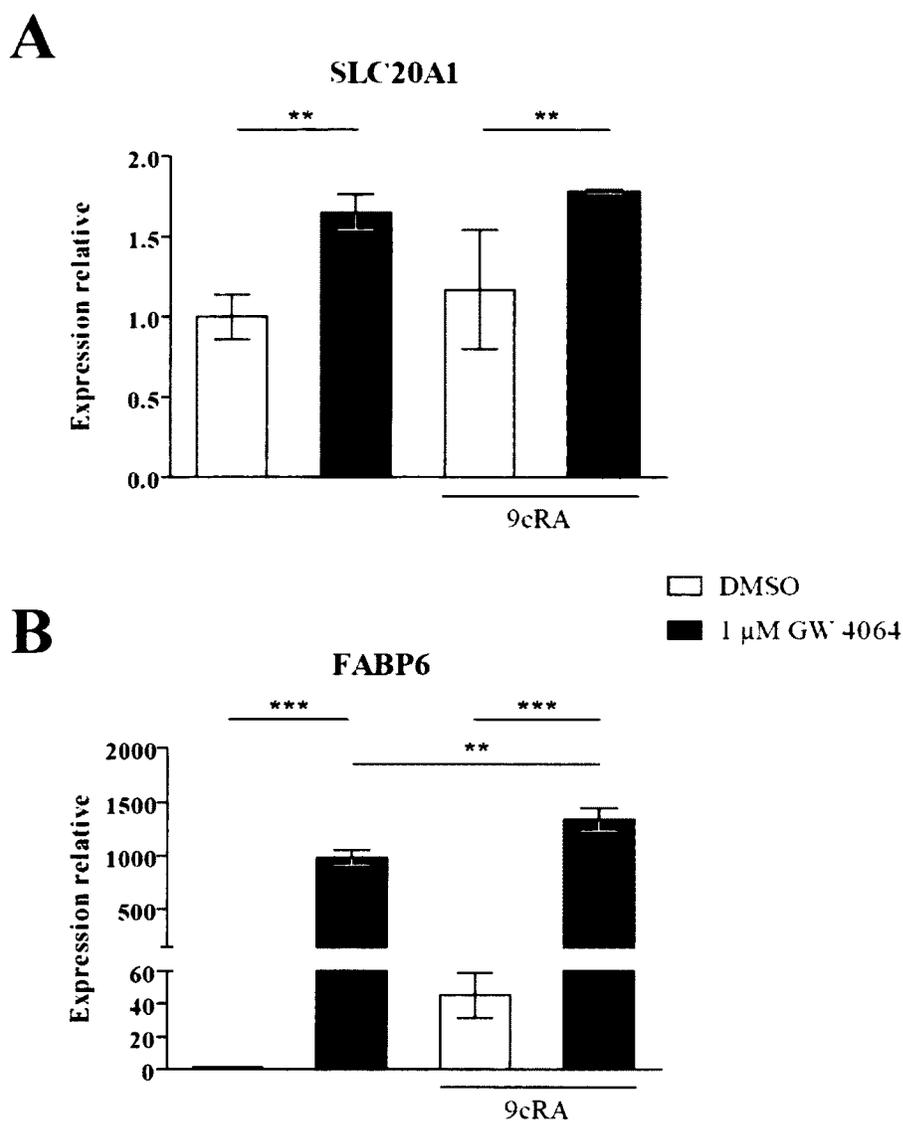
notre micro-puce à ADN et 57 cibles présentent des sites de liaison potentiels à FXR selon la base de données publique d'une expérience de CHIP-seq de FXR dans l'intestin de souris (Thomas *et al.*, 2010) (<http://genome.ucsc.edu>). De ces gènes testés, 31 présentaient les deux critères de sélection et 16 ont été analysés suivant d'autres critères. Mis à part les gènes déjà confirmés comme régulés par l'activation de FXR, tels MYO1A, MYO7A, DST, VCL, NPHP1 et les divers gènes servant de contrôle, comme FABP6, la majeure partie des gènes nommés dans la figure 15 ne présentent pas de différences significatives d'expression génique entre la condition de traitement au GW 4064 et la condition contrôle. Le gène SLC20A1 est une exception notable qui sera détaillée subséquemment. Il est à préciser que les résultats de modulation d'expression ne sont pas affichés dans la Figure 15.

### **11. L'activation de FXR module l'expression de SLC20A1 dans les cellules Caco-2/15**

SLC20A1 est un transporteur de phosphate inorganique sodium-dépendant présent à la surface des entérocytes qui favorise l'absorption du phosphate inorganique. (Sabbagh *et al.*, 2011). Selon nos analyses qPCR, une augmentation significative de 1,65 fois de l'expression du transcrite de SLC20A1 est observée lorsque les cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence sont traitées avec 1  $\mu$ M de GW 4064 (Figure 16A). Le traitement supplémentaire avec un agoniste de RXR, l'acide 9-cis rétinolique, n'amène pas d'effet synergique à l'augmentation de l'expression par l'activation unique de FXR. Un tel effet synergique est cependant observable pour ce qui est de la cible connue de FXR, *FABP6*. Ces observations illustrent bien comment l'activation de l'hétérodimère FXR-RXR peut être permissive (Figure 16B). Au final, nos résultats montrent que l'activation spécifique de FXR mène à une augmentation de l'expression du transcrite de SLC20A1.

### **12. FXR se lie au niveau du promoteur de SLC20A1 dans une région contenant deux éléments de réponse potentiels**

Pour déterminer si SLC20A1 est une cible transcriptionnelle directe de FXR, des analyses du promoteur ont été effectuées. Ces analyses informatiques montrent la présence de deux FXRE au niveau du promoteur de SLC20A1, soit un IR1 et un DR1 situés



**Figure 16. Modulation de l'expression de l'ARNm de SLC20A1 par l'activation de FXR avec le GW 4064**

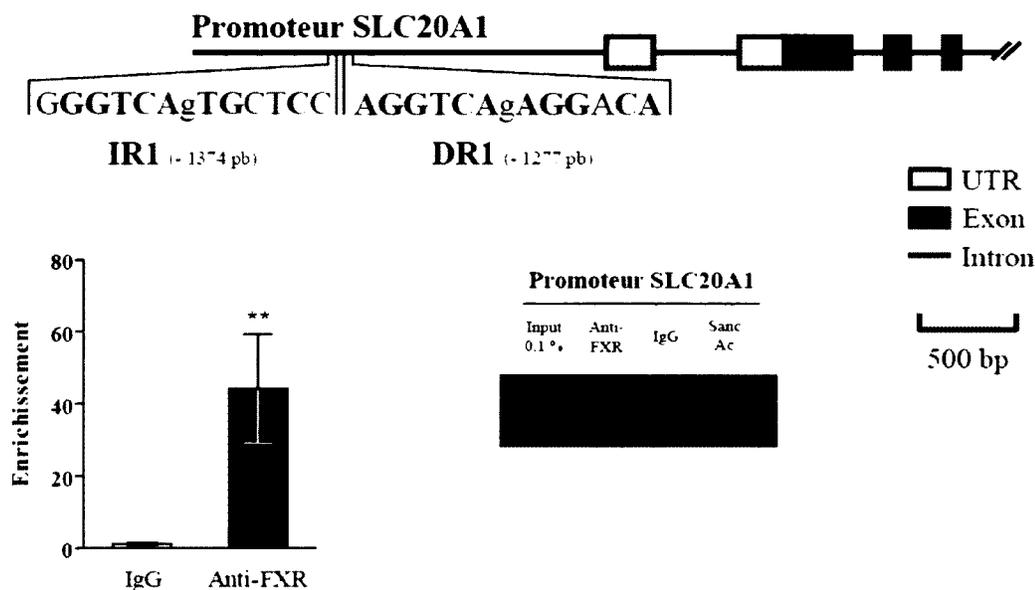
Analyse de l'expression relative par qPCR de l'ARNm de la cible SLC20A1 (en A.) et de FABP6 à titre de contrôle (en B.). Dans les deux cas, les résultats sont obtenus de trois expériences indépendantes qui comparent des cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence traitées avec 1 μM de GW 4064 pour 24 heures (colonnes noires) et des cellules contrôles traitées au DMSO (colonnes blanches). En plus, un traitement de 1 mM de 9cRA est effectué pour deux de ces conditions. L'expression des cibles est normalisée à l'expression de la *GAPDH* et les résultats sont présentés comme moyenne avec écart type (\*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

respectivement à 1 374 et 1 277 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Par technique d'immunoprécipitation de la chromatine réalisée dans des cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence et traitées au GW 4064 (1  $\mu$ M), on observe un enrichissement de l'occupation de cette région d'ADN par FXR qui est de 44,09 fois supérieure à la condition contrôle. Ces résultats suggèrent que FXR, en présence de son agoniste, peut être lié spécifiquement à cette région du promoteur de SLC20A1 (Figure 17).

Notre premier objectif qui était d'étudier le rôle transcriptionnel de FXR dans la régulation de fonctions intestinales non liées au métabolisme des acides biliaires a été accompli par les résultats présentés précédemment. Pour ce qui est de notre deuxième objectif de recherche, soit d'étudier la régulation différentielle des isoformes de FXR en contexte épithélial intestinal, nous avons analysé les deux promoteurs de FXR. Les résultats pour cet objectif sont présentés ci-contre.

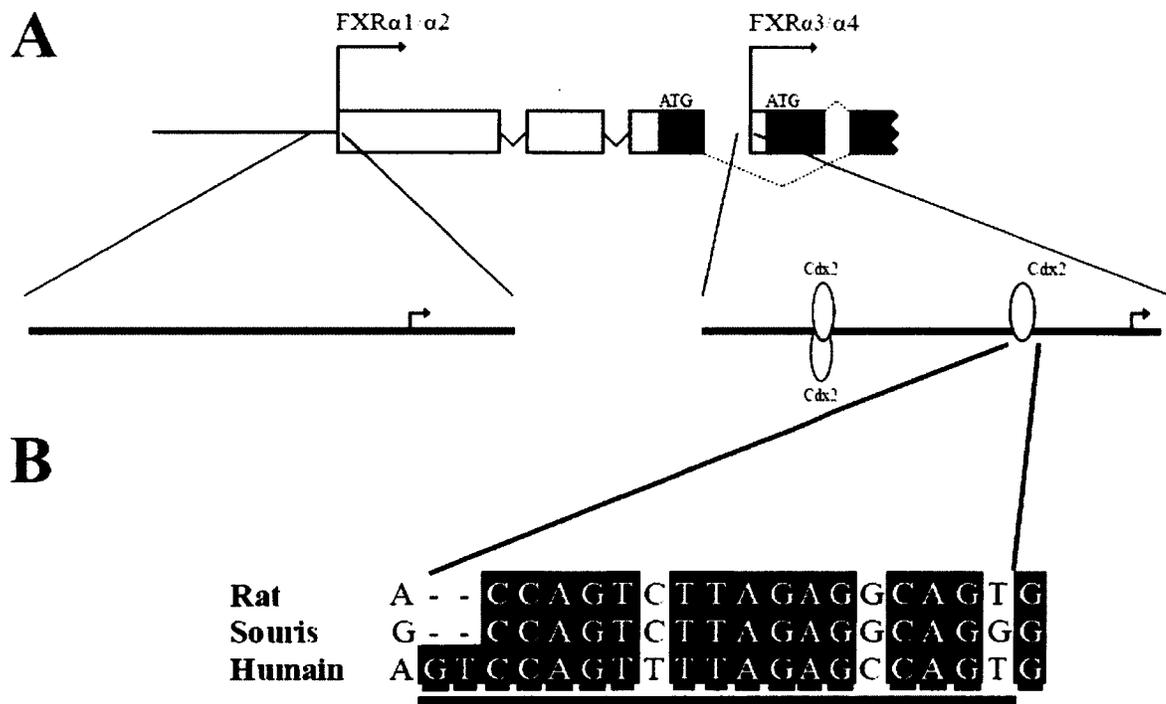
### **13. Le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 contient des éléments de réponse à Cdx2 et l'un d'entre eux est bien conservé**

Avec pour objectif d'étudier de quelle façon est régulée l'expression de FXR au niveau intestinal, des analyses des deux promoteurs de FXR ont été réalisées *in silico*. L'étude par analyses informatiques du promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 a permis l'identification de sites de liaison potentiels pour de nombreux facteurs de transcription. Les résultats obtenus à partir des analyses faites avec le logiciel MatInspector montrent que des sites de liaison pour le facteur Cdx2 sont uniquement présents au niveau du promoteur le plus interne de FXR, soit le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 (Figure 18A). L'élément de réponse du facteur Cdx2 est connu comme étant une région d'ADN riche en adénine et thymine. La séquence consensus est A/CTTTATA/G avec une orientation directe ou inversée (Alkhoury *et al.*, 2005). En plus de la présence de ces éléments, une analyse d'alignement des séquences pour le gène FXR du rat, de la souris et de l'humain montre une forte homologie de la séquence de liaison de Cdx2 au niveau de ces trois espèces pour le site le plus proximal de l'initiation de la transcription (Figure 18B).



**Figure 17. Immunoprécipitation de la chromatine ciblant une région où FXR se fixe sur le promoteur de SLC20A1**

ChIP réalisée sur des cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence traitées 24 heures avec  $1 \mu\text{M}$  de GW 4064. Les éléments de réponse potentiels à FXR sont présentés dans le schéma du gène et du promoteur de SLC20A1. Le panneau de gauche présente sous forme d'histogramme l'enrichissement de la région ciblée lorsqu'un anticorps Anti-FXR est utilisé (colonne noire) comparativement à un IgG de même isotype (colonne blanche). Cet enrichissement est calculé en tenant compte de l'enrichissement d'une région contrôle où il n'y a pas de FXRE potentiel. Les résultats proviennent de la combinaison de trois expériences indépendantes présentées comme une moyenne  $\pm$  écart type (\*\* =  $p < 0,01$ ). Le panneau de droite illustre une expérience représentative de ChIP où l'ADN enrichi et amplifié par PCR est migré sur gel d'agarose 2 %.



**Figure 18. Identification d'éléments de réponse potentiels à Cdx2 sur le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4**

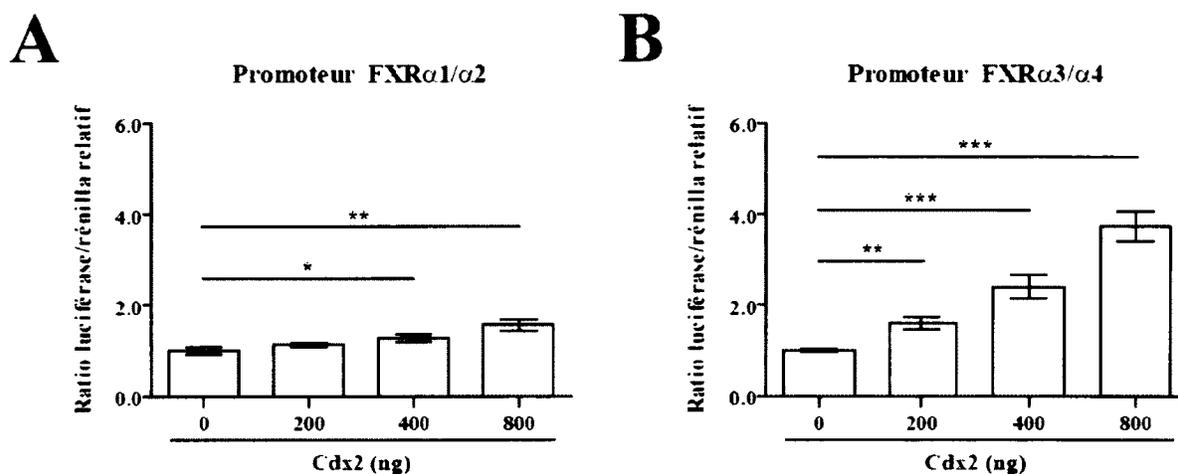
Résultats de l'analyse bioinformatique des promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4. **A.** Schéma présentant le gène codant pour FXR avec ses deux promoteurs. Des éléments de réponse potentiels pour Cdx2 sont localisés par des marqueurs jaunes. **B.** Alignement de séquences du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 de rat, de souris et d'humain pour un des éléments de réponse potentiel à Cdx2.

