

Université de Sherbrooke

**Rôle du facteur de transcription Gata4 dans le maintien de la barrière épithéliale intestinale.**

Par  
David Lepage  
Département d'anatomie et biologie cellulaire

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

Sherbrooke, Québec, Canada  
Juin, 2013

Mémoire évalué par :  
Pr. François Boudreau, Département d'anatomie et biologie cellulaire  
Pr. Claude Asselin, Département d'anatomie et biologie cellulaire  
Pr. Brendan Bell, 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: 978-0-499-00375-1*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-499-00375-1*

#### 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

# **Rôle du facteur de transcription Gata4 dans le maintien de la barrière épithéliale intestinale.**

Par  
David Lepage  
Département d'anatomie et biologie cellulaire

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

## **Résumé**

Au niveau intestinal, le facteur de transcription Gata4 est exprimé dans les cellules épithéliales de la partie proximale de l'intestin grêle. Ce facteur est un régulateur de plusieurs gènes tel celui encodant la sucrase isomaltase. Quelques études ont aussi suggéré que ce facteur est impliqué dans le contrôle de l'expression de molécules de jonction, favorisant ainsi la polarisation des cellules épithéliales en culture. Dans notre laboratoire, des résultats tendent à démontrer que Gata4 est impliqué dans la réponse inflammatoire des cellules épithéliales en régulant, avec ses cofacteurs Cdx2 et Fog1, l'expression génique du peptide antimicrobien Pap1. *In vivo*, l'invalidation de Gata4 a montré que ce facteur de transcription est impliqué dans le maintien de l'identité et des fonctions du jéjunum par rapport à l'iléon. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à la régulation des molécules de jonction dans ce contexte. La présente étude a pour but de compléter l'étude de la régulation du gène Pap1 par Gata4 et d'étudier le rôle de Gata4 dans le contrôle de l'expression des molécules de jonction chez la souris. Nos résultats confirment le rôle du facteur de transcription Gata4 et de son corépresseur Fog1 dans le contrôle de l'expression de Pap1. La méthode d'interférence à l'ARN dirigée contre Fog1 a permis d'induire spontanément l'expression de Pap1 dans la lignée IEC-6/Cdx2. Chez la souris, la perte de Gata4 modifie l'expression de certaines molécules de jonction cellulaire. Des PCR quantitatifs et des immunobuvardages ont révélé que l'expression de plusieurs molécules de jonction est modulée en absence de Gata4. La Claudine 2 est la molécule de jonction dont l'expression est la plus induite autant au niveau de l'ARNm que de la protéine. Ces modifications entraînent une augmentation du passage paracellulaire du FITC-dextran fluorescent, ce qui suggère que l'épithélium est plus perméable aux macromolécules. Des infections orales par *Salmonella Typhimurium* ont révélé un passage accru de ces bactéries dans les animaux femelles. L'ensemble de ces travaux suggère que Gata4 est impliqué dans le contrôle de la perméabilité des jonctions intercellulaires ainsi que dans la protection des cellules épithéliales intestinales contre les bactéries.

Mot clés : Gata4, Pap1, FOG, jonctions intercellulaires, perméabilité transépithéliale

## Table des matières

Liste des tableaux .....	VII
Liste des figures .....	VIII
Liste des abréviations .....	IX
Introduction.....	1
1. Le tube digestif.....	1
1.1 Segmentation du tube digestif .....	1
1.2 Histologie des segments .....	1
1.2 L'axe crypte-villosité .....	2
1.3 Les types cellulaires de l'épithélium intestinal .....	3
1.3.1 Les cellules de Paneth.....	3
1.3.2 Les cellules entéroendocrines .....	4
1.3.3 Les cellules à mucus .....	4
1.3.4 Les cellules absorbantes .....	4
2. La barrière épithéliale intestinale.....	5
2.1 Les jonctions intercellulaires.....	5
2.1.1 Les jonctions serrées.....	5
2.1.2 Les jonctions adhérentes.....	8
3. La transcription .....	9
3.1 Cis-régulateurs.....	9
3.2 Trans-régulateurs .....	12
4. Le facteur de transcription Gata4.....	12
4.1 La famille de facteurs de transcription Gata .....	12
4.2 Généralités sur le facteur de transcription Gata4 .....	13
4.3 Régulation de Gata4 .....	14
4.3.1 Régulation transcriptionnelle de Gata4 .....	14
4.3.2 Régulation post-traductionnelle de Gata4 .....	17
4.4 Partenaires d'interaction.....	18
4.4.1 Cdx2 et Hnf1 $\alpha$ .....	18
4.4.2 Friends of Gata (Fog).....	19
4.5 Fonctions de Gata4.....	21
4.5.1 Fonctions cardiaques .....	21

4.5.2 Fonctions intestinales.....	21
4.5.2.1 <i>In cellulo</i> .....	21
4.5.2.2 <i>In vivo</i> .....	21
4.6 Gata et inflammation .....	26
5. <i>Pap1</i> .....	27
5.1 Généralités.....	27
5.2 Patron d'expression .....	27
5.3 Fonctions .....	28
5.4 Régulation de <i>Pap1</i> par Gata4.....	28
6. Problématique de recherche .....	32
6.1 La régulation de l'expression de <i>Pap1</i> par les facteurs de transcription Gata4, Cdx2 et Fog1. ....	32
6.1 Régulation de la barrière épithéliale intestinale par Gata4.....	32
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>34</b>
1. Culture cellulaire.....	34
1.1 IEC-6 et IEC-6/Cdx2.....	34
1.2 Coculture d'IEC-6/Cdx2 et de cellules mésenchymateuses humaines .....	34
1.3 HEK293T .....	35
1.4 Lignées cellulaires stables .....	35
1.4.1 ADN et production rétrovirale.....	35
1.4.2 ADN et production lentivirale .....	36
1.4.3 Mutagénèse de Gata4.....	36
1.4.4 Infection rétrovirale et lentivirale .....	36
1.5 Extraction d'ARN total de cellules en culture et transcription inverse.....	37
1.6 Extraction protéique totale de cellules en culture.....	37
1.7 Immunobuvardage de type western.....	37
1.8 Immunoprécipitation de la chromatine.....	39
1.9 Clonage de shARN contre Fog1 .....	39
2. Modèle animal.....	40
2.1 Souris invalidées pour Gata4.....	40
2.2 Génotypage des animaux.....	40
2.3 Sacrifice des souris.....	41
2.4 Extraction de l'ARN total et des protéines de tissus intestinaux.....	41

2.5 Injection au BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) .....	42
2.6 Fixation des tissus pour coupes histologiques.....	42
2.7 Immunofluorescences indirectes sur coupes histologiques.....	42
2.8 Évaluation de la perméabilité intestinale des souris.....	43
2.9 Infection orale de <i>Salmonella typhimurium</i> chez la souris.....	43
3. Statistiques .....	44
<b>Résultats.....</b>	<b>45</b>
Volet 1 - La régulation de l'expression de <i>Pap1</i> par les facteurs de transcription Gata4, Cdx2 et Fog1.....	45
1. Gata4 est recruté au niveau du site 7 du promoteur de <i>Pap1 in cellulo</i> .....	45
2. Gata4 et son corépresseur Fog 1 régulent l'expression de <i>Pap1</i> .....	45
Volet 2 - La régulation de la barrière épithéliale intestinale par Gata4 dans un modèle murin .....	50
3. Gata4 régule l'expression de gènes encodant pour des protéines du complexe apical de jonction.....	50
4. L'augmentation de l'ARNm des Claudines 2 et 8 se traduit par une augmentation des niveaux protéiques et de leur localisation au niveau apical de l'épithélium.....	53
5. L'aspect des jonctions du complexe apical est modifié en absence de Gata4.....	53
6. La perte de Gata4 diminue la migration des cellules épithéliales intestinales. ....	58
7. La perte de Gata4 augmente perméabilité transépithéliale au FITC-Dextran.....	58
8. L'augmentation de la perméabilité transépithéliale au FITC-Dextran se traduit par une augmentation du passage de <i>Salmonella typhimurium</i> . ....	58
9. L'augmentation de la perméabilité intercellulaire n'est pas suffisante pour activer le système immunitaire des souris invalidées pour Gata4.....	63
<b>Discussion .....</b>	<b>66</b>
1. L'expression des ARNm de <i>Pap1</i> est régulée par les facteurs de transcription Gata4, Cdx2 et Fog1.....	66
2. Gata4 régule des gènes encodant des molécules de jonction <i>in vivo</i> . ....	68
3. La perte du facteur de Gata4 modifie la perméabilité transépithéliale. ....	69
4. La perte de Gata4 facilite le passage de <i>Salmonella Typhimurium</i> chez les souris femelles. ....	71
5. Le système immunitaire est légèrement affecté par la perte de <i>Gata4</i> à long terme. ....	73
<b>Conclusion .....</b>	<b>75</b>
<b>Perspectives .....</b>	<b>76</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>78</b>

**Annexes.....79**  
**Références.....84**

**Liste des tableaux**

Tableau 1. Oligonucléotides utilisés pour muter la valine 217 de Gata4 en Glycine.....	36
Tableau 2. Anticorps et conditions d'utilisation pour les immunobuvardages .....	38
Tableau 3. Séquences des oligonucléotides et conditions d'amplification utilisées pour l'immunoprécipitation de Gata4 sur le promoteur de <i>PapI</i> .....	39
Tableau 4. Séquences des shARN contre Fog1. ....	40
Tableau 5. Séquences des oligonucléotides et conditions d'amplification utilisées pour le génotypage des souris. ....	41
Tableau 6. Anticorps et conditions utilisées pour immunofluorescences.....	43
Tableau 7. Liste des gènes analysés par la plateforme d'analyse du transcriptome. ....	64
Tableau 8. Micropuce à ADN réalisée à partir de cellules IEC-6/Cdx2 dans lesquelles l'expression de Gata4 a été diminuée par interférence à l'ARN. ....	83

## Liste des figures

Figure 1. La barrière épithéliale intestinale .....	6
Figure 2. Patron d'expression de certaines molécules de jonctions .....	10
Figure 3. Structure du facteur de transcription Gata4.....	15
Figure 4. Localisation de Gata4 et des corépresseurs Fog au niveau intestinal.....	24
Figure 5. Implication de Gata4, Cdx2 et Fog1 dans la régulation de Pap1. ....	30
Figure 6. Gata4 est recruté au niveau du site Gata4 #7 du promoteur de <i>Pap1</i> . ....	47
Figure 7. La surexpression de Gata4 dans le modèle IEC-6/Cdx2 induit l'expression de Pap1 .....	48
Figure 8. La diminution des niveaux protéiques de Fog1 dans le modèle IEC-6/Cdx2 augmente l'expression de Pap1. ....	49
Figure 9. L'invalidation de Gata4 modifie l'expression de certains gènes encodant des Claudines. ....	51
Figure 10. : L'invalidation de Gata4 modifie l'expression de gènes encodant des molécules de jonction .....	52
Figure 11. L'invalidation de Gata4 augmente les niveaux protéiques de la Claudine 2 au niveau du jéjunum proximal de souris.....	54
Figure 12. La Claudine 2 est exprimée au niveau apical du jéjunum de souris invalidées pour Gata4 .....	55
Figure 13. La Claudine 8 est exprimée au niveau apical du jéjunum de souris invalidées pour Gata4 .....	56
Figure 14. L'aspect du complexe apical de jonction est affecté dans les souris invalidées pour Gata4. ....	57
Figure 15. La migration des cellules épithéliales intestinales est diminuée en l'absence de Gata4.....	59
Figure 16. La perméabilité transépithéliale est augmentée chez les souris invalidées pour Gata4.....	60
Figure 17. L'invalidation de Gata4 facilite le passage de <i>S. typhimurium</i> .....	62
Figure 18. L'invalidation de Gata4 augmente l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. ....	65
Figure 19. Modèle de régulation de l'expression de Pap1 par Gata4, Cdx2 et Fog1.....	79
Figure 20 Analyses du promoteur de gènes encodant quelques lectines de type C chez le rat et la souris.....	81

### Liste des abréviations

A :	Adénine
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ANP :	Peptide natriurétique auriculaire
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
BrdU :	5-bromo-2'-deoxyuridine
Bcl :	Protéine B-cell lymphoma 2
BNP :	Peptide natriurétique cérébral
BSA :	Albumine de sérum bovin
C :	Cytosine
C/EBP :	CCAAT enhancer binding protein
Cdx :	Caudal related homeobox
CFU :	Colony-forming unit
Clau :	Protéine Claudine
CMV :	Promoteur du cytomégalovirus
Cre :	Cyclization recombinase (bactériophage P)
C-terminal :	Extrémité COOH
CTLD :	Domaine des lectines de type C
DMEM :	Dulbecco Modified Eagle's Medium
dNTP :	Désoxynucléotide triphosphate (N = A, T, C, G)
DTT :	Dithiothréitol
E-Cad :	Protéine E-Cadhérine
EDTA :	Acide éthylènediaminetétraacétique
ERK :	Extracellular signal-regulated kinase
Fabp :	Fatty acid binding protein
Fcgbp :	Fc fragment of IgG binding protein
FBS :	Sérum foetal bovin
Fog :	Friend of Gata
G :	Guanine
<i>Gata</i> :	Gène Gata animal
Gata :	Protéine Gata animale
<i>GATA</i> :	Gène GATA humain
GATA :	Protéine GATA humaine
HEPES :	4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonate
HIEC :	Cellule épithéliale intestinale humaine
HLH :	Motif hélice-boucle-hélice
HNF :	Hepatocyte nuclear factor

HTH :	Motif hélice-tour-hélice
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IEC :	Cellule épithéliale intestinale
IL :	Interleukine
IPTG :	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
Jam:	Gène Junctional adhesion molecule
kb :	Kilobase
kDa :	Kilodalton
LB:	Milieu de culture <i>Lysogeny broth</i>
loxP :	Locus of X-ing over P1
LPH :	Lactase phlorizin-hydrolase
LPS :	Lipopolysaccharide
LRC :	Label-Retaining Cells
LZ :	Motif leucine-zipper
MAPK :	Mitogen-activated protein kinase
MII :	Maladies inflammatoires intestinales
MHC :	Chaîne lourde de la myosine
mL :	Millilitre
mM :	Millimolaire
MOPS :	Tampon 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
Muc :	Mucine
NAF:	Fluorure de sodium
NF- $\kappa$ B :	Nuclear factor-kappa B
ng :	Nanogramme
NLS :	Nuclear localisation sequence
<i>Ngn</i> :	Gène Neurogenine
N-terminal :	Extrémité NH <sub>2</sub>
<i>Ocln</i> :	Gène Occludine
O/N :	Overnight (toute la nuit)
Pap :	Protéine pancreatitis associated protein animale
PAP :	Protéine pancreatitis associated protein humaine
<i>Pap</i> :	Gène pancreatitis associated protein animal
<i>PAP</i> :	Gène pancreatitis associated protein humain
pb :	Paire de bases
PBS :	Tampon phosphate salin
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
PFA :	Paraformaldéhyde
PIC :	Cocktail d'inhibiteurs de protéases
PKA :	Protéine kinase A
PMSF :	Phenylmethylsulfonyl fluoride

PVDF :	Polyfluorure de vinylidène
R :	Adénine ou guanine
RELM $\beta$ :	Gène Resistin-like molecule beta
rpm :	Révolution par minute
RXR :	Retinoid X receptor
shARN :	Petits ARN en épingle à cheveux
SI :	Sucrase isomaltase
T :	Thymine
TAE :	Tris-acétate EDTA
TAD :	Domaine de trans-activation
TBP :	TATA binding protein
TFF :	Trefoil factor
TNF :	Tumor necrosis factor
TP :	Température pièce
V217G :	Mutation d'une valine pour une glycine en position 217
W :	Adénine ou thymine
ZF :	Motif doigt de zinc
ZO :	Protéine Zonula occludens
Zn :	Zinc
$\alpha$ :	Alpha
$\beta$ :	Bêta
$\gamma$ :	Gamma
$\mu\text{g}$ :	Microgramme
$\mu\text{l}$ :	Microlitre

## **Introduction**

### **1. Le tube digestif**

#### **1.1 Segmentation du tube digestif**

Le tube digestif est composé de plusieurs organes qui vont permettre la digestion et l'absorption de la nourriture. Ces organes sont la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. L'intestin grêle et le colon ont des rôles complémentaires et distincts. Cependant, c'est au niveau de l'intestin grêle que se fait la majeure partie de la digestion chimique et de l'absorption des nutriments. Au niveau du colon, l'eau et certaines vitamines y sont réabsorbées (MARIEB, 2005).