#### **14. Le facteur Cdx2 favorise une activation de la transcription au niveau du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4**

Afin de vérifier l'effet transcriptionnel de Cdx2 sur les promoteurs de FXR, des essais luciférase utilisant les promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 ont été réalisés dans les cellules 293T. Dans ce modèle, des conditions de transfection utilisant différentes quantités du vecteur d'expression pour la protéine Cdx2 humaine (pcDNA/Cdx2), soit 0, 200, 400 et 800 ng amènent des effets bien distincts selon l'utilisation du rapporteur pGL3-Basic+ FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 ou pGL3-Basic+ FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4. En effet, pour les conditions étudiées au niveau du promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2, on observe très peu de changements au niveau de l'activité luciférase, mis à part une légère augmentation dans les conditions utilisant 400 et 800 ng de vecteur pcDNA/Cdx2. Ces augmentations relatives au contrôle sont de l'ordre de 1,27 et 1,56 fois (Figure 19A). Pour ce qui est des conditions analysées au niveau du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4, l'activité luciférase augmente dès l'utilisation de 200 ng de vecteur pcDNA/Cdx2 et ce, à un niveau de 1,59 par rapport au contrôle. L'augmentation est d'autant plus importante lorsque 400 et 800 ng de vecteur pour l'expression de Cdx2 sont utilisés. On observe des augmentations respectives de 2,40 et 3,73 fois de l'activité luciférase par rapport au contrôle sans transfection de pcDNA/Cdx2 (Figure 19B).

#### **15. Cdx3-HA est capable de lier l'élément de réponse à Cdx2 dans des cellules Caco-2/15**

Pour vérifier si l'élément de réponse à Cdx2 le plus conservé est bel et bien fonctionnel, une immunoprécipitation de la chromatine a été mise au point pour cibler l'étiquette HA dans les cellules Caco-2/15. Ces cellules utilisées pour les CHIP sont confluentes et ont été transfectées avec un vecteur d'expression pour Cdx3-HA (pBAT Cdx3-HA). Comme validation de la technique, l'élément de réponse connu pour Cdx2 au niveau du promoteur de la sucrase-isomaltase est présenté à titre de contrôle. Il a été ciblé avec des amorces déjà établies comme fonctionnelles pour cet élément de réponse (Gendron *et al.*, 2006). On observe un enrichissement d'environ 40 fois de la présence de Cdx3-HA sur cette région d'ADN par rapport au contrôle IgG ce qui indique que la



**Figure 19. Effet de Cdx2 sur les promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4**

Les cellules 293T sont transfectées avec l'agent de transfection X-tremeGENE HP avec 400 ng de l'un ou l'autre des vecteurs rapporteurs, soit pGL3-Basic+ FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 (en A.) ou pGL3-Basic+ FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 (en B.) en plus de quantités croissantes (200, 400 et 800 ng) de pcDNA/Cdx2 et de 5 ng de vecteur phRL-SV40 Renilla. Le vecteur pcDNA3.1 sert de vecteur vide afin que la même quantité d'ADN plasmidique soit transfectée dans les cellules. Les résultats sont représentatifs de cinq expériences indépendantes effectuées en triplicata et sont présentés comme un ratio luciférase/rénilla relatif (avec moyenne et écart type) ayant comme niveau de base pour les comparaisons statistiques, la condition sans transfection de pcDNA/Cdx2 (\* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001).

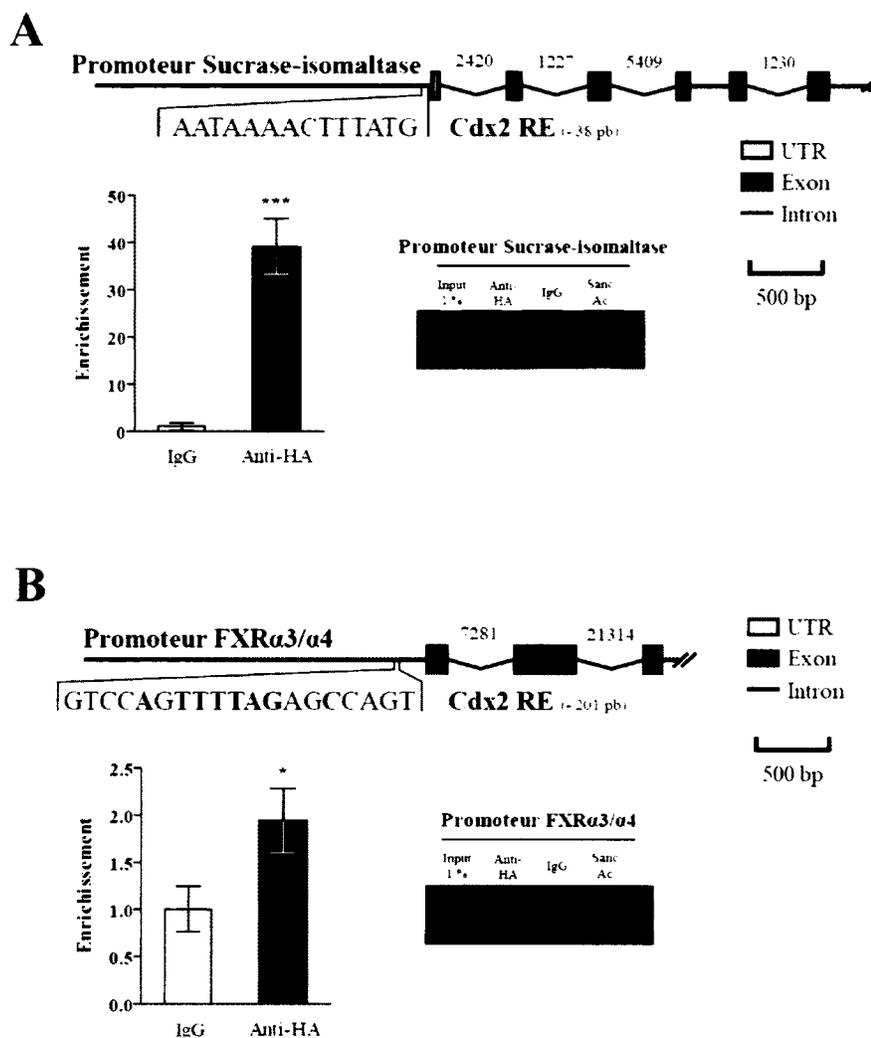
technique est valide pour l'utilisation de l'anticorps Anti-HA (Figure 20A). Pour ce qui est de notre promoteur d'intérêt, soit le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4, on observe un enrichissement d'environ 2 fois par rapport au contrôle sur l'élément de réponse potentiel situé à 201 pb en amont de l'initiation de la transcription. Nos résultats suggèrent donc que Cdx3-HA se lie à cette région de manière spécifique (Figure 20B).

#### **16. Les promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 contiennent des éléments de réponse à HNF1 $\alpha$ et HNF4 $\alpha$**

Afin de compléter les études des promoteurs de FXR, nous avons effectué des analyses informatiques avec le logiciel MatInspector. Notre objectif était d'identifier des éléments de réponse potentiels pour les facteurs de transcription HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$ . Ces deux facteurs ont été ciblés puisque tel que mentionné plus tôt, ils ont été identifiés comme régulant l'expression de FXR au niveau du promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 dans des cellules hépatiques (Lou *et al.*, 2007) et (Zhang *et al.*, 2004). Puisque nous étudions les promoteurs dans un modèle cellulaire intestinal, les analyses informatiques nous ont permis d'évaluer la présence d'éléments de réponse à HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$  au niveau des promoteurs. Sans surprises nous avons observé la présence d'éléments de réponse à HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$  au niveau du promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2. Pour le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4, quatre éléments de réponse potentiels à HNF1 $\alpha$  et un élément pour HNF4 $\alpha$  ont été identifiés (Figure 21).

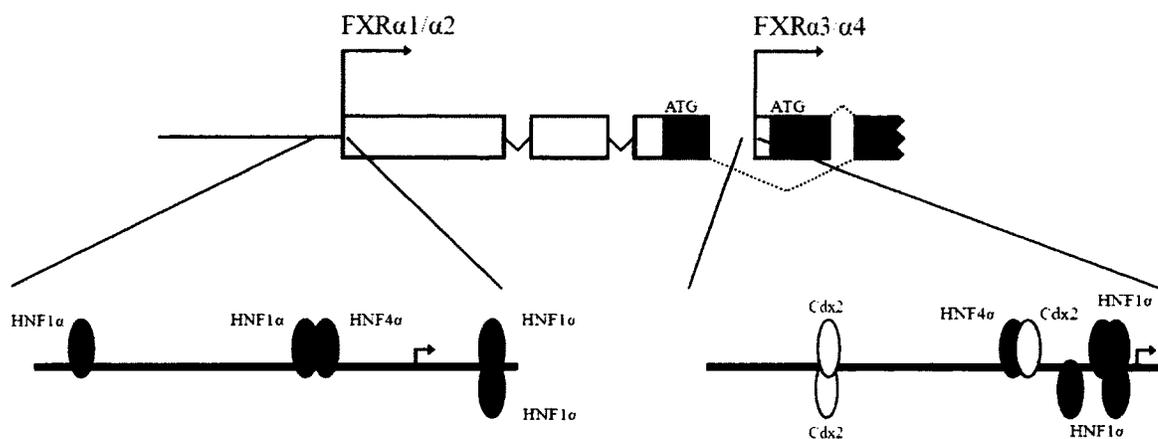
#### **17. Le facteur de transcription HNF1 $\alpha$ favorise l'activité transcriptionnelle au niveau des promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4**

Dans le but d'évaluer l'activité transcriptionnelle de HNF1 $\alpha$  au niveau des promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4, des essais luciférase ont été réalisés dans les cellules 293T. La transfection de quantités croissantes de vecteurs d'expression pour HNF1 $\alpha$  (pLenti HNF1 $\alpha$ , 200, 400 et 800 ng) résulte en une augmentation significative de l'activité luciférase sous le contrôle du promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2. Par contre, l'activité luciférase atteint rapidement un plateau à environ 20 fois d'augmentation et ce, peu importe les conditions utilisées au niveau de l'étude de ce promoteur (Figure 22A). Dans le cas du promoteur



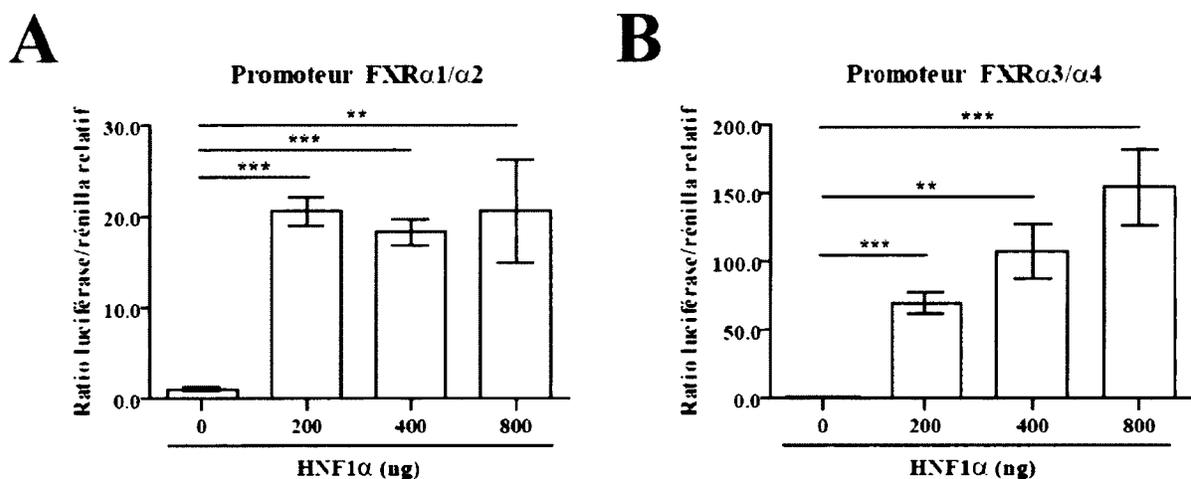
**Figure 20. Immunoprécipitation de la chromatine ciblant une région du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 ayant un élément de réponse potentiel à Cdx2**

ChIP de l'étiquette HA réalisée sur des cellules Caco-2/15 confluentes transfectées avec 10  $\mu$ g de vecteur d'expression pBAT Cdx3-HA permettant l'expression de Cdx3 couplé à l'étiquette HA. L'élément de réponse potentiel à Cdx2 est présenté dans le schéma des gènes et promoteurs de la sucrase-isomaltase (en A.) et de FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 (en B.). Le panneau de gauche présente l'enrichissement de la région ciblée lorsqu'un anticorps Anti-HA est utilisé (colonnes noires) comparativement à un IgG de même isotype (colonnes blanches). L'enrichissement est calculé en tenant compte de l'enrichissement d'une région contrôle où il n'y a pas d'éléments de réponse potentiels à Cdx2. Les résultats proviennent de la combinaison de trois expériences indépendantes (moyenne avec écart type (\* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ )). Le panneau de droite illustre une expérience représentative de ChIP où l'ADN enrichi et amplifié par PCR est migré sur gel d'agarose 2 %



**Figure 21. Identification d'éléments de réponse potentiels à HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$  sur les promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4**

Schéma présentant le gène de FXR avec ses deux promoteurs où des analyses bioinformatiques ont permis d'identifier des sites de liaison potentiels pour les protéines HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$ . Les éléments de réponse potentiels sont localisés par des marqueurs bleus pour HNF1 $\alpha$  et rouges pour HNF4 $\alpha$ . Les sites pour Cdx2 déjà identifiés sont présentés (en jaune).



**Figure 22. Effet de HNF1 $\alpha$  sur les promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4**

Les cellules 293T ont été transfectées avec l'agent de transfection Lipofectamine 2000 avec 400 ng d'un des deux vecteurs rapporteurs pGL3-Basic+ FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 (en A.) ou pGL3-Basic+ FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 (en B.) en plus de quantités croissantes (200, 400 et 800 ng) de pLenti HNF1 $\alpha$  et de 5 ng de vecteur phRL-SV40 Renilla. Le vecteur pLenti a servi de vecteur vide afin que la même quantité d'ADN plasmidique soit transfectée dans les cellules. Les valeurs sont le résultat de triplicata et sont présentées comme un ratio luciférase/rénilla relatif avec moyenne et écart type ayant pour niveau de base la condition sans transfection de pLenti HNF1 $\alpha$  (\*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

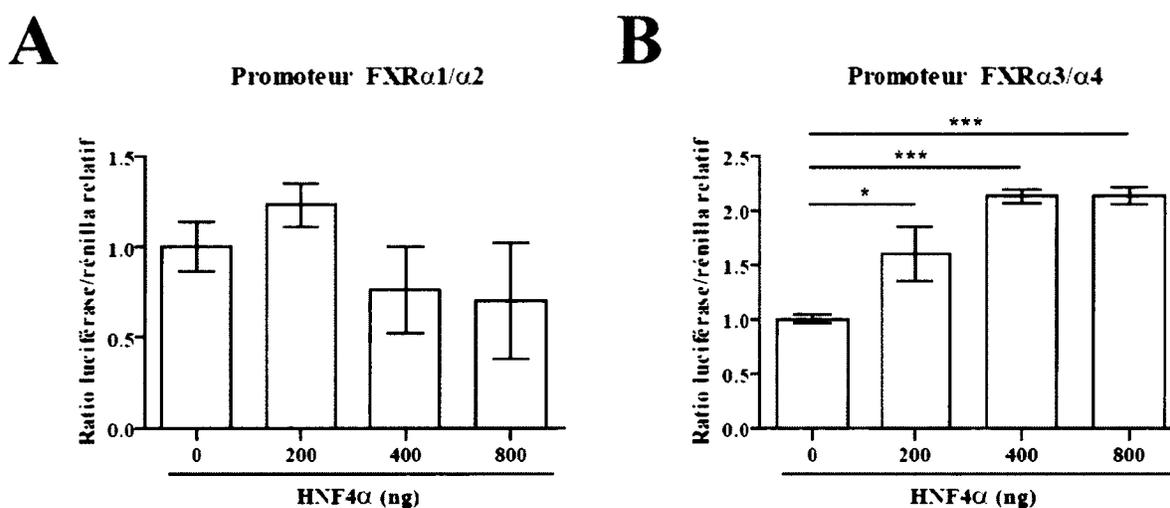
FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4, une induction croissante de l'activité luciférase est plutôt observée suite à l'ajout de vecteur d'expression pLenti HNF1 $\alpha$  comparativement à la condition contrôle. Plus précisément, cette forte augmentation de l'activité luciférase est de 69,67, 107,57 et 154,63 fois suite à la transfection de 200, 400 ou 800 ng de vecteur d'expression pLenti HNF1 $\alpha$  (Figure 22B). Ainsi, les deux régions promotrices de FXR répondent à la présence de HNF1 $\alpha$ , bien que l'effet sur le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 soit le plus impressionnant.

### **18. Le facteur de transcription HNF4 $\alpha$ favorise l'activité transcriptionnelle seulement au niveau du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4**

Pour déterminer l'activité transcriptionnelle de HNF4 $\alpha$  au niveau des promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4, des essais luciférase ont été effectués dans les cellules 293T. La transfection de HNF4 $\alpha$  n'amène pas de changement significatifs des niveaux d'activité luciférase sous le contrôle du promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2, et ce, même en présence de quantités croissantes du vecteur pBabe puro HNF4 $\alpha$  (Figure 23A). Par contre, nous observons une augmentation légère, de 1,60 fois par rapport au contrôle, de l'activité luciférase sous le contrôle du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 en présence de 200 ng de vecteur pBabe puro HNF4 $\alpha$ . Dès que 400 et 800 ng, de vecteurs sont transfectés, nous observons une saturation de l'activité luciférase à des niveaux du double de la condition contrôle (Figure 23B). Au final, il n'y a que le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 qui répond à la présence du vecteur d'expression pour HNF4 $\alpha$ .

### **19. La combinaison des facteurs Cdx2, HNF1 $\alpha$ et HNF4 $\alpha$ amène un profil d'activité transcriptionnel différent du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 comparativement au promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2**

Afin d'étudier l'effet de tous ces facteurs sur l'activité transcriptionnelle des deux promoteurs de FXR, des essais luciférase ont été réalisés. Les conditions de transfection varient selon différents motifs de combinaisons de vecteurs permettant l'expression de HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  et Cdx2. Lorsque HNF1 $\alpha$  est le seul facteur présent, nous observons une forte augmentation de l'activité luciférase sous le contrôle des promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et



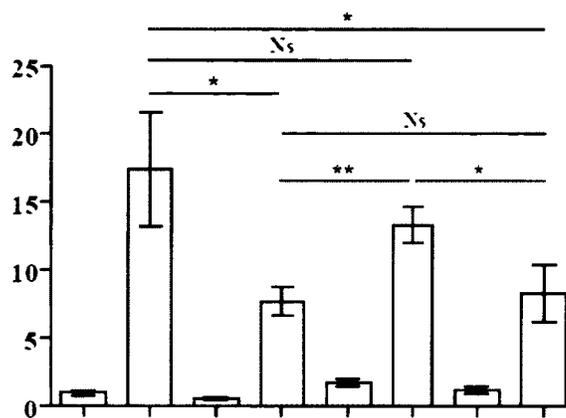
**Figure 23. Effet de HNF4 $\alpha$  sur les promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4**

La transfection des cellules 293T est réalisée avec la Lipofectamine 2000 avec 400 ng d'un vecteur rapporteur pGL3-Basic+ FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 (en A.) ou pGL3-Basic+ FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 (en B.) en plus de quantités croissantes (200, 400 et 800 ng) de vecteur pBabe puro HNF4 $\alpha$  et de 5 ng de vecteur phRL-SV40 Renilla. Le vecteur pBabe puro a servi de vecteur vide afin que la même quantité d'ADN plasmidique soit transfectée dans les cellules. Les résultats présentés ont été obtenus de triplicata et les valeurs sont un ratio luciférase/rénilla relatif avec moyenne et écart type ayant pour valeur de comparaison la condition sans transfection de pBabe puro HNF4 $\alpha$  (\*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001).

FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4, tel que déjà noté précédemment. L'ajout du facteur HNF4 $\alpha$  résulte en une réduction de l'activité luciférase d'environ 50 %, autant pour le promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 que FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4. La condition présentant le duo de facteurs HNF1 $\alpha$  et Cdx2 mène à une forte activité luciférase, mais pas significativement différente de la condition avec HNF1 $\alpha$  seul, et ce, pour les deux promoteurs. C'est lorsqu'on ajoute le facteur Cdx2 à la condition présentant le duo HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$  qu'une différence d'activité luciférase est observable entre les deux promoteurs étudiés. En effet, pour ce qui est du promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2, il n'y a pas d'induction supplémentaire de l'activité luciférase suite à la transfection de vecteur d'expression de Cdx2 en plus de ceux pour HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$ . Par contre, pour le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4, il y a une augmentation significative de l'activité luciférase dans les cellules où HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  et Cdx2 sont surexprimés, par rapport aux cellules où seul HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$  sont surexprimés. De plus, cette augmentation est du même ordre de grandeur que l'induction de l'activité luciférase suite aux conditions de surexpression de HNF1 $\alpha$  seul ou de celles combinant HNF1 $\alpha$  et Cdx2 (Figure 24).

**A****Promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2**

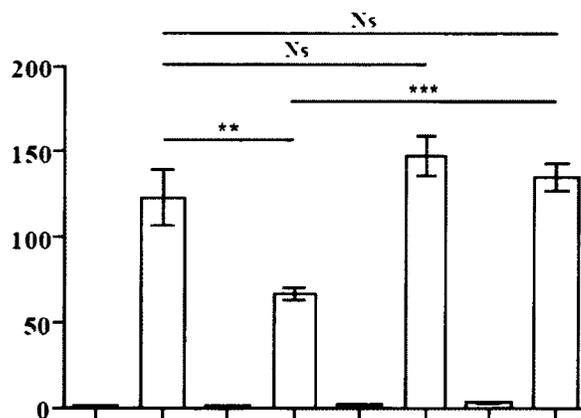
Ratio luciférase/rénilla relatif



Cdx2 (200 ng)	-	-	-	-	+	+	+	+
HNF1 $\alpha$ (200 ng)	-	+	-	+	-	+	-	+
HNF4 $\alpha$ (400 ng)	-	-	+	+	-	-	+	+

**B****Promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4**

Ratio luciférase/rénilla relatif



Cdx2 (200 ng)	-	-	-	-	+	+	+	+
HNF1 $\alpha$ (200 ng)	-	+	-	+	-	+	-	+
HNF4 $\alpha$ (400 ng)	-	-	+	+	-	-	+	+

**Figure 24. Effet d'une combinaison des facteurs Cdx2, HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$  sur les promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4**

Les cellules 293T sont transfectées à la Lipofectamine 2000 avec 400 ng du vecteur rapporteur pGL3-Basic+ FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 (en **A.**) ou pGL3-Basic+ FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 (en **B.**) en plus 5 ng de vecteur phRL-SV40 Renilla. Différentes combinaisons des vecteurs d'expression pour Cdx2 (pcDNA/Cdx2), HNF1 $\alpha$  (pLenti HNF1 $\alpha$ ) et HNF4 $\alpha$  (pBabe puro HNF4 $\alpha$ ) sont utilisées pour observer l'effet sur l'activité luciférase. Les vecteurs vides pcDNA3.1, pLenti et pBabe puro ont servi de vecteurs vides afin que la même quantité d'ADN plasmidique soit transfectée dans les cellules. Les résultats présentés sont représentatifs de cinq expériences indépendantes effectuées en triplicata. Les valeurs sont montrées comme un ratio luciférase/rénilla relatif avec moyenne et écart type ayant comme niveau de base pour les comparaisons statistiques, la condition sans transfection de pcDNA/Cdx2, pLenti HNF1 $\alpha$  ou pBabe puro HNF4 $\alpha$  (Ns = Non significatif, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ ).

## IV - DISCUSSION

Les recherches réalisées lors de ma maîtrise ont permis de montrer que dans un modèle cellulaire d'épithélium intestinal, les Caco-2/15, on observe une forte expression de FXR et que l'activité de cette protéine peut être modulée par son ligand dans ce modèle. Plus précisément, des processus biologiques modulables par l'activation de FXR sont suggérés par nos résultats de micro-puce à ADN. L'exploration plus approfondie des classes d'organisation du cytosquelette, d'adhésion biologique et de processus reliés aux filaments d'actine a montré que la régulation de ces processus n'a pas de conséquences sur l'étanchéité cellulaire et de restitution épithéliale dans ces cellules. Pour ce qui est de l'identification de nouvelles cibles transcriptionnelles à FXR, les résultats suggèrent le gène SLC20A1 comme nouvelle cible transcriptionnelle directe de FXR. Finalement, pour ce qui est de l'étude de l'expression de FXR dans le contexte épithélial intestinal, mes travaux suggèrent un processus de régulation de l'activité transcriptionnelle du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 distinct du promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 avec pour facteur clé la protéine Cdx2.

### **1. Le modèle cellulaire Caco-2/15 est un bon modèle pour étudier l'activation de FXR**

Pour ce projet de recherche, notre modèle principal est la lignée cellulaire Caco-2/15. Cette lignée de carcinome du côlon humain est un clone de la lignée parentale Caco-2 (Beaulieu et Quaroni, 1991). Elle a notamment la caractéristique de présenter une forte activité de l'enzyme de la bordure en brosse sucrase-isomaltase. Les cellules Caco-2/15 présentent la même propriété majeure des Caco-2 soit la formation post-mitotique d'une monocouche de cellules polarisées lors de la formation de jonctions cellules-cellules. Les cellules après environ 3 semaines forment des domaines membranaires apical et basolatéral distincts. L'organisation du cytosquelette et la présence de jonctions serrées fonctionnelles donnent à ces cellules une physiologie remarquablement similaire aux entérocytes différenciés ce qui en fait un très bon modèle épithélial intestinal (Chantret *et al.*, 1988). La limitation de ce modèle provient de l'origine des cellules qui tel que mentionné plus tôt est colorectale. Plusieurs études confirment cependant que lorsque bien différenciées, les

cellules Caco-2 présentent des propriétés d'absorption typiques du petit intestin. Ces propriétés comme l'absorption de lipides ainsi que la formation de chylomicrons et l'absorption de vitamines (telle la vitamine B12) et des acides biliaires font en sorte que les cellules Caco-2 et implicitement leur clone Caco-2/15, représentent de façon non distincte les segments jéjunum et iléon du petit intestin (Lakshmana Rao et Sankar, 2009); (Luchoomun et Hussain, 1999). Les cellules Caco-2 expriment, en plus de nombreux transporteurs apicaux et basaux, différents récepteurs nucléaires tels VDR, GR, PPAR, FXR, SHP et LRH-1 ce qui fait de ces cellules un outil pour les analyses d'expression génique. Dans les cellules Caco-2 cependant, les niveaux des récepteurs CAR et PXR sont faibles ou inexistants (Sun *et al.*, 2008). Le profil d'expression pour FXR a déjà été caractérisé au niveau des cellules Caco-2 (De Gottardi *et al.*, 2004). En effet, dans ces cellules, on observe une expression de FXR seulement à partir de 14 jours post-confluence. Nos résultats d'analyses qPCR et d'immunobuvardage de type western montrent que le modèle cellulaire Caco-2/15 présente une expression minimale et détectable de FXR, et ce, dès l'atteinte de la confluence (Figure 6, page 49). Cette présence précoce de l'expression de FXR fait des Caco-2/15 un modèle encore plus intéressant que les Caco-2. Même avec la présence de cette expression précoce de FXR, nous avons plutôt décidé de tester l'activation de FXR à des jours de confluence tels 15, 20 et 25 jours étant donné l'acquisition par les cellules de propriétés d'entérocytes différenciés et des possibilités que ce phénotype implique au niveau de différents processus biologiques.

L'activation de FXR a été testée avec son ligand synthétique le GW 4064 et ce, à diverses conditions afin de trouver celles étant optimales. Comme gènes cibles testés nous avons choisi SHP et FABP6, des cibles de FXR bien documentées, l'une pour son activité de régulation négative de l'expression de gènes et l'autre pour sa capacité à lier les acides biliaires (Bavner *et al.*, 2005) et (Kramer *et al.*, 2001). Les résultats d'analyses qPCR montrent que l'activation de *SHP* reste bien modeste comparativement à celle de *FABP6* (Figure 7, page 50). Ce n'est pas nécessairement surprenant si l'on prend en considération les rôles distincts de FXR au niveau du foie et de l'intestin. Comme mentionné, au niveau de la circulation entérohépatique des acides biliaires, le rôle de FXR dans le foie consiste à réguler négativement la synthèse des acides biliaires alors qu'au niveau de l'intestin il

consiste plutôt à favoriser leur absorption (Lee *et al.*, 2006); (Modica *et al.*, 2010). La fonction de SHP au niveau des hépatocytes comparativement aux entérocytes pourrait expliquer en partie la plus grande modulation de l'expression de *FABP6* dans notre modèle. C'est pour cela que pour le reste de nos expérimentations, le gène cible *FABP6* est celui qui est utilisé comme contrôle positif de l'activation de FXR. La condition de bases pour la majorité de nos traitements au GW 4064 a été établie comme un traitement de 24 heures avec une concentration de GW 4064 fixée à 1  $\mu$ M, le tout effectué sur des Caco-2/15 à 20 jours post-confluence. Ces conditions ont été préférées aux autres pour deux raisons principales. Premièrement, le traitement de 1  $\mu$ M, bien qu'il n'amène pas les niveaux d'expression les plus élevés, est considéré plus sûr que le traitement à 10  $\mu$ M sur la monocouche de Caco-2/15 bien différenciée où de nombreux récepteurs nucléaires sont exprimés. En effet, le GW 4064 est en mesure d'activer spécifiquement FXR jusqu'à des concentrations de 1  $\mu$ M (Maloney *et al.*, 2000) bien qu'une récente étude suggère qu'il puisse aussi agir à cette dose comme ligand des récepteurs reliés à l'œstrogène, notamment  $ERR\gamma$  *in vitro* (Dwivedi *et al.*, 2011). Deuxièmement, il se peut qu'à des concentrations trop élevées, l'agoniste mène à des activations non spécifiques et non physiologiquement pertinentes de FXR. Malgré cela, le GW 4064 reste un des meilleurs agonistes à FXR disponibles sur le marché car lorsqu'il est utilisé à des concentrations adéquates, il ne présente pas de risques de toxicité cellulaire qui seraient présents si des acides biliaires tels le CDCA étaient utilisés comme agoniste. Bien que des ligands synthétiques ayant une biodisponibilité supérieure au GW 4064 existent, comme le 6-ECDCA (INT 747), ils sont plus souvent utilisés lors d'études animales. Même s'il possède une grande biodisponibilité, le 6-ECDCA a une force de liaison à FXR inférieure par trois fois au GW 4064 (Pellicciari *et al.*, 2002). Dans le cas de notre modèle cellulaire Caco-2/15, le GW 4064 est un agoniste parfaitement adéquat puisque le traitement est effectué directement sur les cellules, éliminant ainsi le besoin d'un ligand à forte biodisponibilité, mais suscitant plutôt le besoin d'une forte affinité pour FXR.