L'intestin grêle peut être divisé en 3 segments. Le premier segment, d'une longueur de 25 cm (chez l'homme), est le duodénum rattaché à l'estomac au niveau du pylore. Le duodénum est l'endroit où le chyme gastrique est mélangé aux sucs pancréatiques et à la bile. Ce segment est aussi responsable du contrôle de la vidange gastrique grâce à la cholécystokinine (CCK), hormone sécrétée par un sous-type de cellules entéroendocrines retrouvées exclusivement dans ce segment (CUMMINGS et OVERDUIN, 2007). Le deuxième segment de l'intestin grêle est le jéjunum. Ce segment mesure environ 2,5 m. Il s'y produit une importante digestion et la majeure partie des glucides, lipides et protéines y sont réabsorbés. La partie terminale de l'intestin grêle se nomme l'iléon. Sa longueur est comparable à celle du jéjunum. Les sels biliaires y sont réabsorbés ainsi que le reste des glucides, lipides et protéines (MARIEB, 2005). Le colon est lui aussi composé de plusieurs segments, soit le caecum suivi du colon ascendant, transversal, descendant et sigmoïde. Le tube digestif se termine par le rectum et l'anus. Deux autres organes connexes au tube digestif contribuent à la digestion et à la réabsorption des nutriments, soit le pancréas exocrine et la vésicule biliaire.

#### **1.2 Histologie des segments**

L'ensemble de l'intestin est composé de 4 grandes couches, soit de l'intérieur à l'extérieur; la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. La muqueuse peut

être divisée en 3 couches; la muscularis mucosa, la lamina propria et l'épithélium. Au niveau de l'intestin grêle, tous les segments possèdent des plis circulaires (évagination de la muqueuse et de la sous-muqueuse) sur lesquels reposent des villosités (évagination de la muqueuse) pour maximiser la surface de contact entre le bol alimentaire et les entérocytes (MARIEB, 2005). Cependant, chaque segment possède certaines caractéristiques qui les distinguent. Le duodénum possède des villosités grossières et de taille moyenne. Au niveau de la sous-muqueuse, on y retrouve les glandes de Brünner qui produisent une sécrétion alcaline responsable de la neutralisation du chyme gastrique acide. Au niveau du jéjunum, les villosités sont digitiformes et plus grandes que celles retrouvées dans le duodénum. Dans l'iléon, les plis circulaires sont moins fréquents et de moins grande taille. Les villosités sont plus petites que celles du jéjunum. On y retrouve les plaques de Peyer, follicules lymphoïdes où les contacts entre la microflore et les précurseurs lymphocytaires sont fréquents (BERNAUDIN, 1997).

## **1.2 L'axe crypte-villosité**

L'unité fonctionnelle de l'intestin grêle est l'axe crypte-villosité. Les cryptes de Lieberkühn sont des invaginations de l'épithélium dans le tissu connectif, alors que les villosités sont des protubérances en forme de doigts projetées vers la lumière intestinale (CROSNIER *et al.*, 2006). Cette unité fonctionnelle est recouverte d'un épithélium simple prismatique qui se renouvelle aux 2 à 7 jours, et ce, grâce aux quelques cellules souches présentes à la base des cryptes (BRITTAN et WRIGHT, 2002). Les cellules souches sont de 2 types; soit les CBC (Crypt Base Columnar cells) qui sont intercalées entre les cellules de Paneth et les LRC (Label-Retaining Cells), présentes en position +4 de la crypte. Il semble de plus en plus accepté que les cellules souches de type CBC assurent le renouvellement de l'épithélium en conditions normales, alors que les LRC sont quiescentes. Cependant, si la population de cellules souches de type CBC vient à être endommagée lors d'un stress quelconque, les cellules souches de type LRC vont entrer en prolifération et régénérer la population de cellules souches de type CBC (SCOVILLE *et al.*, 2008; TIAN *et al.*, 2011).

La division des cellules souches de type CBC peut se faire de deux manières : symétrique (donne 2 cellules souches) ou asymétrique (donne 1 cellule souche et 1 cellule fille) (SNIPPERT *et al.*, 2010). Les cellules filles entament un processus de migration vers le haut de la crypte tout en se divisant rapidement de 4 à 5 fois (MARSHMAN *et al.*, 2002). Ces cellules filles forment une zone nommée transit d'amplification. Ces cellules sont déterminées et vont mener aux cellules différenciées de la villosité que l'on peut regrouper en deux lignées : la lignée sécrétoire et la lignée absorbante (BARKER *et al.*, 2008; SCOVILLE *et al.*, 2008). La différenciation terminale des cellules filles s'effectue dans le tiers supérieur de la crypte, à l'exception des cellules de Paneth qui complètent leur différenciation dans le tiers inférieur de la crypte. À leur sortie de la crypte, les cellules sont différenciées et non prolifératives. Elles vont continuer leur migration jusqu'à l'apex de la villosité où elles vont être exfoliées.

### **1.3 Les types cellulaires de l'épithélium intestinal**

Il existe quatre principaux types de cellules épithéliales intestinales regroupés en deux lignées. La lignée sécrétoire est composée des cellules de Paneth, des cellules entéroendocrines et des cellules à mucus. La lignée absorbante est quant à elle composée exclusivement des cellules absorbantes.

#### **1.3.1 Les cellules de Paneth**

Les cellules de Paneth se retrouvent au fond des cryptes de l'intestin grêle, intercalées entre les cellules souches CBC. C'est d'ailleurs le seul type de cellules pleinement différenciées qui est retrouvé au niveau de la crypte. Ces cellules jouent un rôle important dans la défense de l'hôte contre la microflore intestinale en sécrétant de nombreux peptides antibactériens (lysozyme, défensine et cryptidine) (CROSNIER *et al.*, 2006). En plus de ce rôle, il a récemment été démontré qu'elles sont essentielles au maintien de la population de cellules souches CBC de l'intestin grêle (SATO *et al.*, 2011).

### **1.3.2 Les cellules entéroendocrines**

Les cellules entéroendocrines sont présentes en faible quantité, environ 15 cellules par villosité. Cependant, avec le grand nombre de villosités présent au niveau intestinal, elles forment le plus important système endocrinien diffus du corps (RINDI *et al.*, 2004). Il en existe au moins 15 types caractérisés selon l'hormone qu'elles sécrètent. Les hormones sécrétées ont des fonctions diverses qui incluent, entre autres, le contrôle de la prise alimentaire, le contrôle de la glycémie et le contrôle de la motilité intestinale (JENNY *et al.*, 2002). Leur distribution spatiale est finement régulée : certains sous-types sont uniquement présents dans un segment de l'intestin grêle (RINDI *et al.*, 2004).

### **1.3.3 Les cellules à mucus**

Les cellules à mucus, représentant environ 10 % de la population de cellules épithéliales, sont responsables de la sécrétion d'une épaisse couche de mucus. Cette couche de mucus joue des rôles de lubrification pour faciliter l'avancement du bol alimentaire et de protection contre les microorganismes présents au niveau intestinal. Cette dernière fonction est réalisée majoritairement par les différentes glycoprotéines synthétisées par ces cellules qui peuvent être soit sécrétées (Muc2) ou encore ancrées à la membrane cytoplasmique (Muc1, Muc3, Muc17). Les cellules à mucus sécrètent aussi plusieurs protéines bioactives qui permettent de contrôler la microflore intestinale (TFF, RELM $\beta$  et Fcgbp) (KIM et HO, 2010). De plus, la couche de mucus facilite la diffusion des peptides antibactériens produits par les cellules de Paneth (GERSEMANN *et al.*, 2012).

### **1.3.4 Les cellules absorbantes**

Les cellules absorbantes représentent près de 90 % des cellules épithéliales intestinales. Leur principale fonction est l'absorption des nutriments, mais elles participent aussi à la digestion des aliments grâce aux nombreux enzymes exprimés sur leur bordure en brosse. Cette bordure en brosse est composée d'un arrangement dense de microvillosités qui permettent d'augmenter la surface de contact entre le bol alimentaire et l'entérocyte (CROSNIER *et al.*, 2006).

## 2. La barrière épithéliale intestinale

La surface intestinale d'environ 100 mètres carrés est recouverte d'une monocouche de cellules épithéliales simples prismatiques. Cette monocouche forme une barrière physique et sélective entre la lumière intestinale et les tissus connectifs sous-jacents (Figure 1a). En plus de l'exposition constante au bol alimentaire, l'intestin est l'hôte d'une multitude de bactéries dont le nombre est estimé à 100 trillions ( $10^{14}$ ), soit 10 fois plus que le nombre de cellules composant le corps humain (ARTIS, 2008). Il devient donc très important de contrôler les interactions entre la microflore intestinale et le système immunitaire pour dans un premier temps, favoriser la tolérance à la microflore commensale et dans un deuxième temps, enclencher une réponse immunitaire adéquate contre les bactéries pathogènes. En cas de dysfonction de cette barrière épithéliale intestinale, une plus grande quantité de microorganismes pourra entrer en contact avec les cellules immunitaires et entraîner une suractivation de celles-ci, ce qui peut ultimement mener aux maladies inflammatoires intestinales chroniques telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (CLAYBURGH *et al.*, 2004; TURNER, 2006). La composante principale de cette barrière réside dans la membrane plasmique des cellules épithéliales. Celle-ci est imperméable à la plupart des composés hydrophiles en absence de transporteurs spécifiques. Cependant, il est nécessaire de sceller le passage paracellulaire entre les cellules épithéliales pour former une barrière efficace. Cette fonction est assurée par le complexe apical de jonctions qui est composé des jonctions serrées et des jonctions adhérentes (TURNER, 2006).

### 2.1 Les jonctions intercellulaires

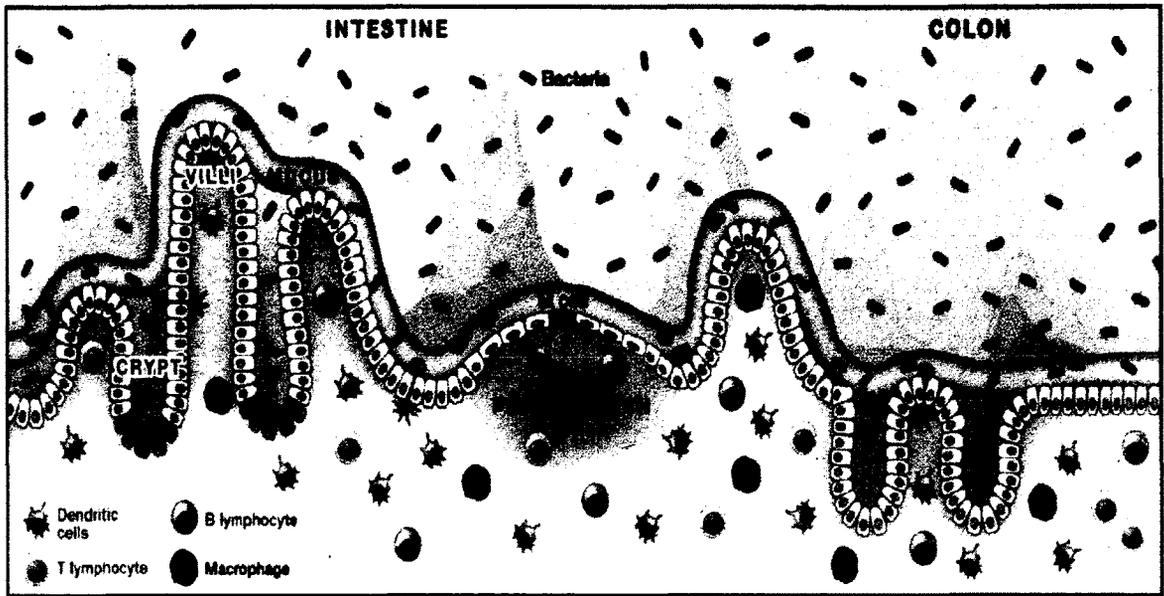
#### 2.1.1 Les jonctions serrées

Les jonctions serrées (zonula occludens) sont situées sur la partie apicale des cellules épithéliales intestinales. Leur fonction première est de sceller l'espace intercellulaire aux macromolécules et aux bactéries. Initialement, elles étaient considérées comme formant une structure statique et imperméable. Elles sont maintenant considérées comme étant dynamiques et semi-perméables. Selon leur composition, elles peuvent laisser passer

**Figure 1. La barrière épithéliale intestinale**

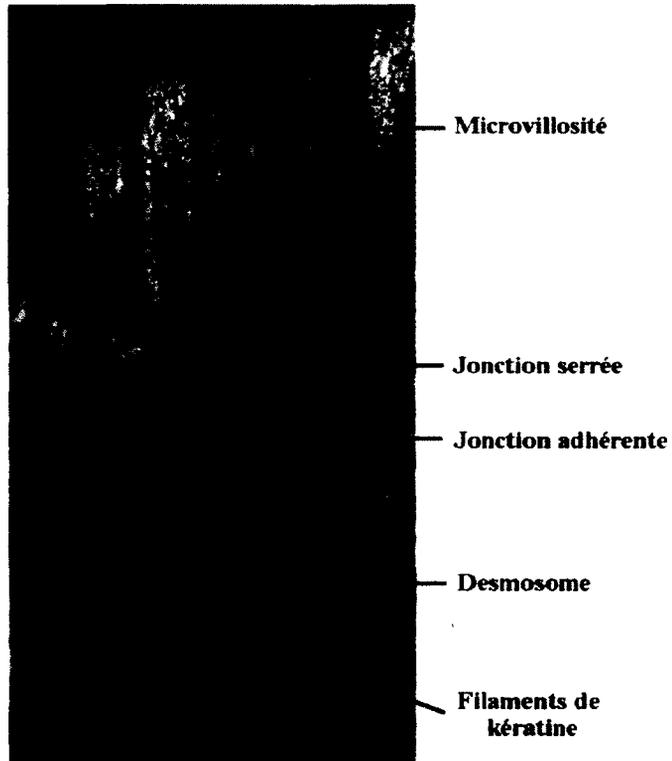
a) La monocouche de cellules épithéliales intestinales recouvre l'intestin et limite les contacts entre la microflore présente dans la lumière intestinale et les cellules du système immunitaire du tissu sous-jacent. Les cellules épithéliales sont protégées par une épaisse couche de mucus et par les peptides antimicrobiens sécrétés dans la lumière intestinale. Dans l'iléon, on retrouve les plaques de Peyer. Ces structures contiennent plusieurs cellules M capables d'interagir avec la microflore intestinale afin d'induire une tolérance ou de déclencher une réponse appropriée contre un pathogène. b) L'étanchéité de la barrière épithéliale intestinale repose en partie sur la capacité des cellules épithéliales à former des jonctions intercellulaires. Les jonctions serrées situées sur le côté apical des cellules épithéliales ont pour fonction de sceller l'espace entre les cellules et par le fait même, d'empêcher le contenu intestinal d'y circuler librement. Les jonctions adhérentes situées sous des jonctions serrées sont impliquées dans le maintien des contacts cellule-cellule. Les desmosomes sont aussi impliqués dans le maintien des contacts cellule-cellule.

a)



(GARRETT *et al.*, 2010)

b)



Adapté de Molecular biology of the cell, 5th edition

certaines ions tels le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et le magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) et leur perméabilité peut être modifiée par différents stimuli comme le TNF- $\alpha$  (CLAYBURGH *et al.*, 2004). Les jonctions serrées sont des complexes multiprotéiques composés de protéines transmembranaires et d'échafaudages sur lesquelles le cytosquelette d'actine est connecté. Les protéines transmembranaires appartenant à la famille des Claudines jouent un rôle crucial dans le contrôle de la perméabilité de ce type de jonction.