## **2. FXR n'est pas impliqué dans la régulation de l'expression de certaines protéines de jonctions et de structure**

Des études portant sur FXR en contexte inflammatoire ont suggéré que l'activité transcriptionnelle de celui-ci au niveau des entérocytes, pouvait avoir un effet direct sur l'intégrité de la muqueuse intestinale (Gadaleta *et al.*, 2011). Cette idée que FXR, en contexte pathologique d'inflammation, puisse réguler l'intégrité épithéliale, nous a menés à nous intéresser à l'expression de cibles pouvant moduler cette intégrité. Puisque notre hypothèse est que FXR contribue au maintien d'un épithélium intestinal intègre et fonctionnel, nous avons décidé d'élargir l'idée de Gadaleta et ses collaborateurs à un contexte physiologique plutôt qu'inflammatoire. En effet, en contexte inflammatoire, des structures comme les jonctions cellulaires peuvent être affectées et il nous semblait intéressant de vérifier si dans un modèle physiologique, FXR aurait un rôle au niveau de ces jonctions. Dans notre modèle cellulaire utilisé pour mimer la physiologie normale de l'épithélium intestinal, nous avons vérifié la modulation de l'expression de l'ARNm et des niveaux d'expression protéiques de ZO-1, ZO-2, ZO-3, CLDN1, OCLN et de VIL1. Les cellules Caco-2/15 ont été traitées selon les conditions de base prédéterminées. Les protéines zonula occludens 1, 2 et 3 ainsi que la claudine 1 et l'occludine sont des protéines structurales des jonctions serrées de l'épithélium (Marchiando *et al.*, 2010). Puisque les jonctions serrées sont connues comme ayant la propriété de réguler l'étanchéité de la barrière épithéliale, nous avons voulu évaluer dans des conditions physiologiques, si l'activation de FXR pouvait mener à la régulation positive de l'expression de ces cibles. En plus, nous avons testé dans ces conditions l'expression de la villine qui est une protéine structurale importante au niveau du cytosquelette d'actine dans les microvillosités (Bretscher et Weber, 1979). Les résultats obtenus montrent que l'activation de FXR par son ligand dans les cellules Caco-2/15 ne module aucunement l'expression de ces cibles, que ce soit au niveau de l'ARNm ou protéique (Figure 8, page 53). Il se peut que nos conditions expérimentales ne contiennent pas les stimuli adéquats pour favoriser la régulation des cibles étudiées. En effet, dans des conditions physiologiques intestinales, on retrouve la présence d'une flore bactérienne qui peut créer une réponse immune dite physiologique mais plus faible qu'en contexte inflammatoire. L'ajout de LPS à faible concentration au

niveau du devis expérimental favoriserait peut-être une variation de l'expression ou de la localisation des protéines structurales. Il serait à déterminer si FXR, dans ces conditions, contribue au phénotype observé. Il faut également prendre en considération le fait que FXR, en temps normal, est activé par les acides biliaires dans un contexte d'absorption de nutriments. On peut alors se demander si l'ajout de lipides pourrait également servir de stimulus en plus de l'activation de FXR par le GW 4064. Ici, la recherche de cibles de FXR servant à maintenir la structure apicale des entérocytes suivant l'entrée de micelles de lipides dans la cellule serait pertinente.

### **3. L'analyse par micro-puce à ADN de l'effet d'une activation de FXR suggère de nouveaux processus biologiques et de nouveaux gènes cibles potentiels pour FXR**

Avec notre traitement au GW 4064 (1  $\mu$ M) dans les cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence pendant 24 heures, nous avons réalisé une expérience de type micro-puce à ADN. L'avantage d'une telle stratégie est qu'il est possible de déterminer à large échelle quels gènes sont régulés par un facteur de transcription. Pour un récepteur nucléaire avec un ligand connu tel que FXR, une telle stratégie peut être avantageuse puisqu'il est alors possible de contrôler le temps et le niveau d'exposition au ligand et donc d'avoir une fenêtre d'activation contrôlée de l'activité transcriptionnelle du facteur étudié. Dans notre cas, on observe seulement les gènes qui sont activés après 24 heures de traitement. Il se peut fort bien que certains soient activés plus tôt, d'autres plus tard où bien que les résultats pour certaines cibles soient le produit d'une cascade d'évènements faisant d'eux des gènes cibles indirects. Ce sont là les limitations de cette méthode. Un des avantages majeurs par contre est qu'il est possible de classer les gènes modulés en différents processus biologiques. Avec les gènes modulés significativement dans notre micro-puce, des analyses informatiques de classification ont montré que dans les 10 processus biologiques les plus régulés, on retrouve les processus d'organisation du cytosquelette et d'adhésion biologiques ainsi que des processus liés aux filaments d'actine (Tableau 7, page 54). Ces résultats sont intéressants du fait que ces processus biologiques peuvent fort bien être impliqués dans le maintien de l'intégrité épithéliale intestinale. En effet, le maintien de l'étanchéité des

jonctions cellulaires et de l'adhésion cellules-cellules est un processus qui requiert un cytosquelette d'actine dynamique (Rodgers et Fanning, 2011).

Il est connu que la résistance transépithéliale des cellules Caco-2/15 augmente avec la confluence (Sun *et al.*, 2012). Nous voulions donc déterminer si l'activation de FXR régule à la hausse cette résistance qui est un signe d'une plus grande étanchéité épithéliale. Les premières expériences de mesure de résistance transépithéliale effectuées lors du processus de différenciation des cellules Caco-2/15 de 0 à 30 jours post-confluence montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre des cellules traitées ou non au GW 4064 1  $\mu$ M jusqu'à 20 jours post-confluence. Cependant, on observe une diminution de 18 % de la TEER de la condition où FXR est activé par rapport au contrôle, et ce, à 30 jours post confluence (Figure 9, page 56). Ces résultats à 30 jours sont surprenants puisque nous n'avons pas démontré que l'expression de protéines impliquées dans cette résistance au niveau des jonctions serrées variait avec l'activation de FXR (Figure 8, page 53). Dans les cellules Caco-2/15, l'effet observé n'est pas causé par une variation dans les niveaux d'expression de FXR puisque ceux-ci ne diffèrent pas entre 20 et 30 jours post-confluence (Figure 6, page 49). Il se pourrait que la diminution observée soit causée par un effet chronique du GW 4064 étant donné la longue durée du traitement sur les cellules. Tel que déjà mentionné, le GW 4064 peut activer un autre récepteur nucléaire que FXR, soit  $ERR\gamma$  (Dwivedi *et al.*, 2011). On peut donc supposer que l'agoniste, après un traitement de longue durée, est en mesure d'activer d'autres récepteurs nucléaires. Ces activations moins spécifiques pourraient notamment résulter en des modulations de processus biologiques tels l'apoptose, l'adhésion entre les cellules ou la matrice et la réponse inflammatoire, ce qui expliquerait la diminution de résistance transépithéliale observée, et ce, par une altération de la monocouche de cellules Caco-2/15. Au niveau de l'effet chronique de la molécule GW 4064 en tant que telle, peu d'études ont été effectuées, mais on sait tout de même que la relaxation du muscle lisse est altérée, notamment au niveau d'artères où la vasorelaxation est grandement inhibée (Kida *et al.*, 2009). En effet, la sensibilité à l'oxyde nitrique du muscle vasculaire lisse d'explants artériels de lapin est réduite suite à une stimulation chronique de FXR avec le GW 4064 (10  $\mu$ M).

Comme autre expérience de mesure de résistance transépithéliale, nous avons effectué des mesures sur des cellules Caco-2/15 surexprimant à l'aide d'infection lentivirale une protéine FXR couplée à une étiquette HA. Cette surexpression amène des niveaux de FXR élevés et stables de 0 à 20 jours post-confluence (Figure 10A, page 57). Suite à l'activation de FXR par le GW 4064 dans ces cellules bien différenciées, nous observons une augmentation significative de 10 % de la résistance transépithéliale (Figure 10B, page 57). Ces résultats suggèrent que FXR peut augmenter la TEER au niveau d'une monocouche de cellules Caco-2/15 en condition de surexpression de FXR et d'activation par un agoniste durant 24 heures. Puisque ces résultats ont été obtenus dans des cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence et qu'en temps normal, la résistance transépithéliale est relativement stable et maximale dès 10 jours (Figure 9, page 56), on peut supposer que le même essai de surexpression de FXR à 5 jours où même dès l'atteinte de la confluence mènerait à une augmentation de TEER plus importante que 10 %, étant donné que celle-ci n'a alors pas encore atteint un niveau plateau. De telles expérimentations restent cependant à effectuer pour vérifier si la surexpression de FXR au début du processus de différenciation des cellules Caco-2/15 mène à une augmentation significative de la résistance transépithéliale, indiquant un rôle possible pour FXR au niveau de l'étanchéité cellulaire.

Suite à l'obtention de résultats intéressants mais imparfaits sur le rôle de FXR dans la résistance transépithéliale, nous nous sommes tournés vers l'étude d'un processus impliquant une réorganisation du cytosquelette d'actine, soit la restitution épithéliale. C'est un processus par lequel, lorsqu'endommagées, les cellules épithéliales réparent la monocouche, entre autres, par la migration cellulaire. Cette action est indépendante de la prolifération cellulaire et se déroule comme suit : les cellules polarisées sur le bord de la blessure se dédifférencient et migrent pour refermer la blessure. Une fois la blessure refermée, les cellules se repolarisent. Lors de la migration cellulaire, les lamellipodes proviennent du désassemblage des microvillosités de la bordure en brosse et le cytosquelette d'actine avec les myosines agit comme tapis roulant pour faire progresser ces lamellipodes. La régulation de la formation de points d'adhésions focaux avec des intégrines permet l'adhésion des cellules qui peuvent ainsi migrer et refermer la blessure

(Blikslager *et al.*, 2007); (Seltana *et al.*, 2010). Nous avons voulu vérifier si la restitution épithéliale des cellules Caco-2/15 est plus rapide lorsque FXR est activé par son ligand. En effet, en plus d'avoir documenté par nos expériences de micro-puce à ADN qu'une activation de FXR modulerait l'expression de gènes associés à l'organisation du cytosquelette, nous savons que les acides biliaires sont toxiques pour la cellule (Yamada, 2009). Cela nous porte à croire qu'en contexte physiologique, l'activation de FXR par les acides biliaires pourrait stimuler la restitution épithéliale pour contrer l'effet dommageable de ces molécules présentes dans les micelles de lipides absorbées à la surface apicale des entérocytes. Pour évaluer le rôle protecteur de FXR, nous avons réalisé des essais de blessures dans les cellules Caco-2/15 à 5 jours post-confluence. Le traitement au GW 4064 a duré 72 heures, soit le temps complet laissé aux cellules pour migrer. Nous avons observé une migration des cellules au-delà de la marge de la blessure, et ce, autant dans la condition contrôle que dans celle où FXR est activé (Figure 11A, page 59). En quantifiant la distance de migration des cellules, nous avons montré qu'il n'y a pas de différences significatives de l'étendu de la migration des cellules lorsque FXR est activé (Figure 11B, page 59). Ces résultats suggèrent que FXR ne serait pas impliqué dans le mécanisme de restitution épithéliale au niveau des Caco-2/15, et ce, même si FXR est bel et bien actif à 5 jours post-confluence. En effet, des analyses qPCR des cellules utilisées pour les essais de blessure montrent que le transcrite de FABP6 est augmenté lors du traitement par rapport au contrôle (Figure 11C, page 59). On peut donc supposer que dans nos conditions expérimentales, le motif de gènes cibles de FXR associé aux sels biliaires est actif.

De manière générale, il peut être difficile à partir d'un processus biologique de déterminer quels gènes précis sont régulés par FXR. Une stratégie de confirmation de la variation de l'expression de cibles de FXR par qPCR est donc utilisée. Comme cibles intéressantes révélées par notre expérience de micro-puce à ADN, les myosines IA et VIIA ont attiré notre attention. Dans les entérocytes, des faisceaux d'actine parallèles ( $\approx 10$  à  $30$ ) servent à supporter les microvillosités qui sont de petites projections de la membrane plasmique ( $\approx 1$  à  $5 \mu\text{m}$ ). La présence d'une haute densité de ces microvillosités amène un problème, à savoir que la tension de surface de la membrane plasmique tend à promouvoir un état où celle-ci est fusionnée et donc, dépourvue de microvillosités (Nambiar *et al.*,

2010). C'est là que des protéines motrices comme MYO1A et MYO7A entrent en jeu, et ce, de deux façons bien précises. Premièrement elles favorisent le transport de composantes des microvillosités telles des enzymes de la bordure en brosse et deuxièmement, ces myosines génèrent une force d'adhésion entre la partie intérieure de la membrane plasmique et les faisceaux d'actine (Nambiar *et al.*, 2010). La myosine IA, une des plus abondantes, est essentielle au maintien de la bordure en brosse épithéliale et permet également la sécrétion de vésicules par les entérocytes (Tyska *et al.*, 2005); (McConnell et Tyska, 2007). Dans un modèle de souris où l'expression de la myosine IA est abolie, on observe en effet des défauts au niveau de la membrane, du cytosquelette et de l'expression d'enzymes de la bordure en brosse des entérocytes (Tyska *et al.*, 2005). La protéine myosine VIIA quant à elle, aurait des fonctions similaires à la myosine IA au niveau des microvillosités, mais elle est mieux connue pour son implication dans le maintien de la structure des stéréocils (Nambiar *et al.*, 2010). Nos expériences de quantification d'expression de l'ARNm indépendantes à notre micro-puce montrent que l'activation de FXR mène à une augmentation significative de 1,56 fois pour MYO1A et 1,77 fois pour MYO7A de l'expression de l'ARNm par rapport à la condition contrôle (Figure 12, page 60), suggérant un lien potentiel entre l'activation de FXR et le maintien des microvillosités dans les entérocytes.

Une autre cible dont nous avons voulu confirmer la modulation est la dystonine. Cette protéine est membre de la famille des plakines et une composante des hémidesmosomes. Elle est présente dans les épithéliums et contribue à l'adhésion de la membrane cellulaire aux filaments intermédiaires du cytosquelette d'actine (Sonnenberg et Liem, 2007). Il a également été montré que la protéine participe au maintien de la polarité des kératinocytes (Hamill *et al.*, 2009). Au niveau de notre modèle cellulaire épithélial intestinal, on observe une augmentation de l'expression de l'ARNm de DST lorsque FXR est activé. Cette augmentation significative est quantifiée à un niveau de 2,40 fois par rapport au contrôle (Figure 12, page 60). Dans le même ordre d'idées, nos résultats montrent que l'expression du transcrite de la vinculine augmente de 1,36 fois suite à l'activation de FXR dans les cellules Caco-2/15 à 20 jours post-confluence (Figure 12, page 60). La vinculine est une protéine qui est localisée au niveau de l'interface cellule-matrice

régulée par les intégrines ainsi qu'au niveau de jonctions cellules-cellules régulées par les protéines cadhérines. Un des rôles de la vinculine est de permettre, lorsque sous sa forme active, la maturation des points focaux d'adhésion, ce qui peut favoriser la migration des cellules (Carisey et Ballestrem, 2011). Bien que l'expression de l'ARNm de la vinculine augmente lorsque FXR est activé dans les cellules Caco-2/15, il faut prendre en considération que cette induction n'est sans doute pas suffisante pour favoriser un processus biologique comme la migration cellulaire, considérant l'absence d'effet de l'activation de FXR lors de nos essais de blessures (Figure 11, page 59). Néanmoins, la modulation significative de l'expression de la vinculine reste tout de même intrigante.

Le dernier gène dont nous avons confirmé la modulation de l'expression de l'ARNm suite à l'activation de FXR est celui de la néphrocystine 1. Pour ce gène, l'expression du transcrit est 1,40 fois plus élevé dans la condition traitée par rapport au contrôle (Figure 12, page 60). La famille des protéines néphrocystines est bien étudiée au niveau du rein où il est établi que des mutations dans les gènes de cette famille causent une maladie rénale, la néphronophytose. Dans un contexte plus général et non pathologique, *NPHP1* est régulé à la hausse lors de la polarisation de cellules épithéliales et serait requis pour la formation adéquate des jonctions serrées, du moins dans le modèle cellulaire épithélial de rein MDCK (Delous *et al.*, 2009). Advenant un rôle similaire dans les cellules épithéliales intestinales et considérant les processus biologiques modulés par l'activation de FXR lors de notre étude de micro-puce, il se pourrait que l'activation de FXR mène à l'augmentation de l'expression de *NPHP1*, contribuant ainsi au maintien d'un épithélium intestinal fonctionnel.

Avec la confirmation de nos résultats d'expression de micro-puce à ADN par expériences de qPCR, nous avons établi que l'activation de FXR mène à une régulation positive de l'expression des gènes *MYO1A*, *MYO7A*, *DST*, *VCL* et *NPHP1*. Pour évaluer si les augmentations observées sont le résultat d'une activité transcriptionnelle directe de FXR et non d'une cascade d'évènements, nous avons effectué des analyses d'immunoprécipitation de la chromatine en ciblant FXR. Des analyses informatiques nous ont permis d'identifier des FXRE potentiels pour les cibles *MYO1A*, *MYO7A* et *DST*,

mais pas pour VCL et NPHP1. Pour MYO1A et MYO7A, ces éléments ne sont pas directement situés au niveau du promoteur, mais plutôt dans des introns (Figure 13A et B, page 62). Cette observation n'est pas surprenante puisqu'il a été établi par analyse génomique par CHIP-seq que 31 % des sites de liaison de FXR sont situés au niveau d'introns, alors que seulement 16 % sont 10 kb en amont des gènes (Thomas *et al.*, 2010). On sait que la chromatine présente une certaine flexibilité et que des éléments de réponse qui ne sont pas nécessairement dans le promoteur proximal du gène peuvent contribuer à la transcription du gène. Par exemple, au niveau du gène SHP, deux FXRE sont documentés. L'un est localisé au niveau du promoteur proximal et l'autre dans un intron suivant la région 3' UTR du gène. Il a été déterminé que ces deux éléments sont fonctionnels et qu'ils mènent à la formation d'une boucle dans l'ADN qui devient alors très accessible aux facteurs de transcription généraux (Li *et al.*, 2010).

Même si la localisation des éléments de réponse identifiés pour nos cibles d'intérêt n'est pas classique, il se peut que ceux-ci soient fonctionnels. Par contre, l'absence de FXRE pour les cibles VCL et NPHP1 suggère plutôt que l'augmentation d'expression de l'ARNm observée ne serait pas le résultat d'une liaison directe de FXR dans le promoteur ou dans une autre région de ces gènes. À notre surprise, nos analyses de CHIP montrent que pour les éléments de réponse potentiels identifiés, il n'y a pas d'enrichissement de la liaison de FXR (Figure 13, pages 62 et 63). Cela nous suggère que MYO1A, MYO7A et DST ne sont pas des gènes cibles directs de FXR et que ces gènes pourraient être régulés de façon indirecte par des mécanismes encore non identifiés, tout comme VCL et NPHP1. Il se peut également que la zone d'ADN testée pour la présence d'éléments de réponse lors des essais de CHIP ne soit pas la bonne. De plus, plusieurs des FXRE identifiés ont des motifs imparfaits qui ne suivent pas les combinaisons classiques telles IR1, DR1 et ER8 (Figure 4, page 11). La présence d'autres récepteurs nucléaires près de sites de liaisons peut également être requise pour l'activation de la transcription de ces gènes dans un complexe protéique avec FXR. Par exemple, on sait que le récepteur nucléaire LRH-1 peut se lier aux mêmes éléments de réponse que FXR et mener à un effet de synergie. La contribution avec LRH-1 serait surtout pertinente pour la régulation de l'expression de gènes régulant le métabolisme des lipides (Chong *et al.*, 2010); (Chong *et al.*, 2012), mais d'autres récepteurs

pourraient avoir cette action dans notre modèle cellulaire et dans les processus que nous avons étudiés.

#### **4. Découverte de SLC20A1 comme nouvelle cible transcriptionnelle de FXR dans le modèle Caco-2/15**

Dans le but de trouver une nouvelle cible transcriptionnelle directe à FXR, nous avons effectué un criblage de l'expression de différents gènes dans nos conditions de traitement sur les cellules Caco-2/15. Ces expériences de qPCR ont été faites en classifiant les gènes selon deux critères de sélection, soit ceux modulés selon nos résultats de micro-puce ou bien ceux présentant un ou des sites de liaison potentiels à FXR dans leur promoteur et ce, déterminé par l'analyse d'une banque de données de ChIP-seq (Thomas *et al.*, 2010). Sous forme schématique (Figure 15, page 65), 31 gènes présentent nos deux critères de sélection, alors que 25 et 26 ont été choisis respectivement selon les résultats de micro-puce et les études de promoteurs. 16 gènes ont été testés pour d'autres raisons.

Nous avons trouvé que l'activation de FXR mène à la modulation de l'expression de SLC20A1, et ce, même si initialement ce gène n'a pas été identifié dans notre micro-puce mais plutôt à partir de la possibilité de FXR à lier son promoteur. Néanmoins, les résultats de nos analyses qPCR montrent que l'activation de FXR dans les cellules Caco-2/15 bien différenciées augmente significativement de 1,68 fois l'expression de l'ARNm de SLC20A1 par rapport au contrôle (Figure 16A, page 67). Dans le cas de cette cible, nous avons vérifié si un traitement avec le GW 4064 combiné à l'acide 9-cis rétinolique, le ligand de RXR, peut mener à l'activation synergique de la transcription, telle que documenté par exemple pour *FABP6* (Figure 16B, page 67). Ce n'est cependant pas ce qui est observé pour SLC20A1, suggérant donc une activation possiblement exclusive via FXR. Pour déterminer si SLC20A1 est un gène cible direct de FXR, contrairement aux gènes *MYO1A*, *MYO7A*, *DST*, *VCL* et *NPHP1*, nous avons fait un essai par ChIP à l'image de ce qui a été fait pour tester les autres cibles. Nos résultats d'analyses du promoteur ont en premier lieu identifié des éléments de réponse IR1 et DR1 situés précisément à l'emplacement que l'analyse du ChIP-seq prédisait. L'immunoprécipitation de la chromatine elle-même

montre que la région englobant ces deux éléments de réponse est enrichie de 44,09 fois pour la présence de FXR par rapport au contrôle (Figure 17, page 69). Nos résultats montrent que FXR peut se lier au promoteur du gène SLC20A1 et que l'activation de FXR par son ligand synthétique mène à une augmentation de la transcription de ce gène. Ces résultats suggèrent que SLC20A1 est une cible transcriptionnelle directe de FXR.

SLC20A1 est un transporteur de phosphate inorganique sodium-dépendant. Il permet notamment le transport du phosphate extracellulaire vers l'intérieur de la cellule et a été détecté au niveau de la surface apicale des entérocytes (Sabbagh *et al.*, 2011). Plus spécifiquement, une étude a caractérisé son expression au niveau de l'intestin du rat. On y découvre que l'expression de l'ARNm de SLC20A1 augmente du duodénum vers le jéjunum pour être maximale au niveau de l'iléon (Giral *et al.*, 2009). Ces informations sont très intéressantes puisque tel que déjà mentionné, FXR est plus fortement exprimé au niveau de l'iléon et nos résultats de CHIP supportent que SLC20A1 est une cible directe de FXR dans notre modèle cellulaire. SLC20A1, une protéine qui régule l'absorption du phosphate peut être un indicateur que la classe des processus métaboliques liés au phosphore, identifiée par notre analyse par micro-puce mais initialement mise de côté. (Tableau 7, page 54), est une piste pour l'identification d'une nouvelle fonction de la protéine FXR dans l'intestin. L'activation de FXR se produisant majoritairement dans l'iléon et menant à l'expression maximale de SLC20A1 dans cette région, est peut-être le reflet d'un mécanisme d'absorption actif du phosphate inorganique qui n'aurait pas été préalablement bien absorbé au niveau du duodénum et du jéjunum. Ce mécanisme pourrait contribuer à éviter les pertes de phosphore lors de l'absorption des nutriments. On peut donc supposer que FXR via SLC20A1, contribue au bon maintien du niveau de phosphate inorganique absorbé par l'organisme. Également, on peut se demander si l'activation de FXR dans un contexte pathologique de malabsorption du phosphore dans l'intestin pourrait rétablir cette absorption via SLC20A1. Il serait intéressant d'effectuer plus de recherches en ce sens, que ce soit par des modèles *in vitro* ou *in vivo*.

## 5. Cdx2 favorise l'activation du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 par rapport au promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2

Avec notre second objectif qui est d'étudier la régulation de l'expression de FXR dans le contexte épithélial intestinal, nous avons fait des analyses informatiques des promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 afin de trouver des sites de liaisons potentiels de facteurs de transcription différenciellement présents au niveau de ces promoteurs. Nos analyses montrent des sites de liaison potentiels pour Cdx2 au niveau du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 alors que de tels sites sont absents de l'autre promoteur (Figure 18A, page 70). Le facteur de transcription Cdx2 est exprimé dans l'épithélium intestinal, et ce, de manière quasi exclusive (Moskaluk *et al.*, 2003). Cdx2 favorise la différenciation cellulaire et contrôle notamment l'expression du gène de l'enzyme sucrase-isomaltase, une enzyme digestive du sucrose (Suh et Traber, 1996). C'est un facteur essentiel qui dirige le développement intestinal (Beck *et al.*, 1999). Le fait que l'on retrouve des sites de liaison pour Cdx2 exclusivement au niveau du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 est très intéressant. En effet, comme mentionné dans l'introduction, les isoformes de FXR les plus exprimés dans l'intestin sont justement FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4 (Huber *et al.*, 2002). Il se pourrait alors que l'expression spécifique de ces isoformes dans l'intestin soit attribuable à l'expression de Cdx2 dans ce tissu et à son absence au niveau du foie.

Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué des essais luciférase en utilisant différentes quantités du vecteur d'expression pour Cdx2. Cdx2 semble, tel qu'attendu, pouvoir activer de manière plus importante le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 (Figure 19, page 72). Le fait que Cdx2 amène peu de variations dans l'activité du promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 n'est pas surprenant puisqu'aucun élément de réponse au facteur n'a été identifié sur ce promoteur. Afin de déterminer si Cdx2 peut occuper le promoteur de FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 dans notre modèle cellulaire, la technique de CHIP a été utilisée. La région de la chromatine choisie pour analyse est celle contenant l'élément de réponse à Cdx2 le plus proximal à l'initiation de la transcription, puisque c'est cet élément seul qui présente une homologie de séquence entre les espèces (Figure 18B, page 70). Cette homologie entre le rat, la souris et l'humain supporte la fonctionnalité de cet élément de réponse. Tel qu'attendu, nos analyses de CHIP

confirment qu'il y a un enrichissement de la liaison de Cdx2 (Cdx3-HA) au niveau de la région étudiée du promoteur (Figure 20B, page 74). Au final, on peut supposer que la présence d'un élément de réponse à Cdx2 conservé et fonctionnel mène à l'activation du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 dans les cellules intestinales comparativement au promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 qui lui y serait activé de manière minimale.

#### **6. HNF1 $\alpha$ et HNF4 $\alpha$ ont également des sites de liaisons potentiels au niveau du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 et mènent à l'activation de ce promoteur**

Tel que déjà mentionné dans l'introduction, l'étude de la régulation de l'expression de FXR a été effectuée surtout au niveau du foie, et donc, pour le promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2. HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$  sont des facteurs de transcription capables de réguler l'expression de FXR dans différents contextes (Lou *et al.*, 2007); (Zhang *et al.*, 2004). Ces deux facteurs étant exprimés tant au niveau du foie qu'au niveau de l'intestin (Pontoglio, 2000); (Babeu *et al.*, 2009), nous avons voulu déterminer si le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 présente lui aussi des éléments de réponses pour HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$  et ce, par analyses informatiques. Nos résultats montrent la présence de quatre sites potentiels pour HNF1 $\alpha$  et d'un site potentiel pour HNF4 $\alpha$  au sein du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 (Figure 21, page 75). Afin d'évaluer l'impact de ces facteurs sur la transcription de FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4, nous avons réalisé des essais luciférasés utilisant différentes quantités de vecteurs d'expression de HNF1 $\alpha$  ou de HNF4 $\alpha$ . À titre de contrôle, l'expérimentation a également été réalisée au niveau du promoteur «hépatique» FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2.

Pour ce qui est de l'effet de HNF1 $\alpha$  sur les deux promoteurs de FXR, l'induction de l'activité luciférase est beaucoup plus forte au niveau du promoteur «intestinal» FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 alors qu'elle se stabilise rapidement pour le promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 (Figure 22, page 76). Puisque HNF1 $\alpha$  est connu comme facteur régulant l'expression de FXR au foie, on peut supposer, vu l'activation très forte du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4, que le facteur de transcription HNF1 $\alpha$  est aussi un facteur majeur régulant l'expression de FXR dans l'intestin. Ainsi, on note que l'utilisation de 200 ng de vecteur d'expression de HNF1 $\alpha$  mène à une forte

activation au niveau du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 et à l'activation maximale du promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2.