Cette famille est composée de 24 membres, soient les Claudines 1 à 24. La surexpression de différentes Claudines *in cellulo* modifient la résistance ainsi que la perméabilité de ces jonctions et ces changements varient selon la Claudine exprimée (LALNAG et MORIN, 2009). Plus spécifiquement, les membres de la famille des Claudines augmentent l'étanchéité des jonctions serrées (VAN ITALLIE et ANDERSON, 2006). Par contre, il a été démontré que la Claudine 2 (Clau-2) affecte négativement l'étanchéité des jonctions serrées, en créant des pores au niveau de celles-ci (AMASHEH *et al.*, 2002; FURUSE *et al.*, 2001). Au niveau intestinal, il a été démontré que l'expression des Claudines varie selon le segment et l'âge (Figure 2a) (HOLMES *et al.*, 2006). De plus, des changements dans l'expression des Claudines sont associés aux maladies inflammatoires intestinales (Figure 2b). Plus spécifiquement, Clau-2 est surexprimée en contexte inflammatoire et est responsable, en partie, de l'augmentation de la perméabilité transépithéliale observée dans ce contexte (HELLER *et al.*, 2005; ZEISSIG *et al.*, 2007). Les jonctions serrées sont aussi composées de l'Occludine (Ocld), des *Zonula occludens* 1 et 2 (ZO-1 et ZO-2) et des « junctional adhesion molecules » (JAMs). Ces protéines jouent plutôt des rôles dans l'assemblage et le maintien des jonctions serrées (TURNER, 2006).

### 2.1.2 Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes (ou *zonula adherens*) sont directement situées sous les jonctions serrées et forment avec ces dernières le complexe apical de jonctions. Elles vont contribuer à maintenir les contacts cellules-cellules en reliant le cytosquelette d'actine d'une cellule à sa voisine. Cela est assuré par la liaison calcium-dépendante de la protéine E-Cadhérine (E-Cad) d'une cellule à l'E-Cad de la cellule voisine. Ces jonctions sont indirectement impliquées dans le contrôle de la perméabilité intercellulaire en favorisant

l'assemblage des jonctions serrées et le maintien de la polarité cellulaire (TURNER, 2006). L'inactivation conditionnelle de l'E-Cad dans l'épithélium intestinal murin entraîne des défauts dans la polarisation cellulaire et une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales intestinales, ce qui cause de fortes diarrhées et la mort des souris (SCHNEIDER *et al.*, 2010). À l'inverse, la surexpression de l'E-Cad dans un modèle murin ralentit la vitesse de migration des cellules épithéliales intestinales et n'influence pas la différenciation de celles-ci (HERMISTON *et al.*, 1996).

### **3. La transcription**

La transcription est définie comme un processus cellulaire par lequel les ARN polymérase (I, II et III) synthétisent un brin d'ARN complémentaire à un segment d'ADN. La transcription est une étape cruciale qui permet de contrôler l'expression d'un gène. La régulation de la transcription s'effectue grâce au cis-régulateurs (séquences sur l'ADN) sur lesquels les trans-régulateurs (facteurs de transcription) se lient (VILLARD, 2004).

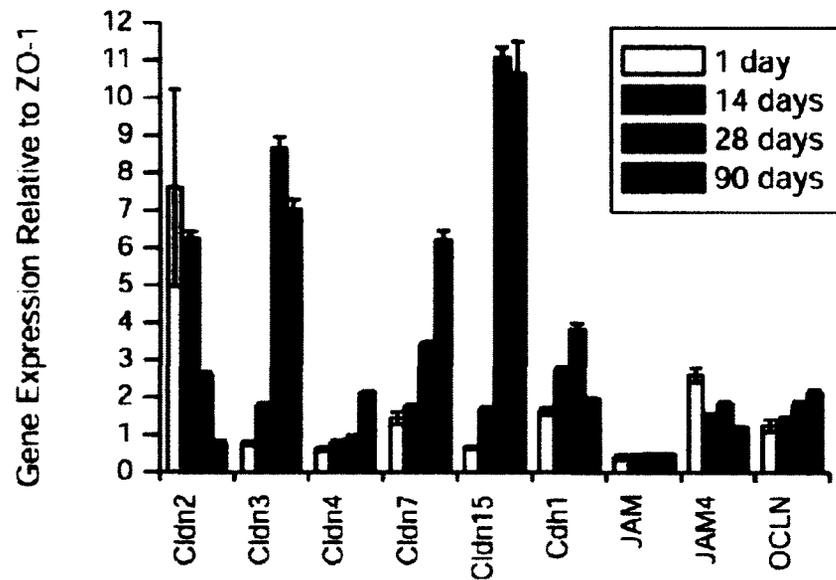
#### **3.1 Cis-régulateurs**

Pour initier la transcription d'un gène, l'ARN polymérase II interagit avec les facteurs de transcription qui reconnaissent de courtes séquences en amont du site de l'initiation de la transcription. Ces séquences de liaison de facteurs de transcription sont retrouvées, entre autres, dans une région nommée promoteur. Le promoteur d'un gène contient plusieurs de ces séquences : celles-ci permettent la liaison des facteurs de transcription généraux ou spécifiques. Parmi ces séquences, la boîte TATA est située à environ 25 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Cet élément cis-régulateur est responsable de la liaison de la protéine TBP, sous-unité du facteur de transcription général TFIID. TFIID est le premier facteur de transcription général à lier l'ADN lors de la formation du complexe de pré-initiation de la transcription. Il existe aussi des séquences distales au promoteur d'un gène qui recrute des facteurs de transcription capables d'influencer positivement (amplificateur) ou négativement (silenceur) la transcription d'un gène (BRIVANLOU et DARNELL, 2002; VILLARD, 2004).

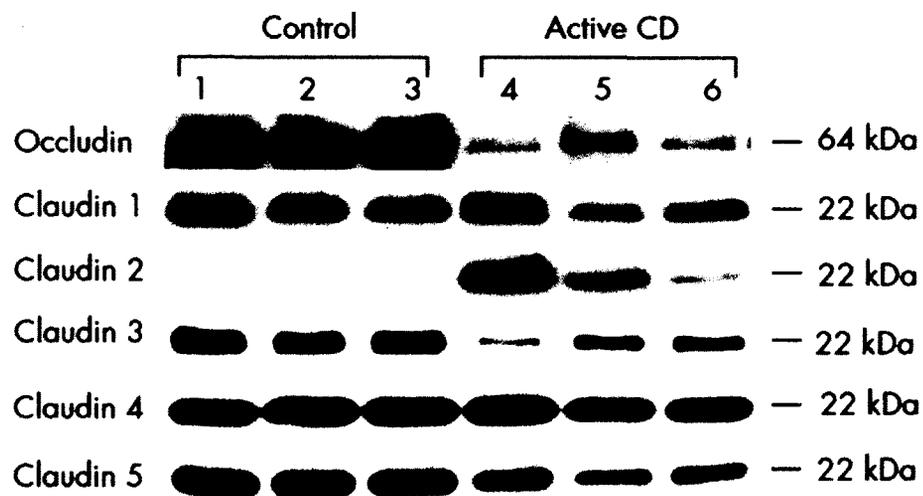
**Figure 2. Patron d'expression de certaines molécules de jonctions**

a) Expression relative de certaines molécules de jonction selon l'âge au niveau du jéjunum de souris. L'expression des Claudines change entre la naissance et l'adulte. Les changements les plus drastiques se produisent pendant le sevrage, entre le 14<sup>ème</sup> jour et le 28<sup>ème</sup> jour après la naissance. Il est à noter que la Claudine 2 est faiblement exprimée chez l'adulte comparativement au nouveau-né. b) Lors de maladies inflammatoires, le profil d'expression des molécules de jonctions est modifié. À l'aide de biopsies, il a été démontré que l'expression de l'Occludine est fortement diminuée et que celle de la Claudine 2 est induite dans la zone de tissus enflammés (active CD) comparativement à la marge de résection (Control).

a)

(HOLMES *et al.*, 2006)

b)

(ZEISSIG *et al.*, 2007)

### **3.2 Trans-régulateurs**

Les facteurs de transcription sont de deux types : les facteurs de transcription généraux et les facteurs de transcription spécifiques. Les facteurs de transcription généraux vont permettre le recrutement des ARN polymérase au niveau du promoteur d'un gène afin de permettre la transcription exacte de celui-ci. Les facteurs de transcription généraux sont ubiquitaires et il en existe plus de 40 (VILLARD, 2004). Les facteurs de transcription spécifiques peuvent réguler positivement (activateur) ou négativement (répresseur) la transcription via leurs interactions avec l'ADN ou avec d'autres protéines (cofacteurs). Ils peuvent être classés selon leur motif de liaison à l'ADN qui comprend, entre autres, les facteurs de transcription à motif hélice-boucle-hélice (HLH), à motif leucine-zipper (LZ), à motif doigt de zinc (ZF) et à motif hélice-tour-hélice (HTH) (PABO et SAUER, 1992). Plusieurs de ces facteurs de transcription se lient sur l'ADN sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère. D'autres facteurs de transcription possèdent un site de liaison pour un ligand hormonal ou métabolique.

## **4. Le facteur de transcription Gata4**

### **4.1 La famille de facteurs de transcription Gata**

Les facteurs de transcription Gata jouent des rôles cruciaux dans le développement ainsi que dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Leur nom provient du fait qu'ils lient l'ADN sur la séquence nucléotidique (A/T)GATA(A/G). Chez les vertébrés, cette famille est composée de 6 membres, soient Gata1 à 6, formant deux groupes selon leur patron d'expression. Le premier groupe est composé des facteurs Gata1 à 3. Ceux-ci sont exprimés au niveau des cellules hématopoïétiques. Ils sont essentiels à la prolifération des cellules souches hématopoïétiques, la différenciation des érythrocytes et mégacaryocytes et au développement des lymphocytes T (WEISS et ORKIN, 1995). Le deuxième groupe, composé de Gata4 à 6, est exprimé au niveau des tissus d'origine endodermique ou mésodermique telles que les gonades, le cœur et l'intestin. Ce deuxième groupe est impliqué dans l'expression et la régulation de gènes tissus-spécifiques.

Les facteurs de transcription Gata possèdent une forte homologie de séquence dans la région qui interagit à la fois avec l'ADN et les cofacteurs. Cette région est composée de deux doigts de zinc de type IV (Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>17</sub>- Cys-X<sub>2</sub>-Cys). De plus, les facteurs de transcription Gata possèdent une région basique conservée située près du doigt de zinc en C-terminal qui est responsable de leur localisation nucléaire (MOLKENTIN, 2000). En raison de leur homologie de séquence et de leur capacité à lier le même domaine à l'ADN, les facteurs de transcription Gata peuvent posséder des fonctions redondantes *in vitro* (KO et ENGEL, 1993; MERIKA et ORKIN, 1993). Cette situation n'est toutefois toujours pas pleinement démontrée *in vivo* (BEULING *et al.*, 2011; VIGER *et al.*, 2008).

#### 4.2 Généralités sur le facteur de transcription Gata4

Gata4 a été le quatrième membre de la famille des facteurs de transcription Gata à être identifié (ARCECI *et al.*, 1993; KELLEY *et al.*, 1993). Le gène *GATA4* humain est situé sur le chromosome 8 (8p23.1-p22) alors que le gène murin est situé sur le chromosome 14 (14 28.0 cM). Le gène encode pour un ARNm de 3419 nt (humain) ou de 3393 nt (murin) et est composé de 7 exons et d'aucun intron. Il a été rapporté qu'il existe 2 variants d'épissage qui diffèrent au niveau du premier exon (1a et 1b) (MAZAUD GUITTOT *et al.*, 2009). Cependant, cela n'entraîne pas de modifications dans la séquence en acides aminés de Gata4 puisque le premier exon est non-codant. L'ARNm de Gata4 est détecté au niveau du cœur, des ovaires, des testicules, des poumons, du foie et de l'intestin grêle chez la souris adulte. Lors du stade embryonnaire, l'ARNm est détecté au niveau du cœur, de l'intestin proximal et distal, des testicules, des ovaires, du foie et aussi dans l'endoderme viscéral et pariétal (ARCECI *et al.*, 1993; KELLEY *et al.*, 1993; LAVERRIERE *et al.*, 1994).

La protéine Gata4 est composée de 442 acides aminés chez l'homme et de 441 acides aminés chez la souris. Son poids moléculaire est de 48 kDa. Ses domaines de liaison à l'ADN et aux cofacteurs, qui sont formés de deux doigts de zinc, ont une forte homologie avec les autres membres de la famille au niveau de la séquence d'acides aminés, soit d'environ 85 % avec Gata5 et Gata6. De plus, Gata4 murin possède 70 % d'homologie avec Gata1 murin et Gata1 de *Drosophila panning* au niveau de la région de liaison à

l'ADN, ce qui suggère un haut degré de conservation des séquences au cours de l'évolution (MOLKENTIN, 2000; PIKKARAINEN *et al.*, 2004). Des études de délétion de domaines ont déterminé que le doigt de zinc en C-terminal ainsi que la région basique adjacente sont nécessaires et suffisants pour permettre la liaison de Gata4 à l'ADN (MORRISEY *et al.*, 1997) et que cette interaction se fait possiblement au niveau du sillon mineur de l'ADN (OMICIANSKI *et al.*, 1993). Le doigt de zinc en N-terminal ne lie pas l'ADN par lui-même, mais influence la stabilité, la spécificité et l'activité transcriptionnelle de Gata4. La majorité des interactions entre Gata4 et ses cofacteurs sont régies par le doigt de zinc en C-terminal (WHYATT *et al.*, 1993; YANG et EVANS, 1992). Les corépresseurs Friends of GATA (Fog) vont plutôt interagir avec le doigt de zinc en N-terminal.

Gata4 possède aussi deux domaines d'activation de la transcription indépendants dans sa région N-terminale (TAD 1 et TAD 2). Le premier domaine d'activation comprend les acides aminés 1 à 74 alors que le deuxième comprend les acides aminés 130 à 177. Ces domaines d'activation de la transcription présentent une homologie avec ceux retrouvés chez Gata5 et 6 et sont conservés dans l'évolution (MORRISEY *et al.*, 1997). Il a aussi été démontré que la région basique adjacente au doigt de zinc en C-terminal est impliquée dans la localisation nucléaire de Gata4 (MORRISEY *et al.*, 1997).

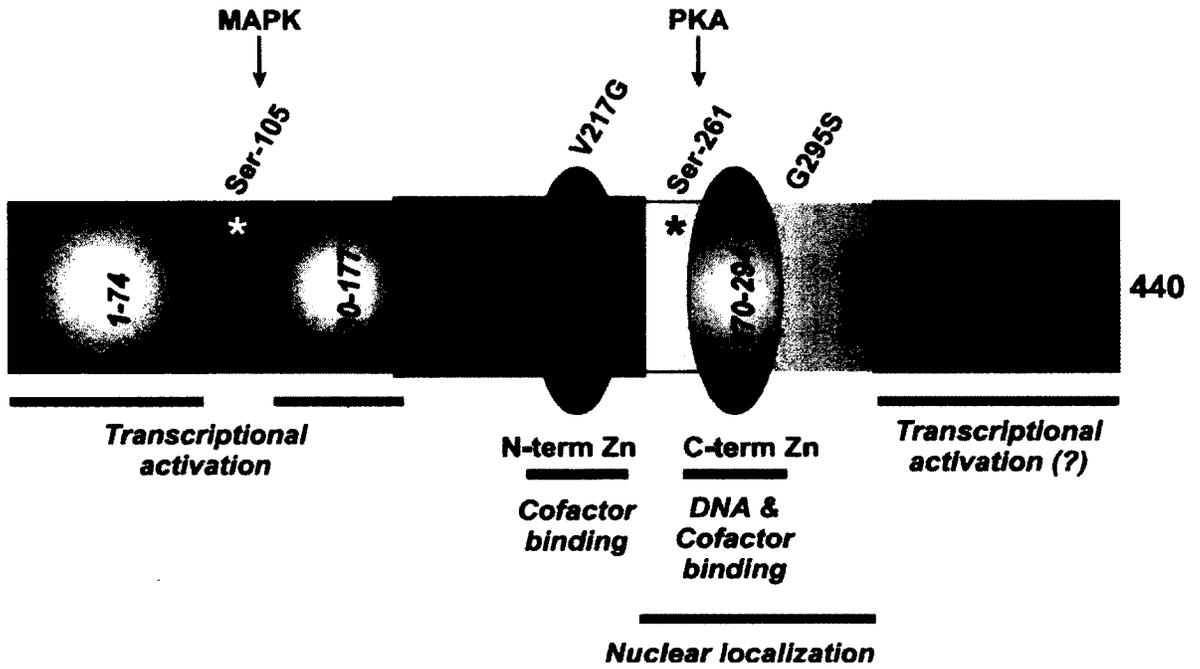
## **4.3 Régulation de Gata4**

### **4.3.1 Régulation transcriptionnelle de *Gata4***

Peu de choses sont connues sur la régulation de GATA4 au niveau transcriptionnel. Une stimulation à l'acide rétinoïque dans un modèle de cellules embryonnaires murines cancéreuses F9 induit son expression (ARCECI *et al.*, 1993). Une étude plus récente a démontré l'importance des 124 premières paires de bases du promoteur *Gata4* pour son expression (ISHIBASHI *et al.*, 2011). Les auteurs de cette étude ont établi par cotransfection que les 2 sites GC-Box et le site E-Box dans cette région sont nécessaires à l'expression de *Gata4* dans des lignées cellulaires normales d'origine testiculaire TM3 et TM4. De plus, ils ont montré qu'un site GATA situé à -1300 pb peut recruter Gata6 et amplifier l'expression du gène rapporteur utilisé, ce qui suggère que Gata6 peut réguler

### **Figure 3. Structure du facteur de transcription Gata4**

La protéine Gata4 murine est composée de 2 domaines de transactivation situés dans sa partie N-terminale (en rouge). Gata4 contient aussi 2 doigts de zinc (en bleu). Le doigt de zinc en N-terminal (215-240) est impliqué dans la liaison de Gata4 avec les cofacteurs Fog. Le doigt de zinc en C-terminal (270-294) est nécessaire pour la liaison de Gata4 avec l'ADN et pour l'interaction avec certains coactivateurs comme Cdx2. Le domaine de translocation nucléaire se situe dans la région adjacente au doigt de zinc en C-terminal (en vert). La sérine 105 et la sérine 261 peuvent être phosphorylées par les voies des MAP kinase et de la PKA, respectivement, ce qui modifie l'activité transcriptionnelle de Gata4.