Pour ce qui est de l'effet de HNF4 $\alpha$  sur les deux promoteurs, les essais luciférases effectués dans les mêmes conditions que pour HNF1 $\alpha$  montrent que le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 a son activité saturée lorsque 400 ng de vecteur d'expression est utilisé, l'activité luciférase n'étant que doublée dans ces conditions (Figure 23, page 78). On peut donc supposer que l'importance de HNF4 $\alpha$  est moindre que celle de HNF1 $\alpha$  pour l'activation du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4. Dans le cas du promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2, il ne semble pas y avoir de modulation de l'activité luciférase suite à l'ajout du vecteur d'expression pour HNF4 $\alpha$ . Cette absence de modulation ne n'est pas tout à fait inattendue, puisque le rôle de HNF4 $\alpha$  pour l'activation de la transcription de FXR a été décrit dans le foie mais seulement en condition de jeûne (Zhang *et al.*, 2004). L'absence de PGC-1 $\alpha$  et du facteur de transcriptions PPAR $\gamma$  dans nos conditions expérimentales, normalement exprimés dans le foie en jeûne, pourrait donc expliquer l'absence d'induction par HNF4 $\alpha$  de l'activité luciférase sous le contrôle du promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2. C'est pour de telles raisons qu'il faut prendre en considération la limite de nos essais luciférases, soit qu'ils ne reflètent pas nécessairement la réalité de l'intestin ou du foie, par le fait que la lignée cellulaire utilisée est d'origine rénale (293T). De plus, il se peut qu'il y manque des facteurs essentiels tels des coactivateurs ou des ligands (possiblement certains acides gras pour HNF4 $\alpha$  (Dhe-Paganon *et al.*, 2002)). Ces cellules restent tout de même un bon modèle pour la transfection, l'expression et l'étude d'interactions de facteurs désirés.

Puisque les facteurs HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$  sont présents tout deux au niveau du foie et de l'intestin alors que Cdx2 est seulement exprimé au niveau de l'intestin, nous avons voulu combiner ces différents facteurs dans le cadre d'essais luciférases afin d'étudier l'activation différentielle des deux promoteurs de FXR, dans des conditions se rapprochant de celles du foie ou de l'intestin.

## **7. Cdx2 semble favoriser l'activation du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 dans le contexte où HNF1 $\alpha$ et HNF4 $\alpha$ sont présents**

Pour évaluer comment interagissent les facteurs HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$  et Cdx2 au niveau des promoteurs du gène FXR, nous avons réalisé des essais luciférase utilisant différentes combinaisons de ces vecteurs d'expression (Figure 24, pages 80 et 81). Comme condition de référence, nous avons choisi celle où les vecteurs d'expression pour HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$  sont présents puisque ces facteurs sont exprimés autant au foie qu'à l'intestin. Puisque les deux promoteurs coexistent, nous prenons pour acquis que notre essai luciférase reflète des conditions présentes au niveau de l'intestin lors de l'ajout du vecteur d'expression pour Cdx2, étant donné sa présence exclusive dans ce tissu. Au niveau de nos résultats, on constate que l'activité luciférase est maximale en présence de HNF1 $\alpha$  seul. Cependant, cette condition ne représente pas bien l'état du foie et de l'intestin puisque HNF4 $\alpha$  est exprimé dans ces deux organes, d'où le choix de la condition avec HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$  comme condition de référence. On observe au niveau des deux promoteurs une diminution de l'activité luciférase lorsque l'on compare la condition HNF1 $\alpha$  seul à celle HNF1 $\alpha$  - HNF4 $\alpha$ . Nous avons voulu évaluer que cet effet n'était pas causé par la présence d'une trop grande quantité de vecteurs d'expression transfectés dans les cellules en utilisant des quantités réduites de vecteurs (5 ng). Nous avons ainsi obtenus le même profil de diminution d'activité luciférase (Résultats non illustrés). Nous suggérons donc que HNF4 $\alpha$  permet une diminution ou plutôt un contrôle à la baisse de la transcription au niveau des deux promoteurs de FXR.

Ce qui est vraiment intéressant est que lorsque l'on permet l'expression de Cdx2 avec HNF1 $\alpha$  et HNF4 $\alpha$  au niveau du promoteur «intestinal» FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4, on observe une augmentation de l'activité luciférase par rapport à la condition de référence HNF1 $\alpha$  - HNF4 $\alpha$ . Cette augmentation va même jusqu'à rejoindre le niveau d'activation observé avec HNF1 $\alpha$  seul. Au niveau du promoteur «hépatique» FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2, pour les mêmes conditions, on n'observe pas de changement lorsque Cdx2 est ajouté à la condition HNF1 $\alpha$  - HNF4 $\alpha$ . Ces résultats nous amènent à penser que dans le contexte intestinal où Cdx2 est présent, que celui-ci mène à une augmentation de la transcription des isoformes

FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4, documentés comme étant les plus exprimés dans l'intestin. Cette augmentation de la transcription pourrait se faire en contrecarrant l'inhibition de l'activité de ce promoteur associée au facteur HNF4 $\alpha$ . En effet, on peut imaginer qu'étant donné la localisation très proche des éléments de réponse potentiels à HNF4 $\alpha$  et Cdx2 sur le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 (Figure 21, page 75), Cdx2 pourrait déplacer HNF4 $\alpha$  par compétition et ainsi permettre l'activation maximale du promoteur par le facteur HNF1 $\alpha$ . Pour élaborer un peu plus ce système, on sait que Cdx2 est une cible transcriptionnelle de HNF4 $\alpha$ , du moins dans les Caco-2 (Boyd *et al.*, 2009). On pourrait poser l'hypothèse que l'augmentation de Cdx2 par HNF4 $\alpha$  mène à l'effet observé dans nos essais luciférase mais en contexte physiologique. De plus, il est connu que SHP inhibe la transcription de HNF4 $\alpha$  (Lee *et al.*, 2000) ce qui nous amène à penser que les isoformes intestinaux de FXR seraient en mesure de réguler leur propre transcription et ce, avec l'implication certaine de Cdx2 et HNF4 $\alpha$  et possiblement de SHP. D'autres études seraient cependant nécessaires pour valider ces hypothèses.

Avec tous nos essais luciférase, il semble évident que HNF1 $\alpha$  régule fortement l'expression de FXR. L'étude d'autres facteurs de transcription spécifiques à l'intestin comme Cdx2 ouvre la voie à une meilleure compréhension de la régulation de l'expression différentielle des isoformes de FXR dans les tissus, et ce, à partir de la régulation des promoteurs FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 et FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4.

## V - CONCLUSION

La présente étude a permis d'étudier l'activité et la régulation de l'expression du récepteur nucléaire FXR en contexte épithélial intestinal. Par rapport à notre premier objectif qui était d'étudier le rôle transcriptionnel de FXR au niveau de l'intestin, nous avons déterminé que FXR a le potentiel de contribuer à divers processus biologiques selon nos données de micro-puce à ADN réalisées dans le modèle cellulaire intestinal Caco-2/15. En effet, selon les regroupements de gènes obtenus, l'activation de FXR peut mener à la modulation de l'expression de l'ARNm de cibles comme MYO1A, MYO7A et DST, et ce, malgré que nous n'ayons pas documenté une liaison au promoteur de ces gènes. La découverte de cibles indirectes de FXR nous a menés à chercher de nouvelles cibles directes de l'activation de FXR. Nous avons montré que dans les cellules Caco-2/15, FXR peut se lier au promoteur de SLC20A1 et augmenter le transcrit de ce gène. Bien que seul SLC20A1 ait été confirmé comme cible transcriptionnelle directe de FXR, cela suggère tout de même une fonction bien différente du métabolisme des acides biliaires, soit celle d'absorber le phosphate de la lumière intestinale. Pour ce qui est des processus d'adhésion biologique et d'organisation du cytosquelette, bien que le rôle de FXR dans ces processus se soit avéré moins important que ce à quoi l'on aurait pu s'attendre, il reste que nous n'avons exploré que deux avenues possibles soit la résistance transépithéliale et la restitution épithéliale. D'autres études ainsi que la recherche approfondie de l'implication de FXR dans des processus liés au phosphore seraient des voies intéressantes à explorer. Nos résultats au niveau de l'étude des deux promoteurs de FXR pour répondre à notre second objectif montrent que le facteur de transcription intestinal Cdx2 serait un facteur clé de la régulation de l'expression de FXR. Plus particulièrement, nous suggérons que dans le contexte épithélial intestinal, la liaison de Cdx2 au promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 permet sa forte activation, ce qui n'est pas le cas pour le promoteur FXR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2. Cela pourrait expliquer pourquoi les isoformes FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4 sont plus exprimés que les isoformes FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 2 dans l'intestin. Des expériences supplémentaires pour déterminer les interactions possibles entre les différents facteurs exprimés dans l'intestin et le foie seraient nécessaires afin de mieux caractériser la régulation de l'expression différentielle des isoformes de FXR.

## V - PERSPECTIVES

Plusieurs perspectives intéressantes peuvent être envisagées pour approfondir les deux objectifs principaux du projet. Au niveau de l'étude des processus biologiques documentés par nos résultats de micro-puce, il serait pertinent d'effectuer des essais quant à savoir comment FXR peut contribuer à la régulation de processus métaboliques liés au phosphore. Puisque c'est un sujet plutôt vaste, il serait intéressant de commencer par vérifier l'effet que l'activation de FXR a sur l'absorption du phosphate inorganique. Comme première piste à suivre, cela semble pertinent étant donné la fonction principale de SLC20A1. Cependant, puisque les processus biologiques liés au phosphore n'impliquent pas seulement son absorption, d'autres avenues seraient envisageables. Pour ce qui est des processus d'adhésion et d'organisation du cytosquelette, des essais de résistance transépithéliale pourraient être faits dans un contexte inflammatoire. Par exemple, avec des cellules Caco-2/15 traitées au DSS il serait intéressant de voir comment l'activation de FXR mène à une diminution de l'effet inflammatoire. La recherche de gènes cibles dans ces conditions non physiologiques pourrait nous donner une idée quant à savoir quels gènes servant au maintien de l'intégrité épithéliale FXR est vraiment en mesure de réguler. Il serait également intéressant de réaliser des essais d'adhérence des cellules Caco-2/15 avec diverses composantes de la matrice extracellulaire pour déterminer si l'activation de FXR favorise des interactions cellules-matrice.

Pour ce qui est du gène cible identifié, soit SLC20A1, des analyses de mutagenèse permettraient de déterminer avec précision la séquence à laquelle FXR se lie au promoteur. Il serait également important de caractériser par essais luciférase l'activation de ce promoteur par FXR et également de déterminer quelles autres protéines peuvent être impliquées. On pense notamment au partenaire de FXR, RXR ainsi qu'aux coactivateurs de FXR. Des essais luciférase préliminaires semblent suggérer que le promoteur SLC20A1 répond à la présence de FXR activé par le GW 4064, mais que le coactivateur PGC-1 $\alpha$  est requis pour obtenir un effet transcriptionnel (Résultats non illustrés).

Au niveau des perspectives de notre second objectif, des analyses supplémentaires seraient requises pour bien caractériser la réponse du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4 aux facteurs HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  et Cdx2. Il serait pertinent de déterminer si d'autres éléments de réponses potentiels sont uniquement présents au niveau du promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4. La présence d'autres éléments distincts permettrait d'approfondir encore plus la régulation de l'expression différentielle de FXR dans les tissus. En effet, FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4 sont les isoformes prédominants au niveau des reins, bien que Cdx2 ne soit pas exprimé au niveau de cet organe. Cela nous suggère que d'autres facteurs de transcriptions spécifiques aux reins ou communs aux reins et à l'intestin peuvent activer le promoteur FXR $\alpha$ 3/ $\alpha$ 4. Également, il serait intéressant de soumettre un modèle cellulaire hépatique tel les HepG2 à la surexpression de Cdx2 pour déterminer si l'expression de FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4 augmente dans ces conditions. Une telle expérience consoliderait encore plus le rôle de Cdx2 en tant que facteur favorisant l'expression des isoformes de FXR spécifiques à l'intestin.

Comme perspective plus générale et moins liée à mes deux objectifs, je crois que l'étude de la région N-terminale des isoformes de FXR serait intéressante à réaliser. En effet, la séquence d'acides aminés issue de l'utilisation des deux promoteurs n'est pas identique lorsque l'on compare les isoformes par alignement informatique. Il serait pertinent de déterminer si des modifications post-traductionnelles différentes sont présentes au niveau de cette région et surtout si la liaison de coactivateurs ou corépresseurs propres à chacune des paires d'isoformes se produit. Des recherches en ce sens mèneraient possiblement à caractériser de manière plus fine l'activité transcriptionnelle de FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4 par rapport à FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 2.

## VI - REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier ma directrice de recherche, Dre Julie Carrier pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir donné un projet de recherche intéressant qui m'a permis de pousser mes limites scientifiques et mon sens de la persévérance, ce qui je crois est requis dans le milieu des sciences.

Merci aux membres du laboratoire : Gérald Bernatchez, Jean-Pierre Cyr, Salah Boudjadi, Véronique Giroux et Mathieu Thériault. Tout au long de ma maîtrise, ils ont su créer une atmosphère plaisante au laboratoire et j'ai pu échanger sur le plan scientifique et humain avec eux. Merci à Gérald pour toute l'aide technique apportée et pour son optimisme inébranlable. Merci à Jean-Pierre, Mathieu et Salah, mes compatriotes à la maîtrise avec qui l'apprentissage s'est fait de manière parallèle. Merci à Véronique, étudiante au doctorat, qui m'a beaucoup appris et pour qui j'ai une grande admiration.

Je veux également remercier mes parents et la famille qui m'ont toujours offert leur support tout au long de mes études d'aussi loin que je me souviens.

Finalement, je remercie le Pr. François Boudreau pour les rencontres et discussions que nous avons eues vers la fin de ma maîtrise, ce qui fut d'une grande aide et très enrichissant sur le plan scientifique. Merci à lui et également au Pr. Alfredo Menendez qui ont donné de leur temps pour la révision et la correction de ce mémoire.

## VII - RÉFÉRENCES

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Molecular biology of the cell, Fifth edition, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2008.

Alkhoury, F., Malo, M.S., Mozumder, M., Mostafa, G., and Hodin, R.A. (2005). Differential regulation of intestinal alkaline phosphatase gene expression by Cdx1 and Cdx2. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289, G285-90.

Ananthanarayanan, M., Li, S., Balasubramaniyan, N., Suchy, F.J., and Walsh, M.J. (2004). Ligand-dependent activation of the farnesoid X-receptor directs arginine methylation of histone H3 by CARM1. *J. Biol. Chem.* 279, 54348-54357.

Annweiler, A., Hipskind, R.A., and Wirth, T. (1991). A strategy for efficient in vitro translation of cDNAs using the rabbit beta-globin leader sequence. *Nucleic Acids Res.* 19, 3750.

Babeu, J.P., Darsigny, M., Lussier, C.R., and Boudreau, F. (2009). Hepatocyte nuclear factor 4alpha contributes to an intestinal epithelial phenotype in vitro and plays a partial role in mouse intestinal epithelium differentiation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297, G124-34.

Bain, D.L., Heneghan, A.F., Connaghan-Jones, K.D., and Miura, M.T. (2007). Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 201-220.

Bavner, A., Sanyal, S., Gustafsson, J.A., and Treuter, E. (2005). Transcriptional corepression by SHP: molecular mechanisms and physiological consequences. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 478-488.

Beaulieu, J.F., and 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., and Furness, J.B. (1999). Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7318-7323.

Blazejczyk, M., Miron, M., Nadon, R., (2007). FlexArray: A statistical data analysis software for gene expression microarrays. Genome Quebec, Montreal, Canada, URL <http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray>

Blikslager, A.T., Moeser, A.J., Gookin, J.L., Jones, S.L., and Odle, J. (2007). Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol. Rev.* 87, 545-564.

- Boyd, M., Bressendorff, S., Moller, J., Olsen, J., and Troelsen, J.T. (2009). Mapping of HNF4alpha target genes in intestinal epithelial cells. *BMC Gastroenterol.* *9*, 68.
- Bretscher, A., and Weber, K. (1979). Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 2321-2325.
- Carisey, A., and Ballestrem, C. (2011). Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *Eur. J. Cell Biol.* *90*, 157-163.
- Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M.G., and Zweibaum, A. (1988). Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res.* *48*, 1936-1942.
- Chong, H.K., Biesinger, J., Seo, Y.K., Xie, X., and Osborne, T.F. (2012). Genome-wide analysis of hepatic LRH-1 reveals a promoter binding preference and suggests a role in regulating genes of lipid metabolism in concert with FXR. *BMC Genomics* *13*, 51.
- Chong, H.K., Infante, A.M., Seo, Y.K., Jeon, T.I., Zhang, Y., Edwards, P.A., Xie, X., and Osborne, T.F. (2010). Genome-wide interrogation of hepatic FXR reveals an asymmetric IR-1 motif and synergy with LRH-1. *Nucleic Acids Res.* *38*, 6007-6017.
- Dawson, M.I., and Xia, Z. (2012). The retinoid X receptors and their ligands. *Biochim. Biophys. Acta* *1821*, 21-56.
- De Gottardi, A., Touri, F., Maurer, C.A., Perez, A., Maurhofer, O., Ventre, G., Bentzen, C.L., Niesor, E.J., and Dufour, J.F. (2004). The bile acid nuclear receptor FXR and the bile acid binding protein IBABP are differently expressed in colon cancer. *Dig. Dis. Sci.* *49*, 982-989.
- Delous, M., Hellman, N.E., Gaude, H.M., Silbermann, F., Le Bivic, A., Salomon, R., Antignac, C., and Saunier, S. (2009). Nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are required for epithelial morphogenesis and associate with PALS1/PATJ and Par6. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 4711-4723.
- Dhe-Paganon, S., Duda, K., Iwamoto, M., Chi, Y.I., and Shoelson, S.E. (2002). Crystal structure of the HNF4 alpha ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand. *J. Biol. Chem.* *277*, 37973-37976.
- Dwivedi, S.K., Singh, N., Kumari, R., Mishra, J.S., Tripathi, S., Banerjee, P., Shah, P., Kukshal, V., Tyagi, A.M., Gaikwad, A.N., *et al.* (2011). Bile acid receptor agonist GW4064 regulates PPARgamma coactivator-1alpha expression through estrogen receptor-related receptor alpha. *Mol. Endocrinol.* *25*, 922-932.
- Fang, S., Tsang, S., Jones, R., Ponugoti, B., Yoon, H., Wu, S.Y., Chiang, C.M., Willson, T.M., and Kemper, J.K. (2008). The p300 acetylase is critical for ligand-activated farnesoid X receptor (FXR) induction of SHP. *J. Biol. Chem.* *283*, 35086-35095.

Forman, B.M., Goode, E., Chen, J., Oro, A.E., Bradley, D.J., Perlmann, T., Noonan, D.J., Burka, L.T., McMorris, T., Lamph, W.W., Evans, R.M., and Weinberger, C. (1995). Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* *81*, 687-693.

Gadaleta, R.M., van Erpecum, K.J., Oldenburg, B., Willemsen, E.C., Renooij, W., Murzilli, S., Klomp, L.W., Siersema, P.D., Schipper, M.E., Danese, S., *et al.* (2011). Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Gut* *60*, 463-472.

Gendron, F.P., Mongrain, S., Laprise, P., McMahon, S., Dubois, C.M., Blais, M., Asselin, C., and Rivard, N. (2006). The CDX2 transcription factor regulates furin expression during intestinal epithelial cell differentiation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *290*, G310-8.

Gineste, R., Sirvent, A., Paumelle, R., Helleboid, S., Aquilina, A., Darteil, R., Hum, D.W., Fruchart, J.C., and Staels, B. (2008). Phosphorylation of farnesoid X receptor by protein kinase C promotes its transcriptional activity. *Mol. Endocrinol.* *22*, 2433-2447.

Giral, H., Caldas, Y., Sutherland, E., Wilson, P., Breusegem, S., Barry, N., Blaine, J., Jiang, T., Wang, X.X., and Levi, M. (2009). Regulation of rat intestinal Na-dependent phosphate transporters by dietary phosphate. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *297*, F1466-75.

Goodwin, B., Jones, S.A., Price, R.R., Watson, M.A., McKee, D.D., Moore, L.B., Galardi, C., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Roth, M.E., *et al.* (2000). A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell* *6*, 517-526.

Hamill, K.J., Hopkinson, S.B., DeBiase, P., and Jones, J.C. (2009). BPAG1e maintains keratinocyte polarity through beta4 integrin-mediated modulation of Rac1 and cofilin activities. *Mol. Biol. Cell* *20*, 2954-2962.

Hofmann, A.F., and Eckmann, L. (2006). How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 4333-4334.

Holt, J.A., Luo, G., Billin, A.N., Bisi, J., McNeill, Y.Y., Kozarsky, K.F., Donahee, M., Wang, D.Y., Mansfield, T.A., Kliewer, S.A., Goodwin, B., and Jones, S.A. (2003). Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev.* *17*, 1581-1591.

Huber, R.M., Murphy, K., Miao, B., Link, J.R., Cunningham, M.R., Rupar, M.J., Gunyuzlu, P.L., Haws, T.F., Kassam, A., Powell, F., *et al.* (2002). Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene* *290*, 35-43.

Inagaki, T., Moschetta, A., Lee, Y.K., Peng, L., Zhao, G., Downes, M., Yu, R.T., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J., and Kliewer, S.A. (2006). Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 3920-3925.

Kagnoff, M.F., and Eckmann, L. (1997). Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J. Clin. Invest.* *100*, 6-10.

Kemper, J.K., Xiao, Z., Ponugoti, B., Miao, J., Fang, S., Kanamaluru, D., Tsang, S., Wu, S.Y., Chiang, C.M., and Veenstra, T.D. (2009). FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell. Metab.* *10*, 392-404.

Kida, T., Murata, T., Hori, M., and Ozaki, H. (2009). Chronic stimulation of farnesoid X receptor impairs nitric oxide sensitivity of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *296*, H195-201.

Kim, D.H., Lee, J., Lee, B., and Lee, J.W. (2009). ASCOM controls farnesoid X receptor transactivation through its associated histone H3 lysine 4 methyltransferase activity. *Mol. Endocrinol.* *23*, 1556-1562.

Kramer, W., Girbig, F., Gutjahr, U., and Kowalewski, S. (1995). Radiation-inactivation analysis of the Na<sup>+</sup>/bile acid co-transport system from rabbit ileum. *Biochem. J.* *306* ( Pt 1), 241-246.

Kramer, W., Sauber, K., Baringhaus, K.H., Kurz, M., Stengelin, S., Lange, G., Corsiero, D., Girbig, F., Konig, W., and Weyland, C. (2001). Identification of the bile acid-binding site of the ileal lipid-binding protein by photoaffinity labeling, matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry, and NMR structure. *J. Biol. Chem.* *276*, 7291-7301.

Lakshmana Rao, A., and Sankar, G.G. (2009). Caco-2 cells: an overview. *Journal of Pharmaceutical Research and Health Care.* *278*, 260-275.

Lee, F.Y., Lee, H., Hubbert, M.L., Edwards, P.A., and Zhang, Y. (2006). FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 572-580.

Lee, Y.K., Dell, H., Dowhan, D.H., Hadzopoulou-Cladaras, M., and Moore, D.D. (2000). The orphan nuclear receptor SHP inhibits hepatocyte nuclear factor 4 and retinoid X receptor transactivation: two mechanisms for repression. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 187-195.

Li, G., Thomas, A.M., Hart, S.N., Zhong, X., Wu, D., and Guo, G.L. (2010). Farnesoid X receptor activation mediates head-to-tail chromatin looping in the Nr0b2 gene encoding small heterodimer partner. *Mol. Endocrinol.* *24*, 1404-1412.

Li, J., Pircher, P.C., Schulman, I.G., and Westin, S.K. (2005). Regulation of complement C3 expression by the bile acid receptor FXR. *J. Biol. Chem.* *280*, 7427-7434.

Lou, G., Li, Y., Chen, B., Chen, M., Chen, J., Liao, R., Zhang, Y., Wang, Y., and Zhou, D. (2007). Functional analysis on the 5'-flanking region of human FXR gene in HepG2 cells. *Gene* 396, 358-368.

Luchoomun, J., and Hussain, M.M. (1999). Assembly and secretion of chylomicrons by differentiated Caco-2 cells. Nascent triglycerides and preformed phospholipids are preferentially used for lipoprotein assembly. *J. Biol. Chem.* 274, 19565-19572.

Ma, T.Y., Boivin, M.A., Ye, D., Pedram, A., and Said, H.M. (2005). Mechanism of TNF- $\alpha$  modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288, G422-30.

Maloney, P.R., Parks, D.J., Haffner, C.D., Fivush, A.M., Chandra, G., Plunket, K.D., Creech, K.L., Moore, L.B., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Jones, S.A., and Willson, T.M. (2000). Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J. Med. Chem.* 43, 2971-2974.

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

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

McConnell, R.E., and Tyska, M.J. (2007). Myosin-1a powers the sliding of apical membrane along microvillar actin bundles. *J. Cell Biol.* 177, 671-681.

Mi, L.Z., Devarakonda, S., Harp, J.M., Han, Q., Pellicciari, R., Willson, T.M., Khorasanizadeh, S., and Rastinejad, F. (2003). Structural basis for bile acid binding and activation of the nuclear receptor FXR. *Mol. Cell* 11, 1093-1100.

Miao, J., Fang, S., Lee, J., Comstock, C., Knudsen, K.E., and Kemper, J.K. (2009). Functional specificities of Brm and Brg-1 Swi/Snf ATPases in the feedback regulation of hepatic bile acid biosynthesis. *Mol. Cell. Biol.* 29, 6170-6181.

Modica, S., Gadaleta, R.M., and Moschetta, A. (2010). Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nucl. Recept. Signal.* 8, e005.

Moore, J.T., Collins, J.L., and Pearce, K.H. (2006). The nuclear receptor superfamily and drug discovery. *ChemMedChem* 1, 504-523.

Moskaluk, C.A., Zhang, H., Powell, S.M., Cerilli, L.A., Hampton, G.M., and Frierson, H.F., Jr. (2003). Cdx2 protein expression in normal and malignant human tissues: an immunohistochemical survey using tissue microarrays. *Mod. Pathol.* 16, 913-919.

- Nambiar, R., McConnell, R.E., and Tyska, M.J. (2010). Myosin motor function: the ins and outs of actin-based membrane protrusions. *Cell Mol. Life Sci.* *67*, 1239-1254.
- Neimark, E., Chen, F., Li, X., and Shneider, B.L. (2004). Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology* *40*, 149-156.
- Ohno, M., Kunimoto, M., Nishizuka, M., Osada, S., and Imagawa, M. (2009). Ku proteins function as corepressors to regulate farnesoid X receptor-mediated gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *390*, 738-742.
- Otte, K., Kranz, H., Kober, I., Thompson, P., Hofer, M., Haubold, B., Rimmel, B., Voss, H., Kaiser, C., Albers, M., *et al.* (2003). Identification of farnesoid X receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 864-872.
- Parks, D.J., Blanchard, S.G., Bledsoe, R.K., Chandra, G., Consler, T.G., Kliewer, S.A., Stimmel, J.B., Willson, T.M., Zavacki, A.M., Moore, D.D., and Lehmann, J.M. (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* *284*, 1365-1368.
- Pellicciari, R., Fiorucci, S., Camaioni, E., Clerici, C., Costantino, G., Maloney, P.R., Morelli, A., Parks, D.J., and Willson, T.M. (2002). 6 $\alpha$ -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J. Med. Chem.* *45*, 3569-3572.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* *29*, e45.
- Pineda Torra, I., Freedman, L.P., and Garabedian, M.J. (2004). Identification of DRIP205 as a coactivator for the Farnesoid X receptor. *J. Biol. Chem.* *279*, 36184-36191.
- Pontoglio, M. (2000). Hepatocyte nuclear factor 1, a transcription factor at the crossroads of glucose homeostasis. *J. Am. Soc. Nephrol.* *11 Suppl 16*, S140-3.
- Purushotham, A., Xu, Q., Lu, J., Foley, J.F., Yan, X., Kim, D.H., Kemper, J.K., and Li, X. (2012). Hepatic deletion of SIRT1 decreases hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ /farnesoid X receptor signaling and induces formation of cholesterol gallstones in mice. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 1226-1236.
- Rizzo, G., Renga, B., Antonelli, E., Passeri, D., Pellicciari, R., and Fiorucci, S. (2005). The methyl transferase PRMT1 functions as co-activator of farnesoid X receptor (FXR)/9-cis retinoid X receptor and regulates transcription of FXR responsive genes. *Mol. Pharmacol.* *68*, 551-558.
- Rodgers, L.S., and Fanning, A.S. (2011). Regulation of epithelial permeability by the actin cytoskeleton. *Cytoskeleton (Hoboken)* *68*, 653-660.
- Sabbagh, Y., Giral, H., Caldas, Y., Levi, M., and Schiavi, S.C. (2011). Intestinal phosphate transport. *Adv. Chronic Kidney Dis.* *18*, 85-90.

- Seltana, A., Basora, N., and Beaulieu, J.F. (2010). Intestinal epithelial wound healing assay in an epithelial-mesenchymal co-culture system. *Wound Repair Regen.* *18*, 114-122.
- Sonnenberg, A., and Liem, R.K. (2007). Plakins in development and disease. *Exp. Cell Res.* *313*, 2189-2203.
- Suh, E., and Traber, P.G. (1996). An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 619-625.
- Sun, H., Chow, E.C., Liu, S., Du, Y., and Pang, K.S. (2008). The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* *4*, 395-411.
- Sun, M., Fu, H., Cheng, H., Cao, Q., Zhao, Y., Mou, X., Zhang, X., Liu, X., and Ke, Y. (2012). A dynamic real-time method for monitoring epithelial barrier function in vitro. *Anal. Biochem.* *425*, 96-103.
- Thomas, A.M., Hart, S.N., Kong, B., Fang, J., Zhong, X.B., and Guo, G.L. (2010). Genome-wide tissue-specific farnesoid X receptor binding in mouse liver and intestine. *Hepatology* *51*, 1410-1419.
- Tyska, M.J., Mackey, A.T., Huang, J.D., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Mooseker, M.S. (2005). Myosin-1a is critical for normal brush border structure and composition. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2443-2457.
- Unno, A., Takada, I., Takezawa, S., Oishi, H., Baba, A., Shimizu, T., Tokita, A., Yanagisawa, J., and Kato, S. (2005). TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *327*, 933-938.
- van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* *71*, 241-260.
- Vavassori, P., Mencarelli, A., Renga, B., Distrutti, E., and Fiorucci, S. (2009). The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity. *J. Immunol.* *183*, 6251-6261.
- Wang, Y.D., Chen, W.D., Moore, D.D., and Huang, W. (2008). FXR: a metabolic regulator and cell protector. *Cell Res.* *18*, 1087-1095.
- Xu, J., and Li, Q. (2003). Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol. Endocrinol.* *17*, 1681-1692.
- Yamada, T., Textbook of gastroenterology, Fifth edition, Blackwell Publishing Ltd, 2009.
- Zhang, M., and Chiang, J.Y. (2001). Transcriptional regulation of the human sterol 12alpha-hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4alpha in mediating bile acid repression. *J. Biol. Chem.* *276*, 41690-41699.