(PIKKARAINEN *et al.*, 2004)

l'expression de *Gata4*. D'ailleurs, il a été rapporté que l'expression de *Gata4* est fortement diminuée chez les embryons murins *Gata6* *-/-* (MORRISEY *et al.*, 1998). Un autre groupe a confirmé l'implication du site E-Box pour l'expression de *Gata4* en mutant ce site au niveau du promoteur de *Gata4* chez la souris (BOULENDE SAB *et al.*, 2011). Cette équipe a noté une diminution importante du transcrit de *Gata4* possédant l'exon 1a. Par contre, les niveaux d'expression du transcrit possédant l'exon 1b sont légèrement augmentés, ce qui se traduit par des niveaux semblables de la protéine *Gata4* et aucune différence au niveau phénotypique. Au niveau intestinal, l'expression de *Gata4* est induite lors du processus de différenciation cellulaire au niveau de la partie proximale de l'intestin grêle. Cependant, les mécanismes impliqués demeurent toutefois inconnus (BOUDREAU *et al.*, 2002).

#### **4.3.2 Régulation post-traductionnelle de *Gata4***

*Gata4* peut subir plusieurs modifications post-traductionnelles qui influencent sa capacité à lier l'ADN, à transactiver ses gènes cibles, à interagir avec ses cofacteurs et à se localiser au noyau (PIKKARAINEN *et al.*, 2004; TREMBLAY et VIGER, 2003). La plupart des études portant sur la régulation post-traductionnelle de *Gata4* ont été réalisées dans des modèles cellulaires cardiaques et gonadiques. Plusieurs acides aminés de *Gata4* peuvent être phosphorylés, avec 2 sites de phosphorylation particulièrement importants. Le premier site de phosphorylation se situe sur la sérine 105. Dans les cardiomyocytes, ce site est directement phosphorylé par la voie des MAP kinases et plus spécifiquement par ERK2 (LIANG *et al.*, 2001). Cette phosphorylation augmente la capacité de *Gata4* à lier l'ADN ainsi que son activité transcriptionnelle. Une autre équipe de recherche a confirmé que *Gata4* est phosphorylé sur la sérine 105 par la MAPK p38, suite à une activation de la RhoA GTPase, protéine impliquée dans la réorganisation du cytosquelette (CHARRON *et al.*, 2001). Le deuxième site de phosphorylation se situe sur la sérine 261. Cette phosphorylation directe est dépendante de la voie cAMP/PKA et a été démontrée dans un modèle de cellules gonadiques cancéreuses murines MA-10 (TREMBLAY et VIGER, 2003). Un inhibiteur spécifique de la voie de la PKA bloque la phosphorylation de *Gata4* sur cette sérine. Cette phosphorylation augmente l'activité transcriptionnelle de *Gata4* sur différents promoteurs dans le modèle de cellules cancéreuses gonadiques MA-10. *Gata4*

contient un site de sumoylation au niveau de la lysine 366. Ce site est sumoylé par la small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) (WANG *et al.*, 2004). Cette modification post-traductionnelle entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle de Gata4 et contrôle sa localisation nucléaire chez les cardiomyocytes. Un autre groupe de recherche a démontré qu'au niveau intestinal, Gata4 peut aussi être sumoylé. Cependant, cette modification ne régule ni son activité transcriptionnelle ni sa localisation nucléaire. Le rôle de cette modification post-traductionnelle au niveau intestinal demeure pour l'instant inconnu (BELAGULI *et al.*, 2012).

#### 4.4 Partenaires d'interaction

Gata4 coopère avec plusieurs cofacteurs pour réguler l'expression de gènes cibles. La liste des cofacteurs de Gata4 augmente constamment et varie d'un type cellulaire à un autre. Ces interactions au niveau des doigts de zinc de Gata4 augmentent ou diminuent son activité transcriptionnelle.

##### 4.4.1 Cdx2 et Hnf1 $\alpha$

Cdx2 est un facteur de transcription de la famille des gènes homéotiques. Il est exprimé uniquement dans les cellules épithéliales intestinales chez la souris adulte. Lors du développement, sa perte (Cdx2<sup>-/-</sup>) entraîne la mort embryonnaire vers le jour 3,5 causé par un défaut d'implantation de l'embryon (STRUMPF *et al.*, 2005). Cdx2 est impliqué dans l'expression de plusieurs gènes spécifiques à l'intestin, tels que la sucrase isomaltase (SI) (JAMES *et al.*, 1994) et la lactase phlorizin hydrolase (LPH) (TROELSEN *et al.*, 1997). La surexpression de Cdx2 dans des cellules épithéliales intestinales de rat (IEC-6) diminue la prolifération cellulaire avant l'atteinte de la confluence et favorise la différenciation de celles-ci (SUH et TRABER, 1996). Par contre, suivant l'atteinte de la confluence, les IEC-6 vont proliférées davantage et s'empiler, ce qui suggère que l'effet de Cdx2 sur la prolifération est dépendante d'autres facteurs. *In vivo*, Cdx2 est essentiel à l'homéostasie intestinale et sa perte entraîne des changements majeurs au niveau morphologique menant à l'inflammation et au cancer (COSKUN *et al.*, 2011).

Hnf1 $\alpha$  est un facteur de transcription exprimé dans le foie, le pancréas, l'intestin et les reins. Il est impliqué dans l'expression de gènes au niveau de ces tissus (MENDEL et CRABTREE, 1991). Dans l'intestin grêle de souris adultes, Hnf1 $\alpha$  est exprimé le long de l'axe crypte villosité, et davantage dans les cellules différenciées où il régule l'expression de gènes telles que *Gip*, *GLP1* et *Slc26a3* (BOUDREAU *et al.*, 2002; LUSSIER *et al.*, 2010). Sa perte *in vivo* entraîne des défauts de la barrière épithéliale intestinale, de la maturation des cellules de Paneth, et une diminution du nombre de cellules entéroendocrines (LUSSIER *et al.*, 2010). De plus, les souris Hnf1 $\alpha$  sont hyperglycémiques (LEE *et al.*, 1998). La première étude qui a démontré une coopération entre Cdx2, Hnf1 $\alpha$  et Gata4 portait sur la régulation de la SI (BOUDREAU *et al.*, 2002). Les auteurs ont montré par cotransfection que ces trois facteurs agissent en synergie pour activer le promoteur de la SI. De plus, l'utilisation de promoteurs mutés a démontré que l'interaction physique entre Gata4 et son site sur ce promoteur n'était pas nécessaire pour assurer cette synergie entre les trois facteurs.

#### 4.4.2 Friends of Gata (Fog)

Les Fog forment une classe de protéines possédant de nombreux doigts de zinc liant *in vitro* les 6 membres de la famille des facteurs de transcription Gata. Les interactions physiques entre Fog et Gata4 (Fog/Gata4) sont essentielles pour le développement et le fonctionnement normal de plusieurs tissus (CANTOR et ORKIN, 2005). L'interaction de Fog1 avec Gata a été d'abord observée par double hybride en utilisant comme appât les doigts de zinc de Gata1 (TSANG *et al.*, 1997). Quelques années plus tard, Fog2 a été identifié (SVENSSON *et al.*, 1999; TEVOSIAN *et al.*, 1999). Fog1 est composé de 995 acides aminés et son poids moléculaire est de 110 kDa. Il contient 9 doigts de zinc distribués sur l'ensemble de la protéine. Fog2 est quant à lui composé de 1151 acides aminés et a un poids moléculaire de 128 kDa. Il contient 8 doigts de zinc (CANTOR et ORKIN, 2005). Les Fog sont exprimés tôt chez l'embryon de souris, soit E8,5 pour Fog1 (TSANG *et al.*, 1997) et E9,5 pour Fog2 (LU *et al.*, 1999). Les souris *Fog1*<sup>-/-</sup> meurent entre les jours embryonnaires 10,5 et 12,5 d'une anémie sévère causée par un manque de maturation des érythrocytes (TSANG *et al.*, 1998). Les souris *Fog2*<sup>-/-</sup> meurent elles aussi

au stade embryonnaire, suite à des défauts cardiaques entre les jours embryonnaires 12,5 à 15,5 (TEVOSIAN *et al.*, 2000). L'interaction physique entre les Fog et les facteurs de transcriptions Gata implique le doigt de zinc en N-terminal des facteurs de transcription Gata. Une mutation de la valine 205 en glycine (V205G) de Gata1 diminue sévèrement la formation du complexe Fog1/Gata1 sans affecter la capacité de ce dernier à lier l'ADN (CRISPINO *et al.*, 1999). Le même groupe a aussi démontré que la mutation de la valine correspondante chez Gata4 en glycine (V217G) abolit l'interaction physique entre les Fog et Gata4 (CRISPINO *et al.*, 2001).

Afin de mieux comprendre les rôles des interactions Fog/Gata *in vivo*, différents « *Knock in* » murins exprimant Gata1 V205G (Gata1<sup>ki/ki</sup>) ou Gata4 V217G (Gata4<sup>ki/ki</sup>) ont été générés. Les souris Gata1<sup>ki/ki</sup> meurent durant l'embryogenèse d'une anémie sévère causée par un manque de maturation des érythrocytes (CRISPINO *et al.*, 1999), phénotype semblable à celui retrouvé chez les souris Gata1<sup>-/-</sup> (FUJIWARA *et al.*, 1996) et Fog1<sup>-/-</sup> (TSANG *et al.*, 1998). Les souris Gata4<sup>ki/ki</sup> meurent aussi durant l'embryogenèse suite à des problèmes cardiaques (CRISPINO *et al.*, 2001) similaires à ceux retrouvés chez les souris Gata4<sup>-/-</sup> (MOLKENTIN *et al.*, 1997) et Fog2<sup>-/-</sup> (TEVOSIAN *et al.*, 2000). Ces études ont permis de démontrer que les interactions Fog/Gata sont requises pour le développement normal chez la souris. Au niveau intestinal, Fog1 est majoritairement exprimé, plus fortement au niveau des cellules épithéliales de la partie proximale de l'intestin grêle. Son patron d'expression est semblable à celui de Gata4. Il est d'ailleurs coexprimé avec Gata4. Fog2 est faiblement exprimé avec une expression maximale dans la partie distale de l'intestin grêle. Ceci suggère donc que Gata4 interagirait plutôt avec Fog1 au niveau intestinal (BEULING *et al.*, 2008). En raison de la létalité des modèles Fog1<sup>-/-</sup>, Fog2<sup>-/-</sup> et Gata4<sup>ki/ki</sup>, une équipe a généré une souris Gata4<sup>ki/ki</sup> inducible au tamoxifène (BEULING *et al.*, 2008). Après un traitement au tamoxifène de souris âgées de 8 semaines, celles-ci n'expriment plus Gata4 de type sauvage au niveau intestinal, alors que Gata4 V217G continue d'être exprimé. Ils ont démontré que la perte d'interaction entre les Fog et Gata4 induit, au niveau du jéjunum, des gènes normalement retrouvés dans l'iléon. Ceci suggère que les Fog sont impliqués dans le maintien de l'identité du jéjunum en réprimant certains gènes iléaux.

## 4.5 Fonctions de Gata4

### 4.5.1 Fonctions cardiaques

Au niveau cardiaque, Gata4 est nécessaire au développement cardiaque murin, car sa perte entraîne la mort embryonnaire vers le jour 9.5 en raison d'un mauvais repliement du tube cardiaque (MOLKENTIN *et al.*, 1997). Gata4 est impliqué dans la prolifération, la différenciation et la survie des cardiomyocytes (GREPIN *et al.*, 1995; SUZUKI *et al.*, 2004). Ce facteur régule l'expression de plusieurs gènes au niveau cardiaque, dont la cycline D2, la chaîne lourde de la myosine alpha ( $\alpha$ -MHC), le peptide natriurétique auriculaire (ANP), le peptide natriurétique cérébral (BNP), la Tropomyosine I et Bcl2 (KOBAYASHI *et al.*, 2006; PIKKARAINEN *et al.*, 2004; ROJAS *et al.*, 2008). Chez l'homme, quelques études ont rapporté des polymorphismes dans le gène de *GATA4* chez des gens atteints de cardiopathie congénitale (CHEN *et al.*, 2010; HIRAYAMA-YAMADA *et al.*, 2005).

### 4.5.2 Fonctions intestinales

#### 4.5.2.1 *In cellulo*

Il a été démontré que Gata4 régule plusieurs gènes impliqués dans la digestion des nutriments. La SI (BOUDREAU *et al.*, 2002), la LPH (VAN WERING *et al.*, 2004) et l'IFABP (GAO *et al.*, 1998) en sont quelques exemples. Il a été démontré que la surexpression de Gata4, Cdx2 et Hnf1 $\alpha$  dans la lignée de cellules épithéliales normales humaines HIEC entraîne l'expression de certaines molécules de jonction et améliore la polarisation cellulaire (BENOIT *et al.*, 2010). Une autre étude a montré que Gata4 est impliqué dans la régulation positive de la Clau-2 dans les cellules cancéreuses du colon Caco-2/15 (ESCAFFIT *et al.*, 2005).

#### 4.5.2.2 *In vivo*

Dans l'épithélium intestinal, *Gata4* est exprimé avec un gradient croissant le long de l'axe crypte-villosité. De plus, Gata4 possède un gradient décroissant dans l'axe rostro-

caudal, c'est-à-dire qu'il est exprimé fortement dans la partie proximale de l'intestin grêle et absent dans l'iléon distal et le colon (BOUDREAU *et al.*, 2002). *Gata4* est aussi exprimé dans les entérocytes différenciés et les cellules de Paneth, mais est absent des cellules à mucus et des cellules entéroendocrines positives pour la chromogranine A (BOSSE *et al.*, 2006; BOUDREAU *et al.*, 2002). Il est à noter que *Gata5* est exprimé dans les cellules entéroendocrines et que *Gata6* est coexprimé avec *Gata4*. Cependant, l'expression de *Gata6* n'est pas uniquement limitée à la partie proximale de l'intestin grêle (BEULING *et al.*, 2011).

L'inactivation conditionnelle de *Gata4* spécifiquement au niveau intestinal a montré que *Gata4* était impliqué dans le maintien de l'identité du jéjunum par rapport à l'iléon (BOSSE *et al.*, 2006). Les auteurs ont généré une souris exprimant un mutant perte de fonction de *Gata4* (*Gata4*<sup>ΔEx2</sup>) inductible par l'injection de tamoxifène. Suivant un traitement au tamoxifène chez des souris âgées de 8 semaines, ils ont observé que l'expression des gènes *Fabp1* et *LPH* normalement exprimés au niveau du jéjunum et absents de l'iléon, est diminuée fortement (80 % et 90 %) au niveau du jéjunum des souris *Gata4*<sup>ΔEx2</sup>. De plus, ils ont observé une induction des gènes *Asbt1* (20x) et *Fabp6* (644x) au niveau du jéjunum des souris, alors que ceux-ci sont normalement exprimés au niveau de l'iléon. Les auteurs ont aussi évalué l'effet de la perte de *Gata4* sur les différentes populations de cellules épithéliales intestinales. Ils ont noté une augmentation du nombre de cellules à mucus au niveau du jéjunum. Ces cellules sont normalement retrouvées en plus grand nombre au niveau de l'iléon. De plus, la distribution de certains sous-types de cellules entéroendocrines au niveau du jéjunum ressemble à celle retrouvée au niveau de l'iléon. Ces observations ont permis de conclure que *Gata4* était responsable de l'identité du jéjunum.

Une deuxième étude est venue confirmer ces résultats (BATTLE *et al.*, 2008). L'équipe de Steven Duncan a aussi généré une souris invalidée conditionnellement pour *Gata4* au niveau intestinal en délétant les doigts de zinc et le domaine de localisation nucléaire. Les auteurs ont ensuite effectué une analyse par micropuce à ADN et ont observé au niveau du jéjunum une perte d'expression de 47 % des gènes (353 gènes) jéjunum spécifique chez les souris invalidées pour *Gata4*, et un gain ectopique de 47 % des gènes

(265 gènes) normalement exprimés dans l'iléon. Parmi les gènes modulés à la hausse au niveau du jéjunum, on note plusieurs transporteurs de sels biliaires, alors que parmi les gènes modulés à la baisse, il y a des transporteurs d'acides gras et du cholestérol. Les auteurs ont par la suite vérifié si la capacité du jéjunum d'absorber les nutriments était affectée chez les souris invalidées pour *Gata4* au niveau de l'intestin. Ils ont noté que les animaux avaient des taux plasmatiques moins élevés en acide gras et en cholestérol, suggérant ainsi des défauts au niveau de l'absorption de ceux-ci. Cependant, le poids des animaux mutants n'était pas significativement différent des animaux contrôles. Il est à noter que l'analyse par micropuce a suggéré que certaines molécules de jonctions pourraient être modulées par la perte de *Gata4*. Les auteurs n'ont cependant pas caractérisé la régulation des molécules de jonctions.

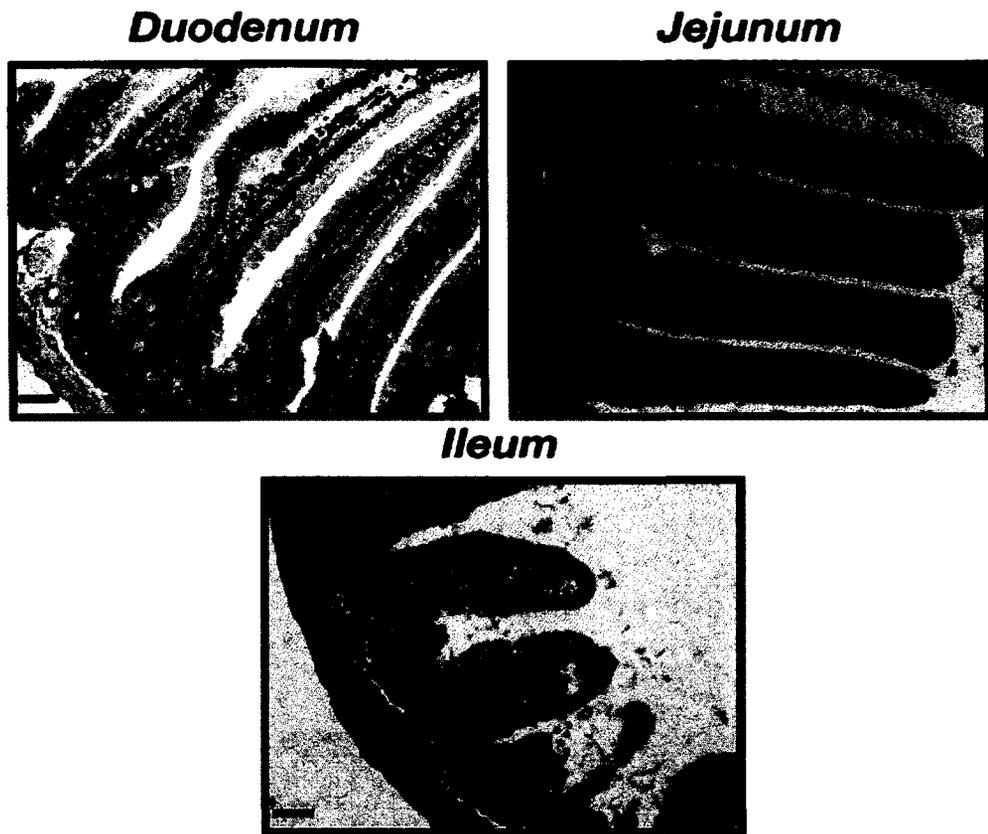
Une autre étude est venue confirmer que la perte de *Gata4* au niveau intestinal affecte l'absorption des acides gras (PATANKAR *et al.*, 2011). Dans cette étude, les auteurs ont soumis des souris invalidées conditionnellement pour *Gata4* au niveau intestinal à une diète riche en acides gras et ont noté une résistance des souris à l'obésité. Plus récemment, une étude a évalué l'effet d'une double invalidation de *Gata4* et de *Gata6* au niveau intestinal (BEULING *et al.*, 2011). Les auteurs ont démontré que le phénotype observé au niveau du jéjunum des animaux invalidés pour *Gata6* est amplifié chez les doubles mutants. Ils ont noté une diminution accrue de la prolifération cellulaire, une baisse d'expression du marqueur des cellules entéroendocrines *Ngn3* ainsi qu'une forte diminution de l'expression du lysozyme, marqueur des cellules de Paneth. Ils ont donc conclu que les facteurs de transcription *Gata4* et *Gata6* ont certaines fonctions redondantes dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales.

Chez l'homme, une méta-analyse de plusieurs banques de données a permis d'associer de multiples polymorphismes de *GATA4* à des taux plasmatiques réduits en triglycérides (LAMINA *et al.*, 2011). Cette étude est un argument supplémentaire qui soutient que les fonctions de *Gata4* chez la souris pourraient être semblables à celles retrouvées chez l'homme.

**Figure 4. Localisation de Gata4 et des corépresseurs Fog au niveau intestinal.**

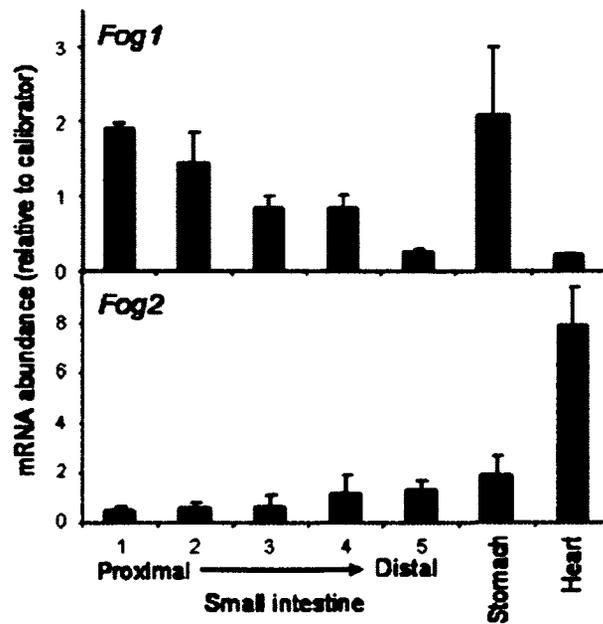
a) Immunohistochimies démontrant que Gata4 est exprimé le long de l'axe crypte-villosité, avec une expression maximale au niveau de la villosité. Gata4 montre aussi un gradient décroissant selon l'axe rostro-caudal, et n'est pas exprimé dans la partie terminale de l'iléon. b) Fog1 possède un patron d'expression semblable à celui de Gata4 selon l'axe rostro-caudal, tel que déterminé par PCR quantitatif, avec une expression plus forte dans la partie proximale de l'intestin, ce qui suggère que Gata4 pourrait interagir surtout avec celui-ci au niveau intestinal. Fog2 est exprimé plus faiblement au niveau intestinal, avec peu de variations d'expression. Fog2 est par contre fortement exprimé au niveau de l'estomac.

a)



(BATTLE *et al.*, 2008)

b)



BEULING *et al.*, 2008

## 4.6 Gata et inflammation

Plusieurs études ont démontré un rôle clé de certains membres de la famille Gata dans l'inflammation. Par exemple, Gata3 est un facteur essentiel à la maturation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> en cellules Th2 ainsi qu'à l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires par ces cellules (BARNES, 2008; HO et PAI, 2007). Gata3 pourrait être une cible de traitement dans l'asthme allergique (BARNES, 2011). Cependant, peu d'études ont étudié le rôle potentiel de Gata4 dans le contrôle de la réponse inflammatoire des tissus où il est exprimé.

Au niveau intestinal, une première étude a démontré que Gata4 participe à la régulation de gènes impliqués dans la réponse de la phase aiguë de façon C/EBP-dépendante (TURGEON *et al.*, 2008). Les auteurs ont de plus spécifiquement démontré que Gata4 interagit physiquement avec les facteurs de transcription C/EBP pour moduler l'expression de leurs gènes cibles incluant l' $\alpha$ -acide glycoprotéine, l'haptoglobine et le thiostatin. De plus, ils ont montré que la surexpression de Gata4 dans les cellules IEC-6 entraîne une diminution de l'expression des facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$ . Une deuxième étude a montré que *GATA4* est induit dans des échantillons de colon provenant de patients atteints de maladies inflammatoires intestinales chroniques telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (HAVERI *et al.*, 2009). En effet, alors qu'en condition normale, *GATA4* n'est pas exprimé au niveau du colon, les auteurs ont noté l'expression de *GATA4* par immunohistochimie dans les zones enflammées du colon chez ces patients. Ils ont proposé que cette expression ectopique pourrait être dépendante du TGF- $\beta$ .

Dans notre laboratoire, un criblage par micropuce à ADN effectué sur des échantillons d'IEC-6/Cdx2 dans lesquels les niveaux protéiques de Gata4 ont été réduits par interférence à l'ARN a permis d'identifier une nouvelle cible de Gata4, soit le gène « Pancreatitis-associated protein 1 » (*Pap1*) (BROUILLARD, 2008). Ce gène fait partie d'une famille de gènes qui serait impliquée dans la régulation de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales intestinales

## 5. Pap1

### 5.1 Généralités

Pap1 est une petite protéine de 16,6 kDa initialement identifiée dans le jus pancréatique de rats souffrants de pancréatite aiguë (KEIM *et al.*, 1984). Pap1 fait partie de la famille des Reg, sous-famille de lectines de type C comprenant 3 membres chez le rat, soit Pap1, Pap2 et Pap3. Chez la souris, leurs homologues se nomment Reg-3 $\alpha$  (Pap2), Reg-3 $\beta$  (Pap1) et Reg-3 $\gamma$  (Pap3) (VITERBO *et al.*, 2008). La superfamille des lectines de type C est un groupe de protéines qui possèdent au moins un domaine de liaison aux glucides (CRD). Ce domaine hautement conservé entre les différents membres de cette famille peut jouer des rôles différents. Il existe 17 sous-familles de lectines de type C classées selon la structure et les fonctions de ces protéines. Certaines agissent comme récepteur transmembranaire alors que d'autres sont sécrétées comme Pap1. Pap1 est le plus petit membre des lectines de type C. Cette protéine ne possède qu'un domaine CRD et un peptide signal en N-terminal (CHRISTA *et al.*, 1994).

### 5.2 Patron d'expression

*Pap1* est généralement peu exprimé en conditions normales. En conditions de stress tel que l'inflammation, l'ARNm de *Pap1* est induit au niveau du pancréas, mais aussi dans plusieurs autres tissus tels que l'estomac, les reins, le foie, les glandes salivaires, les gonades et le cerveau (CLOSA *et al.*, 2007). Au niveau intestinal, l'ARNm de *Pap1* est exprimé constitutivement, mais la protéine n'est pas détectée en conditions normales (DUSETTI *et al.*, 1993). Bien que Pap1 est surtout exprimée et sécrétée par les cellules de Paneth, les entérocytes et les cellules à mucus peuvent également la sécréter en plus faible quantité (BROUILLARD, 2008; MASCIOTRA *et al.*, 1995). Chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales chroniques, l'expression et la sécrétion de Pap1 dans la lumière du tube digestif sont augmentées (GIRONELLA *et al.*, 2005). De plus, Pap1 est détecté dans le sang de ces patients : les niveaux sanguins sont proportionnels à la gravité de l'inflammation. Une étude *in cellulo* a montré que son expression est induite par l'INF- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-6, ce qui pourrait expliquer son induction en contexte inflammatoire

(DUSETTI *et al.*, 1995). L'expression de *Pap1* peut aussi être induite par les bactéries à Gram négatif comme *Salmonella enteritidis* (VAN AMPTING *et al.*, 2012).

### 5.3 Fonctions

*Pap1* est rapidement et fortement induite en contexte inflammatoire. Ses actions peuvent être locales ou systémiques puisque *Pap1* est considérée comme une protéine de phase aigüe. Il a été démontré que la sécrétion de *Pap1* lors de pancréatite aigüe confère aux cellules pancréatiques une résistance à l'apoptose, ce qui améliore la survie chez le rat (FIEDLER *et al.*, 1998). Au niveau du foie, *Pap1* induit une résistance à l'apoptose par le TNF- $\alpha$  chez les hépatocytes (SIMON *et al.*, 2003). Au niveau intestinal, il a été démontré que *Pap1* peut lier et agréger plusieurs bactéries incluant les bactéries Gram positives, Gram négatives, anaérobiques et aérobiques. Cependant, *Pap1* ne semble pas inhiber leur croissance (IOVANNA *et al.*, 1991). Récemment, une invalidation conditionnelle au niveau intestinal de *Reg3 $\beta$*  (*Reg3 $\beta$ <sup>-/-</sup>*), l'homologue murin de *Pap1*, a permis de démontrer que cette lectine atténue l'infection causée par *Salmonella* (VAN AMPTING *et al.*, 2012). Dans cette étude, les auteurs ont infecté par voie orale des souris avec *Salmonella enteritidis* (Gram négatif) ou *Listeria monocytogenes* (Gram positif). Ils ont constaté chez les animaux *Reg3 $\beta$ <sup>-/-</sup>* une augmentation significative de la quantité de *Salmonella enteritidis* au niveau de la muqueuse du colon, des noyaux mésentériques, de la rate et du foie. Cependant, le nombre de bactéries viables dans les fèces n'était pas différent entre les deux groupes d'animaux. La quantité de *Listeria monocytogenes* n'était pas différente entre les souris contrôles et mutantes. Ces résultats suggèrent que *Reg3 $\beta$*  limite la translocation de *Salmonella enteritidis*.

### 5.4 Régulation de *Pap1* par *Gata4*

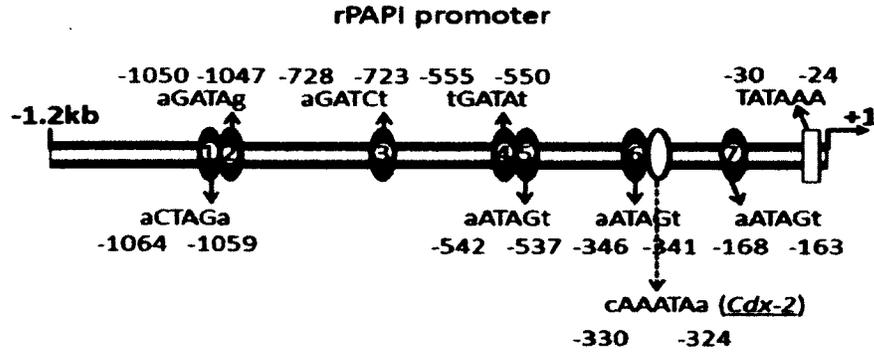
L'analyse d'une région de 1.2 kb du promoteur de *Pap1* a identifié 7 sites Gata et 1 site Cdx2 au niveau de ce promoteur (Figure 5a). Il a été démontré que *Pap1* est induit lors de la différenciation des cellules IEC-6/Cdx2 (Figure 5b). La diminution protéique de *Gata4* par shARN réduit l'expression de *Pap1* (Figure 5b). Des essais luciférases ont aussi

démontré que Gata4 et Cdx2 agissent en synergie pour activer le promoteur de *Pap1* (Figures 5c et 5d). Des mutations de différents sites Gata du promoteur de *Pap1* ont identifié le site #7 comme étant le plus important pour assurer la synergie entre Gata4 et Cdx2 (Figure 5c). Des études de mutagenèse de Gata4 ont démontré que le doigt de zinc en C-terminal est nécessaire pour activer le promoteur de *Pap1* et ainsi supporter l'effet synergique entre Gata4 et Cdx2 (Figure 5d). Étonnamment, le doigt de zinc en N-terminal Zn1 semble être nécessaire pour transmettre l'action répressive de Fog1, sur l'expression de *Pap1* (Figures 5d et 5e).