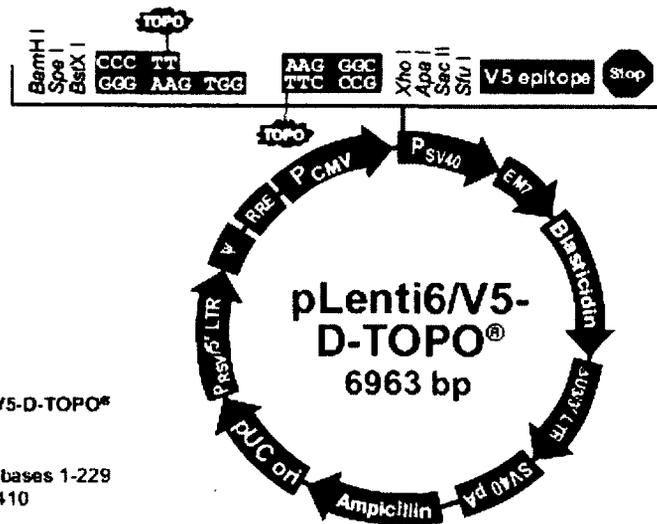
Zhang, Y., Castellani, L.W., Sinal, C.J., Gonzalez, F.J., and Edwards, P.A. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev.* *18*, 157-169.

Zhang, Y., Kast-Woelbern, H.R., and Edwards, P.A. (2003). Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* *278*, 104-110.

**VIII - ANNEXE**

## Cartes des vecteurs pour l'expression de protéines :

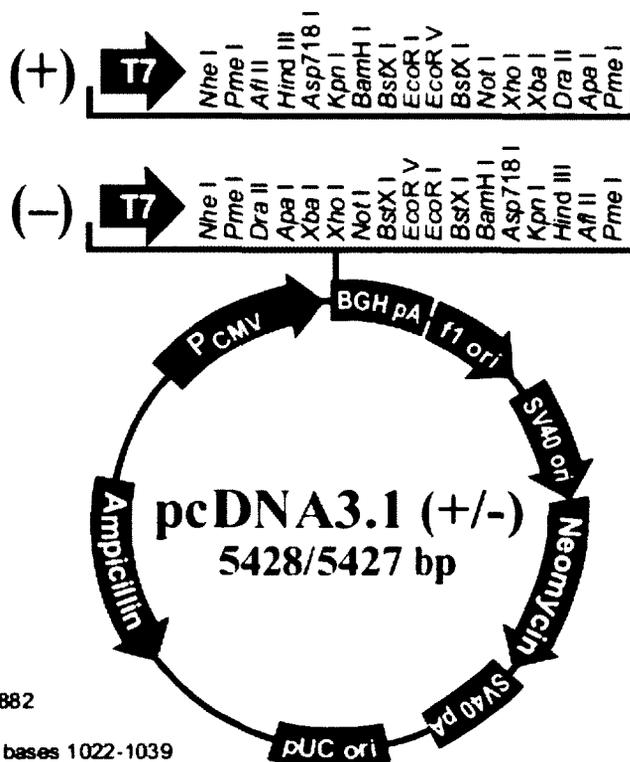
### pLenti :



Comments for pLenti6/V5-D-TOPO®  
6963 nucleotides

RSV enhancer/promoter: bases 1-229  
 HIV-1 5' LTR: bases 230-410  
 5' splice donor: base 520  
 HIV-1 psi ( $\psi$ ) packaging sequence: bases 521-565  
 HIV-1 Rev response element (RRE): bases 1075-1308  
 3' splice acceptor: base 1656  
 3' splice acceptor: base 1684  
 CMV promoter: bases 1809-2392  
 CMV forward priming site: bases 2274-2294  
 Directional TOPO® site: bases 2431-2444  
 V5 epitope: bases 2473-2514  
 V5(C-term) reverse priming site: bases 2482-2502  
 SV40 early promoter and origin: bases 2569-2877  
 EM7 promoter: bases 2932-2998  
 Blastidicin resistance gene: bases 2999-3397  
 $\Delta$ U3/HIV-1 3' LTR: bases 3484-3717  
 $\Delta$ U3: bases 3484-3536  
 Truncated HIV-1 3' LTR: bases 3537-3717  
 SV40 polyadenylation signal: bases 3789-3920  
 bla promoter: bases 4779-4877  
 Ampicillin (bla) resistance gene: bases 4878-5738  
 pUC origin: bases 5883-6556

pcDNA :



Comments for pcDNA3.1 (+)  
5428 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819

T7 promoter/priming site: bases 863-882

Multiple cloning site: bases 895-1010

pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039

BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252

f1 origin: bases 1298-1726

SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074

Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930

SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234

pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)

Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428 (complementary strand)

ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)

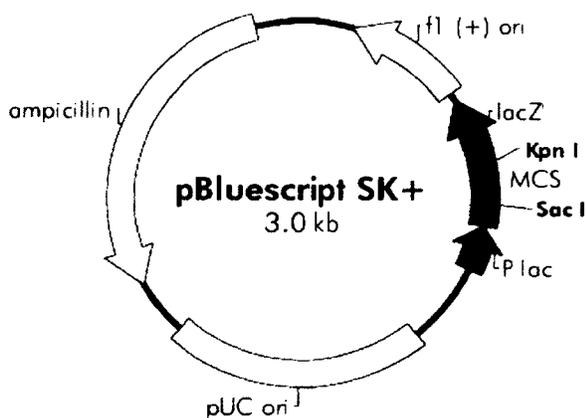
Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)

*bla* promoter (P3): bases 5327-5333 (complementary strand)

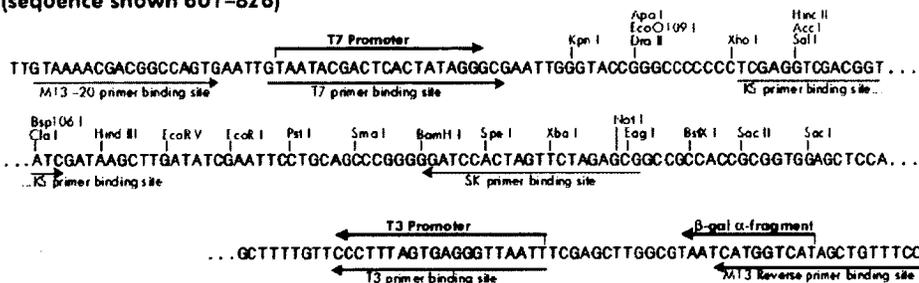
**pBAT :**

Le vecteur pBAT a été produit à partir du clonage de la région 5' UTR du gène de la  $\beta$ -globine en amont du site de clonage multiple du vecteur pBluescript SK+ (Annweiler *et al.*, 1991).

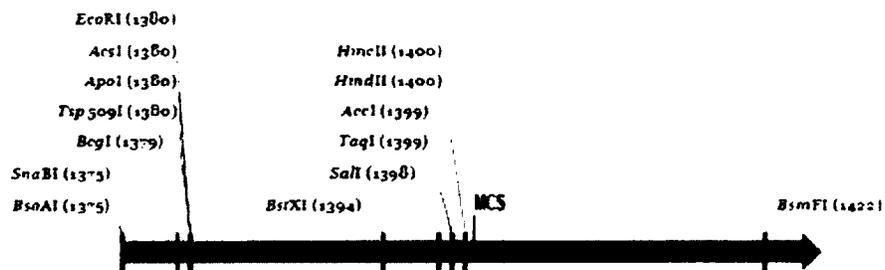
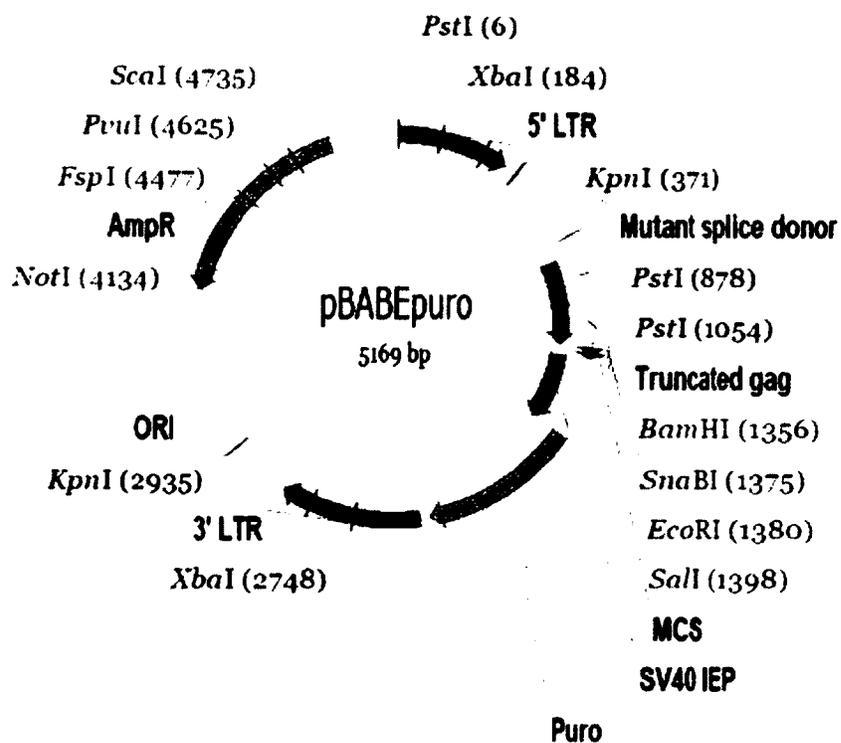
f1 (+) origin 138-444  
 $\beta$ -galactosidase  $\alpha$ -fragment 463-816  
 multiple cloning site 653-760  
 lac promoter 817-938  
 pUC origin 1158-1825  
 ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976-2833



**pBluescript SK (+/-) Multiple Cloning Site Region**  
 (sequence shown 601-826)



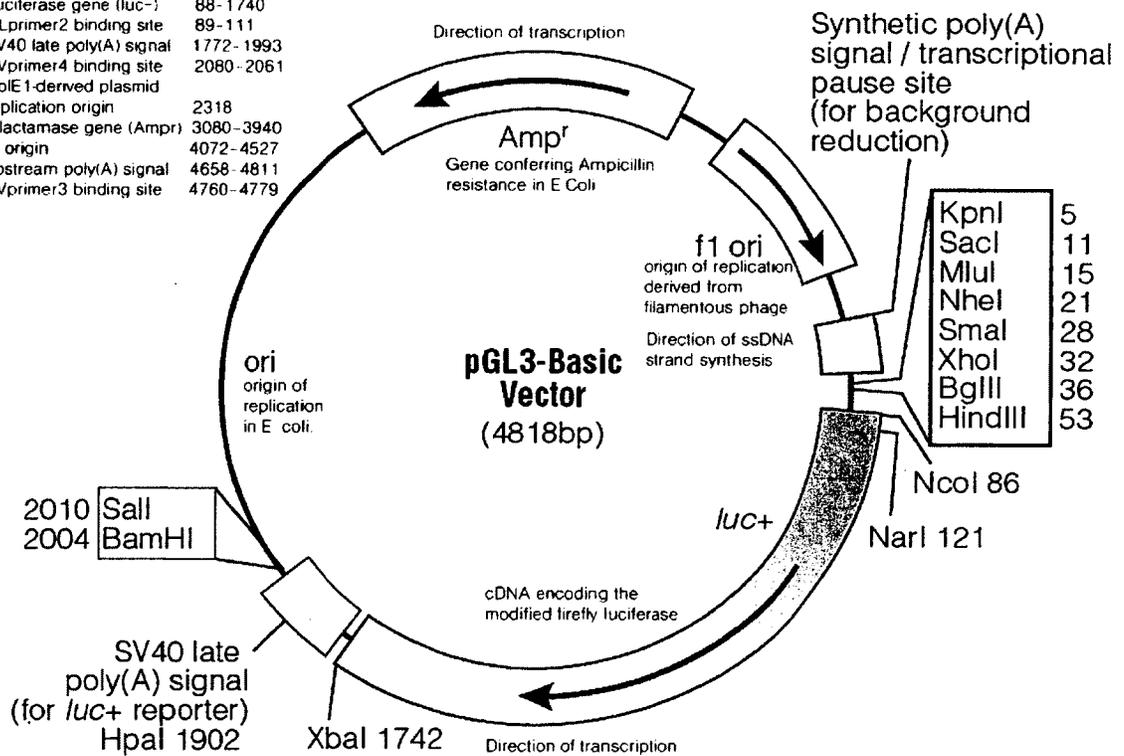
**pBabe :**

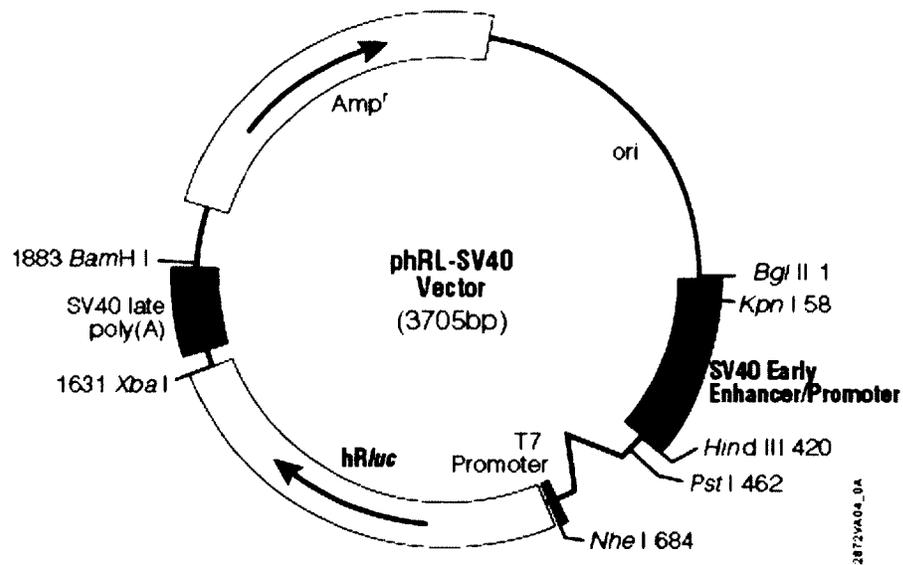


## Cartes des vecteurs pour l'étude de promoteurs :

### pGL3-Basic :

Multiple cloning region	1-58
Luciferase gene ( <i>luc+</i> )	88-1740
GLprimer2 binding site	89-111
SV40 late poly(A) signal	1772-1993
RVprimer4 binding site	2080-2061
ColE1-derived plasmid replication origin	2318
$\beta$ -lactamase gene ( <i>Amp<sup>r</sup></i> )	3080-3940
f1 origin	4072-4527
upstream poly(A) signal	4658-4811
RVprimer3 binding site	4760-4779



**phRL-SV40 :**

**Figure 7. The phRL-SV40 Vector circle map.** Additional description: -^-, position of intron; hRluc, synthetic cDNA sequence encoding the *Renilla* luciferase enzyme; Amp<sup>r</sup>, gene conferring ampicillin resistance in *E. coli*; ori, origin of plasmid replication in *E. coli*. Arrows within the hRluc and Amp<sup>r</sup> gene indicate the direction of transcription.

**phRL-SV40 Vector Sequence Reference Points:**

SV40 early enhancer/promoter region	7–425
Chimeric intron	486–622
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +2)	666–684
T7 promoter transcription start site	683
hRluc reporter gene	694–1629
SV40 late poly(A) region	1651–1872
β-lactamase (Amp <sup>r</sup> ) coding region	2019–2879