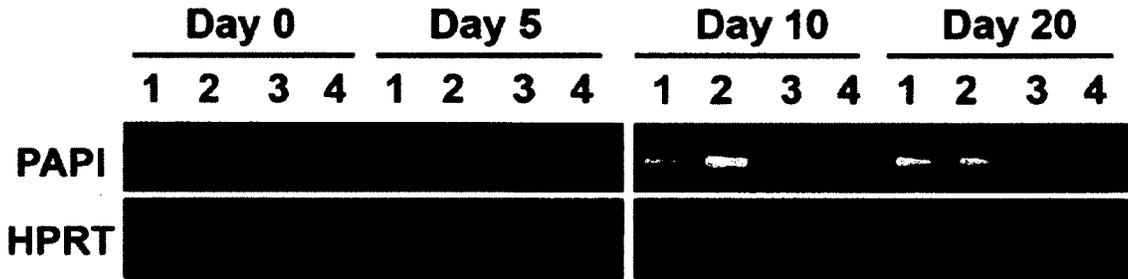
**Figure 5. Implication de Gata4, Cdx2 et Fog1 dans la régulation de *Pap1*.**

Précédents résultats du laboratoire non publiés a) Schéma du promoteur de *Pap1* chez le rat. Par analyse informatique à l'aide du logiciel MatInspector, 7 sites Gata et 1 site Cdx2 ont été identifiés dans la région de 1.2 kb du promoteur de *Pap1*. b) Lors d'une cinétique de différenciation des cellules IEC-6/Cdx2 s'étalant sur 20 jours, l'expression de *Pap1* est induite dans la condition contrôle (Piste 1) et dans des cellules IEC-6/Cdx2 exprimant un shARN non-ciblant (Piste 2). La diminution des niveaux protéiques de Gata4 à l'aide de deux shARN différents (Piste 3 et 4) inhibe l'expression de *Pap1*. c) Cotransfections réalisées dans des cellules Caco2/15 avec les vecteurs luciférase contenant le promoteur de *Pap1* de type sauvage ou le promoteur de *Pap1* muté, et différentes combinaisons de Gata4 et Cdx2, montrant l'importance du site GT7. d) Cotransfections réalisées dans des cellules Caco-2/15 avec le vecteur luciférase contenant le promoteur *Pap1* et différentes combinaisons de Gata4, Gata4 muté et Cdx2. Gata4 active la transcription du gène rapporteur sous le contrôle du promoteur *Pap1* en présence de Cdx2. Cet effet synergique dépend du doigt de zinc en C-terminal (Zn2). De plus, une mutation inactivant le doigt de zinc en N-terminal (Zn1) augmente significativement l'activité transcriptionnelle. e) Cotransfections réalisées dans des cellules Caco-2/15 avec le vecteur luciférase contenant le promoteur *Pap1* et différentes combinaisons de Gata4, Gata4 muté, Cdx2 et Fog1. Le doigt de zinc en N-terminal de Gata4 est nécessaire pour assurer l'effet répresseur de Fog1.

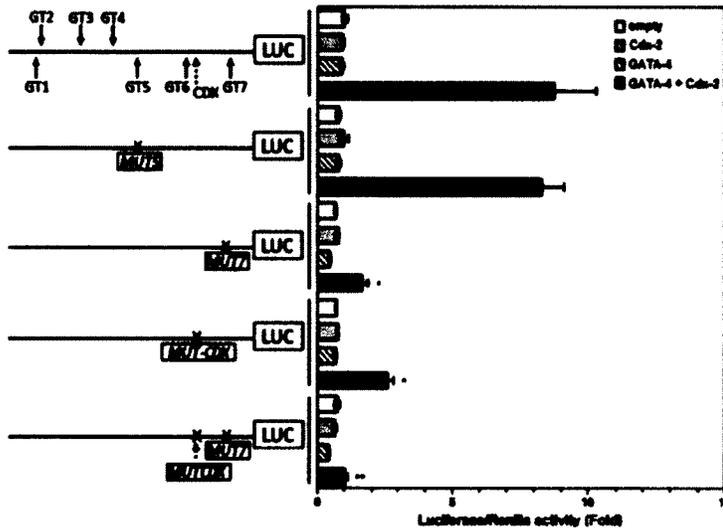
a)



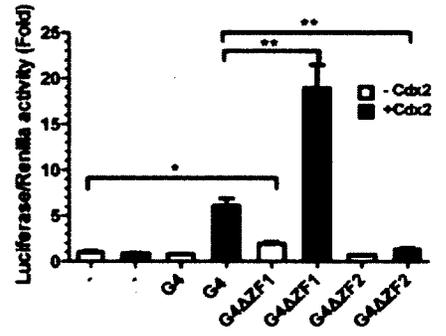
b)



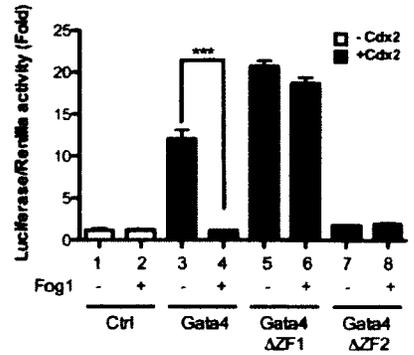
c)



d)



e)



## 6. Problématique de recherche

Dans le cadre de ma maîtrise, j'ai étudié deux volets reliés aux fonctions de Gata4 dans l'épithélium intestinal, soient;

- 1) La régulation de l'expression de *Pap1* par les facteurs de transcription Gata4, Cdx2 et Fog1.
- 2) La régulation de la barrière épithéliale intestinale par Gata4 dans un modèle murin.

La problématique pour chacun des projets sera élaborée séparément dans les deux sections suivantes.

### 6.1 La régulation de l'expression de *Pap1* par les facteurs de transcription Gata4, Cdx2 et Fog1.

En plus de former une barrière physique contre le contenu intestinal, les cellules épithéliales sécrètent différents peptides antimicrobiens afin de limiter les invasions bactériennes. Dans notre laboratoire, des résultats ont suggéré l'implication des facteurs de transcription Gata4, Cdx2 et Fog1 dans la régulation transcriptionnelle de *Pap1*, un peptide antimicrobien. Je me suis fixé comme objectif de déterminer le rôle de Fog1 dans la régulation de *Pap1*.

### 6.1 Régulation de la barrière épithéliale intestinale par Gata4

Le maintien de la barrière épithéliale intestinale s'effectue en partie par le complexe apical de jonctions. Or, il a été démontré *in cellulo* que Gata4 est impliqué dans l'expression de certaines molécules de jonctions. Dans un modèle murin de délétion intestin-spécifique de *Gata4*, une analyse par micropuce à ADN suggère que la perte de Gata4 entraîne une dérégulation de l'expression de certaines molécules de jonction, dont la Clau-2, une protéine qui augmente la perméabilité des jonctions serrées et qui est induite lors des maladies inflammatoires intestinales chroniques.

Nous émettons l'hypothèse que la perte de *Gata4* au niveau intestinal entraîne des modifications dans la composition des jonctions intercellulaires et que ces changements affectent la capacité des cellules épithéliales intestinales à former une barrière étanche à la microflore intestinale. Afin de répondre à cette hypothèse, les objectifs suivants ont été établis :

- 1) Caractériser les changements dans la composition des jonctions intercellulaires suivant la perte de *Gata4* dans un modèle murin.
- 2) Caractériser si ces changements affectent la perméabilité transépithéliale et la capacité des cellules épithéliales intestinales à former une barrière étanche à la microflore intestinale.
- 3) Vérifier si la modification de la perméabilité transépithéliale affecte le système immunitaire.

## Matériel et méthodes

### 1. Culture cellulaire

#### 1.1 IEC-6 et IEC-6/Cdx2

Les cellules IEC-6 ont été isolées à partir d'iléon de rat (QUARONI *et al.*, 1979). Elles possèdent des caractéristiques propres aux cellules normales cryptales, tant au niveau morphologique qu'au niveau de l'expression génique. Les cellules IEC-6/Cdx2 ont été obtenues en transfectant un vecteur exprimant le facteur de transcription Cdx2 dans les cellules IEC-6 (SUH et TRABER, 1996). Ces cellules expriment faiblement Cdx2 de base, mais celui-ci peut être induit par l'ajout d'IPTG au milieu de culture. Comparativement aux cellules IEC-6, les cellules IEC-6/Cdx2 forment des structures multicellulaires à l'atteinte de la confluence et entament un processus de différenciation partielle en exprimant notamment la SI. Les cellules IEC-6 et IEC-6/Cdx2 ont été cultivées dans du DMEM (WISSENT Inc, St-Bruno, Canada) supplémenté avec 5 % de sérum foetal bovin (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, USA), 2 mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Canada), 0,01 mM de tampon HEPES (Gibco BRL, Burlington, Canada), 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Canada) et 0,1 U/ml d'insuline biosynthétique humaine (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Danemark). Le milieu de culture est changé aux 2-3 jours. Lors de l'atteinte de la confluence, les cellules sont réensemencées selon un ratio allant de 1:2 à 1:10 selon les besoins. Ces cellules sont maintenues dans un incubateur dont la température est de 37 °C avec un taux de CO<sub>2</sub> de 5 %. L'induction de Cdx2 est réalisée en ajoutant 4 mM d'IPTG (Fisher Scientific, Mississauga, Canada) au milieu de culture.

#### 1.2 Coculture d'IEC-6/Cdx2 et de cellules mésenchymateuses humaines

La coculture est un modèle de culture cellulaire mis au point dans notre laboratoire (LUSSIER *et al.*, 2008). Des cellules IEC-6/Cdx2 sont cultivées au dessus d'une monocouche de cellules mésenchymateuses provenant d'iléon foetal humain âgé de 17 à 20

semaines. Les cellules IEC-6/Cdx2 cultivées ainsi forment une monocouche de cellules épithéliales et entament un processus de différenciation plus complet que si elles avaient été cultivées seules sur plastique. En coculture, les cellules IEC-6/Cdx2 forment des jonctions intercellulaires bien développées et expriment fortement plusieurs marqueurs fonctionnels de l'intestin. Le facteur de transcription Gata4 est induit dès le troisième jour de la coculture et son expression reste relativement stable par la suite.

### **1.3 HEK293T**

Les cellules HEK293T sont des cellules transformées de rein fœtal humain (AIELLO *et al.*, 1979). Elles sont utilisées pour la production de rétrovirus ou de lentivirus. Elles sont cultivées dans du DMEM supplémenté de 10 % FBS, 2 mM de glutamine, 0,01 mM de tampon HEPES et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine.

### **1.4 Lignées cellulaires stables**

#### **1.4.1 ADN et production rétrovirale**

Les vecteurs pBabePuro Gata4, Gata4  $\Delta$ 216-240 et Gata4  $\Delta$ 270-294 ont été fournis par le professeur Claude Asselin (RÉMILLARD, 2009). 5 µg de ces vecteurs ont été mélangés à 5 µg de vecteur rétroviral pAmpho (5 µg) et à 1,5 mL d'OptiMEM (Invitrogen, Burlington, Canada). Ce mélange est ensuite ajouté à 1,5 mL d'OptiMEM contenant 48 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, Canada) pour incubation pendant 20 minutes à température ambiante. Pendant l'incubation, le milieu de culture d'un Pétri de cellules HEK293T à environ 90 % de confluence, est remplacé par 5 mL d'OptiMEM. Après l'incubation, le mélange ADN/Lipofectamine 2000/OptiMEM est ajouté goutte à goutte dans le Pétri. Les cellules sont incubées pendant 4 h à 37 °C et le milieu OptiMEM est par la suite remplacé par 7 mL de milieu DMEM contenant 10 % FBS. Les cellules sont incubées pendant 2 jours à 37 °C. Le milieu de culture des cellules HEK293T contenant les particules rétrovirales est ensuite filtré à l'aide d'un filtre 0,45 µm. La suspension rétrovirale est divisée en format de 700 µL et conservée à -80 °C.

### 1.4.2 ADN et production lentivirale

Dix µg d'ADN sont mélangés avec la même quantité des plasmides pLP1, pLP2, et pLPVSVG. Ce mélange d'ADN est ajouté à 1,5 mL d'OptiMEM et à 40 µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, Canada) pour incubation pendant 20 minutes à température ambiante. Pendant l'incubation, le milieu de culture des cellules HEK293T est remplacé par 5 ml de milieu OptiMEM. Le mélange d'ADN est ajouté goutte à goutte au milieu de culture des cellules HEK293T et incubé pendant 4 h à 37 °C. L'OptiMEM est par la suite remplacé par du DMEM contenant 10 % FBS et l'incubation des cellules se poursuit pendant 48 h. Le milieu de culture est récolté puis filtré à l'aide d'un filtre de 0,45 µm. Des aliquots de 700 µL sont congelés à -80 °C. Il est à noter que les cellules HEK293T sont transfectées à une confluence d'environ 90 %.

### 1.4.3 Mutagénèse de Gata4

La mutagénèse de Gata4V217G dans pBabePuro a été réalisée à l'aide de la trousse QuikChange Lightning (Agilent Technologies, Mississauga, Canada) selon le protocole du détaillant. La construction a été séquencée. Les amorces utilisées pour muter la valine en glycine en position 217 sont indiquées dans le tableau 1.

**Tableau 1. Oligonucléotides utilisés pour muter la valine 217 de Gata4 en Glycine**

Séquences 5' – 3'	
Sens	CAGAGAGTGTGG <u>CA</u> ATTGTGGGGCCA
Antisens	TGGCCCCACAATTG <u>CC</u> CACACTCTCTG

La base soulignée est le nucléotide muté.

### 1.4.4 Infection rétrovirale et lentivirale

Les suspensions virales (700 µl) sont rapidement dégelées à 37 °C et additionnées de polybrène (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) pour obtenir une concentration finale de 4 µg/ml. Ce mélange est ajouté à un puits d'une plaque 6 puits contenant des cellules IEC-6/Cdx2 à 50 % de confluence dont le milieu a préalablement été enlevé. Les cellules sont incubées pendant 1 h, puis 1,3 mL de DMEM contenant 5 % FBS et du polybrène à une

concentration de 4 µg/mL est ajouté. Les cellules sont incubées pendant 48 h avant d'être divisées dans un autre Pétri. La sélection s'effectue en ajoutant 2 µg/mL de puromycine au milieu de culture et dure de 4 à 5 jours.

### **1.5 Extraction d'ARN total de cellules en culture et transcription inverse**

Les ARNs totaux ont été isolés à l'aide de la trousse d'extraction RNeasy de QIAGEN selon le protocole du détaillant. Un traitement à la DNase (Roche Diagnostics, Laval, Canada) a ensuite été effectué pour éliminer l'ADN génomique contaminant. Les extraits sont dosés au Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, USA) et conservés à -80 °C. La transcription inverse a été réalisée avec 2 µg d'ARN tel que décrit précédemment (LUSSIER *et al.*, 2008).

### **1.6 Extraction protéique totale de cellules en culture**

Les protéines ont été extraites dans un tampon de lyse composé de 1 % Triton X-100 (Fisher Scientific, Mississauga, Canada), 50 mM Tris-HCl pH 7.5 (Fisher Scientific, Mississauga, Canada), 100 mM NaCl (Fisher Scientific, Mississauga, Canada), 5 mM EDTA (Sigma Aldrich, Oakville, Canada), 40 mM β-Glycérophosphate (Sigma Aldrich, Oakville, Canada), 50 mM NAF (Sigma Aldrich, Oakville, Canada), 5 % glycérol (Fisher Scientific, Mississauga, Canada), 200 µM orthovanadate (Sigma Aldrich, Oakville, Canada), 1 % PIC (Sigma Aldrich, Oakville, Canada), 1 % PMSF (Sigma Aldrich, Oakville, Canada). Les cellules ont été incubées à 4 °C pendant 15 minutes dans le tampon de lyse puis centrifugées à 13 000 RPM. Le surnageant est récolté puis dosé au Nanodrop. Les échantillons sont par la suite conservés à -80 °C.

### **1.7 Immunobuvardage de type western**

Les immunobuvardages sont réalisés avec une quantité maximale de 40 µg de protéines, dans un volume final de 13 µL complété avec de l'eau au besoin. 5 µl du tampon d'échantillon NuPAGE LDS 4x (Invitrogen, Burlington, Canada) et 2 µL de l'agent

réducteur (Invitrogen, Burlington, Canada) sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite chauffés 10 minutes à 70°C puis déposés sur un gel d'acrylamide pré-coulé NuPAGE 4-12 % (Invitrogen, Burlington, Canada). La migration est d'une durée d'une heure et est réalisée à 200 volts dans un tampon MOPS 1X (50 mM MOPS, 50 mM Tris base, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA, pH 7,7). Le marqueur de poids moléculaire Full Range Rainbow (GE Healthcare, Piscataway, USA) migre en parallèle des échantillons. Les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Roche Diagnostic, Laval, Canada) à 30 volts pendant 1 h dans un tampon de transfert (25 mM Bicine, 25 mM bis Tris, 1 mM EDTA, pH 7,2) (Invitrogen, Burlington, Canada). Un blocage d'une heure est ensuite réalisé avec une solution de blocage contenant du lait écrémé en poudre dans du PBS 1X et Tween 0,1 %. L'anticorps primaire est ensuite dilué dans le tampon de blocage et le mélange est incubé pendant la nuit à 4°C. La membrane est ensuite lavée 2 fois pendant 15 minutes avec du PBS 1X contenant 0,1% Tween. L'anticorps secondaire est dilué dans le tampon de blocage (1/3000) et la membrane est incubée dans cette solution pendant une heure à température ambiante. La membrane est lavée 3 fois pendant 15 minutes dans du PBS 1X contenant 0,01 % Tween. Les antigènes sont révélés avec la trousse ECL prime (Amersham Biosciences, Québec, Canada), suivi d'une exposition avec des films autoradiographiques (Amersham Biosciences, Québec, Canada). Les anticorps utilisés ainsi que les conditions utilisées se retrouvent dans le tableau 2.

**Tableau 2. Anticorps et conditions d'utilisation pour les immunobuvardages**

<b>Anticorps primaire</b>	<b>Fournisseur</b>	<b># Catalogue</b>	<b>Dilution</b>	<b>Solution de blocage</b>	<b>Espèce</b>	<b>Incubation</b>
Claudine 1	Invitrogen	51-9000	1/500	Blotto 5 %	Lapin	O/N 4 °C
Claudine 2	Invitrogen	51-6100	1/500	Blotto 5 %	Lapin	O/N 4 °C
Claudine 3	Invitrogen	34-1700	1/500	Blotto 5 %	Lapin	O/N 4 °C
Claudine 4	Invitrogen	36-4800	1/500	Blotto 5 %	Lapin	O/N 4 °C
Clandine 8	Invitrogen	40-0700Z	1/500	Blotto 5 %	Lapin	O/N 4 °C
Claudine 15	Invitrogen	38-9200	1/500	Blotto 5 %	Lapin	O/N 4 °C
Gata4	Santa-Cruz	Sc-1237	1/1000	Blotto 5 %	Chèvre	O/N 4 °C
Fogl	Santa-Cruz	Sc-9361 x	1/10 000	Blotto 5%	Chèvre	O/N 4 °C
Actine	Millipore	MAB1501R	1/10000	Blotto 5 %	Souris	O/N 4 °C

## 1.8 Immunoprécipitation de la chromatine

Les immunoprécipitations de la chromatine ont été réalisées avec la trousse EZ-Chip (Millipore, Billerica, USA) selon le protocole du détaillant.  $2 \times 10^6$  cellules IEC-6/Cdx2 surexprimant la protéine Gata4-Flag (Capital Biosciences, Rockville, USA) ont été utilisées pour chaque réaction. À l'atteinte de la confluence, les cellules sont soumises à des liaisons transversales entre les protéines à l'ADN par l'addition de 1% PFA pour 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont par la suite rincées 2 fois avec du PBS 1X froid puis récoltées. Elles sont ensuite lysées puis soumises à une sonication pour obtenir des fragments d'ADN d'environ 200 paires de bases. Les extraits sont ensuite incubés pendant la nuit en présence d'un  $\mu\text{g}$  d'anticorps Flag M2 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) et de 20  $\mu\text{l}$  de billes magnétiques couplées à la protéine G (Invitrogen, Burlington, Canada). Les billes sont ensuite lavées 2 fois avec les tampons fournis. Les complexes ADN/Protéines-billes sont ensuite séparés en incubant à 65 °C pendant la nuit. Un traitement d'une heure à la protéinase K et à la RNase A est effectué et les échantillons sont ensuite purifiés avec la trousse High Pure PCR Cleanup Micro (Roche Diagnostics, Laval, Canada). Une réaction PCR avec des amorces spécifiques pour la région du promoteur d'intérêt est ensuite réalisée. Les séquences de celles-ci se retrouvent dans le tableau 3.

**Tableau 3. Séquences des oligonucléotides et conditions d'amplification utilisées pour l'immunoprécipitation de Gata4 sur le promoteur de *PapI***

Régions	Séquences 5' – 3' Aval Amont	Température d'hybridation	Cycles	Produit (pb)
Site 6 -467 à -256	CACCTACAATTTTAATCCACTCAA TGTTCTGGGAAACACAAGGA	59	40	212
Site 7 -245 à -38	GAAAAGGGTGTGGAGGGTTC GAGGGAGGGGCATCATAGTA	59	40	208

## 1.9 Clonage de shARN contre Fog1

Trois séquences de shARN ciblant Fog1 de rat ont été déterminées en fonction du programme BLOCK-iT™ RNAi Designer (Invitrogen, Burlington, Canada). Ces séquences ont ensuite été intégrées à la séquence suivante :

5'-GATCCNNNNNNNNNTTCAAGAGANNNNNNNNNTTTTTTGGAAC-3'.

Les séquences des shARN Fog1 sont indiquées au tableau 4. Ces amorces ont été hybridées puis ligaturées au vecteur plenti6/V5-U6 préalablement digéré avec *Bam*HI et *Xho*I. Pour vérifier si les shARN ont été intégrés au vecteur, une digestion *Bam*HI et *Xho*I a été réalisée puis vérifiée sur gel d'agarose 3 %. On observe une bande de 65 pb si le shARN est intégré ou une bande de 45 pb si la réaction de ligation n'a pas fonctionné. Les clones potentiellement positifs ont ensuite été séquencés.

**Tableau 4. Séquences des shARN contre Fog1.**

Nom	Séquence 5' - 3'	
r/m shARN Fog1 # 3	Sens	<b>GCGAGATCACCTTTAACAATA</b>
	Antisens	<b>TATTGTTAAAGGTGATCTCGC</b>
r/m shARN Fog1 # 4	Sens	<b>GGCTTCATATCCACCACAAGG</b>
	Antisens	<b>CCTTGTGGTGGATATGAAGCC</b>
r shARN Fog1 # 5	Sens	<b>GCCTTCTGGTGGACTACTACA</b>
	Antisens	<b>TGTAGTAGTCCACCAGAAGGC</b>

## 2. Modèle animal

### 2.1 Souris invalidées pour Gata4

Des souris *Gata4*<sup>loxp/loxp</sup> (WATT *et al.*, 2004) ont été croisées avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de la Villine (MADISON *et al.*, 2002). Les souris ainsi obtenues (Villine-Cre;*Gata4*<sup>loxp/loxp</sup>) expriment une forme tronquée de Gata4 qui ne contient plus les régions contenues entre les exons 3 et 5, spécifiquement dans l'épithélium intestinal. Les 2 deux doigts de zinc responsables de la liaison de Gata4 à l'ADN et aux cofacteurs ainsi que la séquence de localisation nucléaire sont absents de la forme produite.

### 2.2 Génotypage des animaux

L'ADN génomique des souris a été extrait d'un orteil prélevé 7 jours après la naissance avec la trousse « Spin Doctor Genomic DNA Prep » (GerardBIOTECH, Oxford,

USA). Le tableau 5 contient la séquence des amorces pour les géotypages ainsi que les conditions utilisées en PCR.

**Tableau 5. Séquences des oligonucléotides et conditions d'amplification utilisées pour le géotypage des souris.**

Gènes	Séquences des amorces Aval Amont	Température d'hybridation	Cycles	Produit (pb)
Villine cre	GCGGCATGGTGCAAGTTGAAT CGTTCACCGGCATCAACGTTT	50 °C	25	252
Gata 4 loxP	CCCAGTAAAGAAGTCAGCACAAAGGAAAC AGACTATTGATCCCGGAGTGAACATT	55 °C	36	355 wt 455 loxP

### 2.3 Sacrifice des souris

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale après avoir été anesthésiées par une injection intra-péritonéale de kétamine-xylazine à raison de 10 µl par 10 g de poids, en accord avec les directives du comité d'éthique sur l'expérimentation animale de l'Université de Sherbrooke.

### 2.4 Extraction de l'ARN total et des protéines de tissus intestinaux

Un fragment d'un centimètre de l'intestin est prélevé puis lavé dans du PBS 1x froid. Ensuite, ce fragment est rapidement congelé dans l'azote liquide. Pour l'ARN, un mL de solution de dénaturation est ajouté juste avant la lyse du tissu avec un polytron. Une extraction phénol-chloroforme est ensuite réalisée en suivant le protocole de la trousse ToTALLY RNA (Life Technologies, Grand Island, USA). Les ARNs totaux sont resuspendus dans 30 µL d'eau puis dosés au Nanodrop. Les ARN sont conservés à -80 °C. Pour les protéines, un mL de solution de lyse (voir section 2.5) est ajouté juste avant de lyser le tissu au polytron. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 13 000 RPM, puis le surnageant est récolté, dosé au Nanodrop et conservé à -80 °C.

## **2.5 Injection au BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine)**

Dix  $\mu\text{L}$  de BrdU (Invitrogen, Burlington, Canada) par gramme de poids de souris sont injectés de façon intrapéritonéale. Les souris sont sacrifiées 90 minutes (évaluation de la prolifération des cellules épithéliales intestinales) ou 24 h (évaluation de la migration des cellules épithéliales intestinales) suivant l'injection de BrdU.

## **2.6 Fixation des tissus pour coupes histologiques**

Deux méthodes de fixation des tissus ont été utilisées. Dans un premier temps, certains tissus ont été fixés dans du PFA 1 % frais à 4 °C pendant une période de 24 h. Par la suite, un lavage à l'éthanol 70 % est effectué puis les échantillons sont conservés dans l'éthanol 70 % pour une période maximale d'un mois. Les tissus sont ensuite inclus dans un bloc de paraffine puis tranchés en coupes histologiques de 5  $\mu\text{m}$ . La deuxième méthode de fixation utilise le composé Tissue-Tek OCT (Sakura, Torrance, USA). Un fragment d'intestin est plongé à la verticale dans une petite cupule contenant l'OCT avant d'être immergée dans l'azote liquide. Lorsque l'OCT est gelé, les échantillons sont conservés à -80 °C.

## **2.7 Immunofluorescences indirectes sur coupes histologiques**

Les immunofluorescences indirectes sur les tissus fixés au PFA ont été réalisées telles que décrites précédemment (DARSIGNY *et al.*, 2009). Le recouvrement des antigènes est fait avec l'acide citrique. Les anticorps ainsi que les conditions utilisées sont indiqués dans le tableau 6. Les immunofluorescences sur tissus fixés à l'OCT sont effectuées avec le protocole suivant. Les lames sont laissées une heure à température ambiante avant d'être fixées 10 minutes dans du méthanol à -20 °C. Elles sont ensuite lavées 3 fois dans du PBS 1X pendant 5 minutes avant d'être bloquées pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution de PBS 1X contenant 0,05 % de Triton X-100 et 2 % BSA. L'anticorps primaire est ensuite ajouté selon les conditions indiquées au tableau 6. Les lames sont ensuite lavées 3 fois pendant 10 minutes dans du PBS 1X. L'anticorps secondaire approprié est ensuite ajouté à une concentration 1/200 et incubé pendant 1 h à température ambiante.

Les lames sont ensuite lavées 3 x 10 minutes dans du PBS 1X puis montées au VECTASHIELD avec DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA).

**Tableau 6. Anticorps et conditions utilisées pour immunofluorescences.**

Anticorps	Dilution	Recouvrement des antigènes	Solution de blocage
Claudine 2	1/100	Méthanol	BSA
Claudine 8	1/100	Méthanol	BSA
BrdU	1/250	Acide citrique	Blotto

## 2.8 Évaluation de la perméabilité intestinale des souris

Une solution de FITC-Dextran (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) d'une concentration de 80 mg/mL est préparée dans du PBS 1X. Des souris sont gavées avec cette solution à raison de 60 mg par 100 g de poids. Quatre heures plus tard, les souris sont anesthésiées puis une ponction cardiaque est réalisée. Le sang est laissé 30 minutes à température ambiante puis centrifugé 15 minutes à 3000 x g et à 4°C. Le sérum est ensuite récolté. La quantité de FITC-Dextran est dosée avec un spectromètre en rapportant les données sur une courbe standard faite préalablement dans du sérum de souris. Le spectromètre est utilisé avec les paramètres suivants : excitation à 492 nm et émission à 525 nm. Il est à noter que le FITC-Dextran doit être protégé de la lumière.

## 2.9 Infection orale de *Salmonella typhimurium* chez la souris

*Salmonella typhimurium* de souche SB103 estensemencée dans 10 mL de LB contenant 10 mg/mL de kanamycine et 100 mg/mL de streptomycine. La culture est incubée pendant la nuit à 37 °C avec agitation à 250 RPM. Un mL de cette culture est transféré dans un Eppendorf puis centrifugé pendant 4 minutes à 6000 RPM. Le culot est ensuite resuspendu dans 10 ml de PBS 1X. La concentration en bactéries est déterminée en effectuant des dilutions en série qui sont étalées sur géloses de LB avec kanamycine/streptomycine. Des aliquots de 100 µL devraient contenir environ 10<sup>7</sup> CFU.

Les animaux sont ensuite gavés avec un aliquot de 100  $\mu$ L, et sacrifiés 3 jours après l'infection. Le nombre de bactéries dans le foie, la rate et le caecum a été déterminé. Un fragment de chaque tissu est prélevé puis pesé. Le tissu est ensuite homogénéisé dans 1 mL de PBS 1X et des dilutions en série du lysat sont ensemencées sur gélose LB avec kanamycine/streptomycine. Les ARNs totaux et les protéines du jéjunum et de l'iléon sont aussi prélevés.

### 3. Statistiques

Tous les graphiques et les calculs de moyennes et d'écart moyen ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.04 pour Windows (GraphPad Software, San Diego USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Les tests de Student non pairés avec intervalles de confiance de 95 % ont été effectués à l'aide de ce logiciel (\* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$ , \*\*\* =  $P < 0,001$ , \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ ).

## Résultats

### Volet 1 - La régulation de l'expression de *Pap1* par les facteurs de transcription Gata4, Cdx2 et Fog1.

#### 1. Gata4 est recruté au niveau du site 7 du promoteur de *Pap1* *in cellulo*.

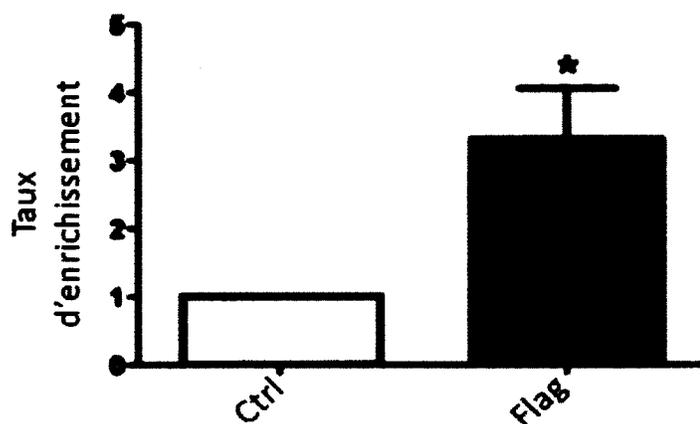
Des résultats antérieurs du laboratoire ont démontré par essais luciférase que Gata4 et Cdx2 agissent en synergie pour activer le promoteur de *Pap1* (Figure 5). De plus, il a été démontré que cet effet synergique nécessite la liaison de Gata4 au niveau du site Gata #7 du promoteur de *Pap1*. Afin de vérifier si Gata4 est recruté au niveau du promoteur de *Pap1* dans le contexte de la chromatine, la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a été utilisée chez les cellules IEC-6/Cdx2. Plusieurs tentatives d'immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps spécifique pour Gata4 se sont avérées inefficaces, suggérant que cet anticorps n'est pas efficace pour l'approche ChIP. Pour cette raison, nous avons opté pour la surexpression d'une protéine Gata4 étiquetée avec l'épitope FLAG. Un taux d'enrichissement significatif de 3,2 fois ( $P=0,0355$ ) au niveau du site Gata #7 a été obtenu par PCR quantitatif suite à l'immunoprécipitation de la chromatine des cellules IEC-6/Cdx2 avec un anticorps spécifique pour l'étiquette FLAG comparativement à des IgG de la même espèce (Figure 6).

#### 2. Gata4 et son corépresseur Fog 1 régulent l'expression de *Pap1*

Des expériences précédentes, réalisées par des membres du laboratoire, ont permis d'identifier les domaines du facteur de transcription Gata4 impliqués dans la synergie avec le facteur de transcription Cdx2, en mesurant l'activité de mutants de délétion des doigts de zinc N-terminal ou C-terminal de Gata4 par essai luciférase (Figure 5). Ces essais ont démontré que le doigt de zinc C-terminal est requis pour assurer l'effet synergique entre Gata4 et Cdx2 (Figure 6). De plus, la mutation  $\Delta\text{Zn1}$  en N-terminal de Gata4 augmente l'activité de la luciférase, ce qui suggère que Fog1 pourrait interagir avec Gata4 par le doigt de zinc N-terminal afin de limiter l'expression de *Pap1*.

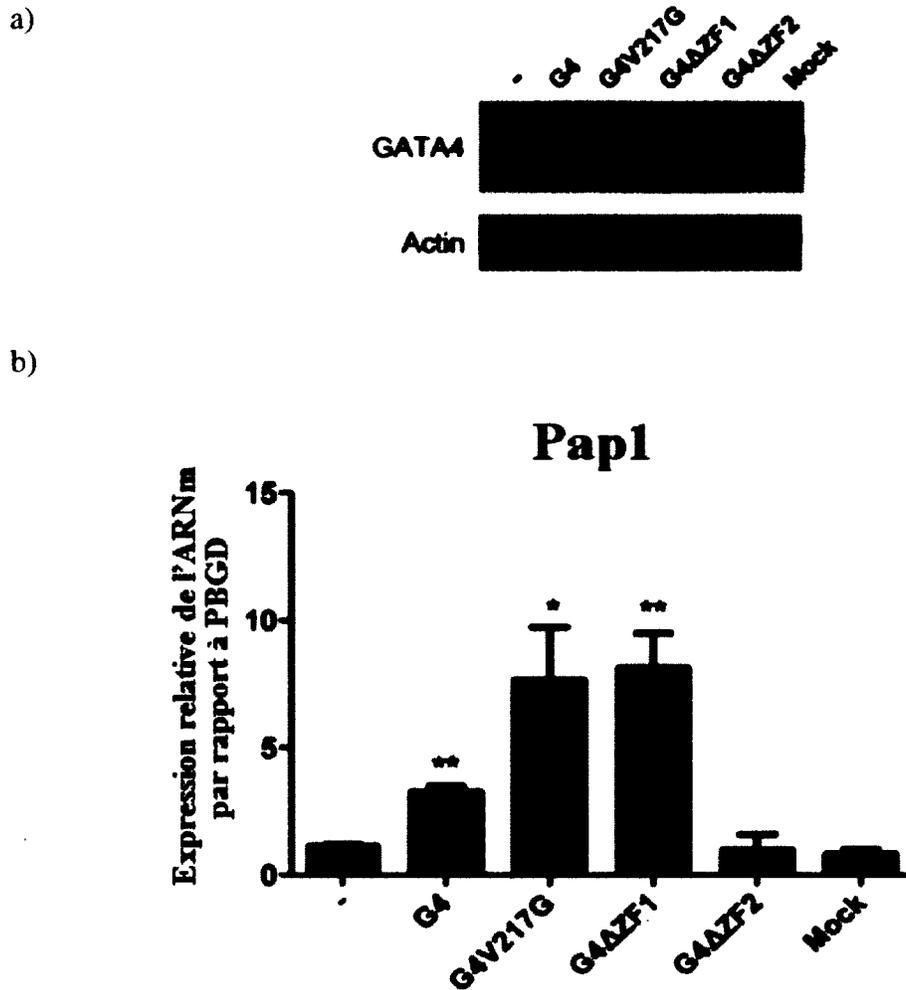
Dans le but de confirmer cette hypothèse, nous avons généré le mutant Gata4V217G qui abolit l'interaction avec les répresseurs Fog. Nous avons ensuite surexprimé Gata4 ou plusieurs mutants de Gata4 dans les cellules IEC-6/Cdx2 (Figure 7a). L'expression relative des messagers de Pap1 a été par la suite quantifiée par PCR quantitatif à l'atteinte de la confluence (Figure 7b). Nous observons que la surexpression de Gata4 de type sauvage augmente l'expression relative de Pap1 de 3,2 fois ( $P=0,0013$ ) comparativement au vecteur contrôle pBabepuro. La surexpression des mutants incapables d'interagir avec Fog1, soit Gata4V217G et Gata4 $\Delta$ Zn1, augmente l'expression relative de Pap1 de 7,7 ( $P=0,0358$ ) et 8,0 ( $P=0,0019$ ) fois, respectivement.

Finalement, les niveaux protéiques de Fog1 ont été diminués par interférence à l'ARN. Des cellules IEC-6/Cdx2 ont été infectées avec une construction exprimant un shARN contre Fog1 et sélectionnées. Le shARN contre Fog1 diminue les niveaux protéiques de Fog1 de 65 % (Figure 8a). L'expression de Pap1 a ensuite été quantifiée par PCR quantitatif dans les cellules IEC-6/Cdx2 shFog1 à confluence et 3 jours après traitement à l'IPTG. On constate dans les cellules IEC-6/Cdx2 à confluence que la diminution de Fog1 augmente l'expression de Pap1 de 8,3 fois ( $p=0,0018$ ) comparativement aux cellules IEC-6/Cdx2 surexprimant un shARN contrôle. Cette induction du messager de Pap1 est de 2,6 fois ( $p=0,0041$ ) dans les cellules IEC-6/Cdx2 dans lesquelles l'expression de Cdx2 a été induite par l'ajout d'IPTG au milieu de culture pendant 3 jours.



**Figure 6. Gata4 est recruté au niveau du site Gata4 #7 du promoteur de *Pap1*.**

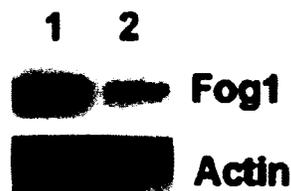
Une immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps permettant de reconnaître l'étiquette Flag liée à la protéine Gata4 et surexprimée dans les cellules IEC-6/Cdx2 a été effectuée. Une région d'ADN contenant le site Gata #7 a été amplifiée par PCR quantitatif avec une paire d'amorces spécifiques. Un taux d'enrichissement de 3,2 fois a été observé avec l'anticorps spécifique pour Flag (Flag) comparativement à des IgG de la même espèce (Ctrl). Le graphique représente les moyennes  $\pm$  les SEM. Un test de Student a été effectué pour mesurer la significativité des résultats (\* =  $P < 0,05$ ). N=3



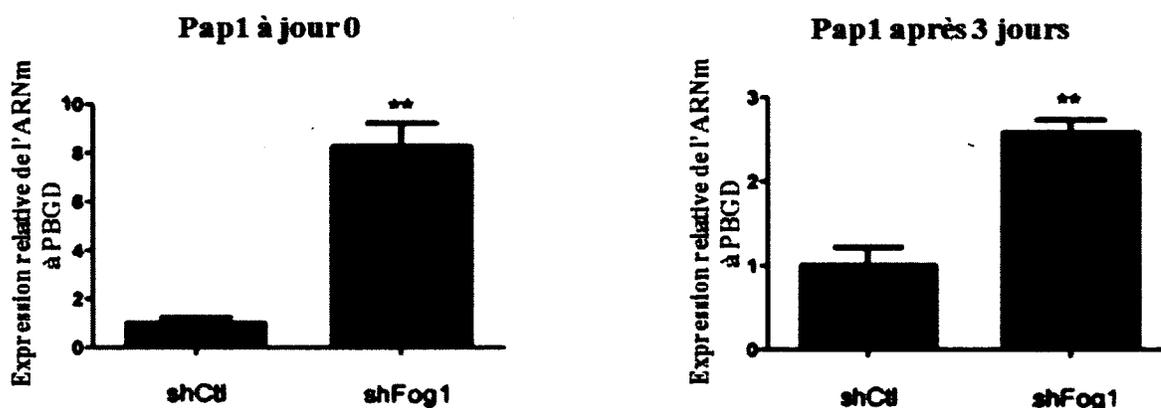
**Figure 7. La surexpression de Gata4 dans le modèle IEC-6/Cdx2 induit l'expression de Pap1**

Gata4 ou Gata4 muté ont été surexprimés dans les cellules IEC-6/Cdx2 afin de confirmer le rôle de Gata4 et du corépresseur Fog1 dans le contrôle de l'expression de Pap1. a) Immunobuvardage de type western réalisé avec un anticorps spécifique pour Gata4 avec des échantillons de protéines de cellules IEC-6/Cdx2 surexprimant de façon stable Gata4 ou diverses versions de Gata4 muté. b) Expression relative des ARNm de Pap1 par PCR quantitatif dans des échantillons de cellules IEC-6/Cdx2 surexprimant de façon stable Gata4 ou diverses versions de Gata4 muté. Un ratio de 1 a été attribué pour les valeurs obtenues dans les cellules ayant intégré le vecteur vide pBabepuro (-). Les niveaux d'expression de Pap1 ont été normalisés à ceux du gène contrôle PBGD. Le graphique représente les moyennes  $\pm$  les SEM. Un test de Student a été réalisé pour mesurer la significativité des résultats (\* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$ ). N=3

a)



b)



**Figure 8. La diminution des niveaux protéiques de Fog1 dans le modèle IEC-6/Cdx2 augmente l'expression de Pap1.**

Les niveaux protéiques de Fog1 ont été diminués dans les cellules IEC-6/Cdx2 par interférence à l'ARN. a) Immunobuvardage de type western avec un anticorps spécifique contre Fog1 effectué avec des extraits de protéines de cellules IEC-6/Cdx2 ayant intégré un shARN contre Fog1 (piste 2) comparativement à des cellules IEC-6/Cdx2 ayant intégré un shARN non ciblant contrôle (piste 1). L'actine est utilisée comme contrôle. b) Expression relative des ARNm de Pap1 par PCR quantitatif dans des échantillons de cellules IEC-6/Cdx2 ayant intégré de façon stable un shARN contre Fog1 à confluence (jour 0) ou 3 jours suivant l'ajout d'IPTG au milieu de culture. Un ratio de 1 a été attribué pour les valeurs obtenues dans les cellules ayant intégré le shARN non ciblant (shCtl). Les niveaux d'expression de Pap1 ont été normalisés à ceux du gène contrôle PBGD. Le graphique représente les moyennes  $\pm$  les SEM. Un test de Student a été réalisé pour mesurer la significativité des résultats (\*\* =  $P < 0,01$ ). N=3

## **Volet 2 - La régulation de la barrière épithéliale intestinale par Gata4 dans un modèle murin**

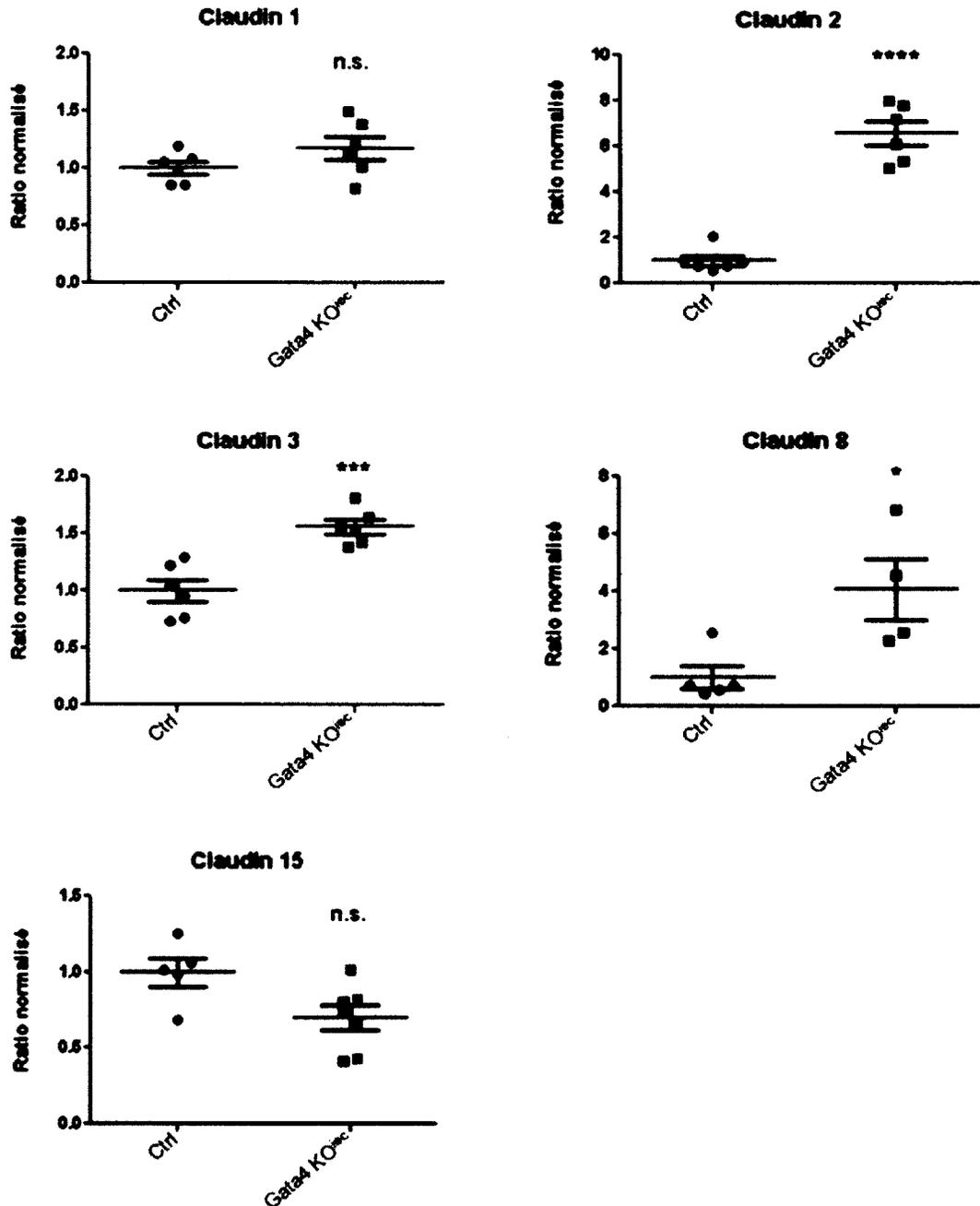
### **3. Gata4 régule l'expression de gènes encodant pour des protéines du complexe apical de jonction.**

Afin de vérifier l'effet de la perte de Gata4 sur l'expression de gènes encodant pour des protéines de jonctions, les niveaux d'ARNm de différentes molécules ont été quantifiés par PCR quantitatif d'ADNc produits à partir d'extraits d'ARN totaux du jéjunum proximal de souris âgées d'un an.

Dans un premier temps, l'expression des gènes impliqués directement dans le contrôle de la perméabilité, soit les Claudines, a été mesurée. On constate que le profil d'expression des Claudines au niveau du jéjunum d'animaux invalidés pour *Gata4* diffère en fonction des membres de cette famille (Figure 9). En effet, alors que l'expression relative du messenger de *Clau-1* et de *Clau-15* n'est pas modulée significativement en absence de Gata4, l'expression de *Clau-3* est augmentée significativement de 1,57 fois ( $P=0,0006$ ) et celle de *Clau-2* ainsi que *Clau-8* est augmentée respectivement de 6,59 fois ( $P<0,0001$ ) et 4,07 fois ( $P=0,0406$ ) chez les mutants comparativement aux animaux contrôles (Figure 9).

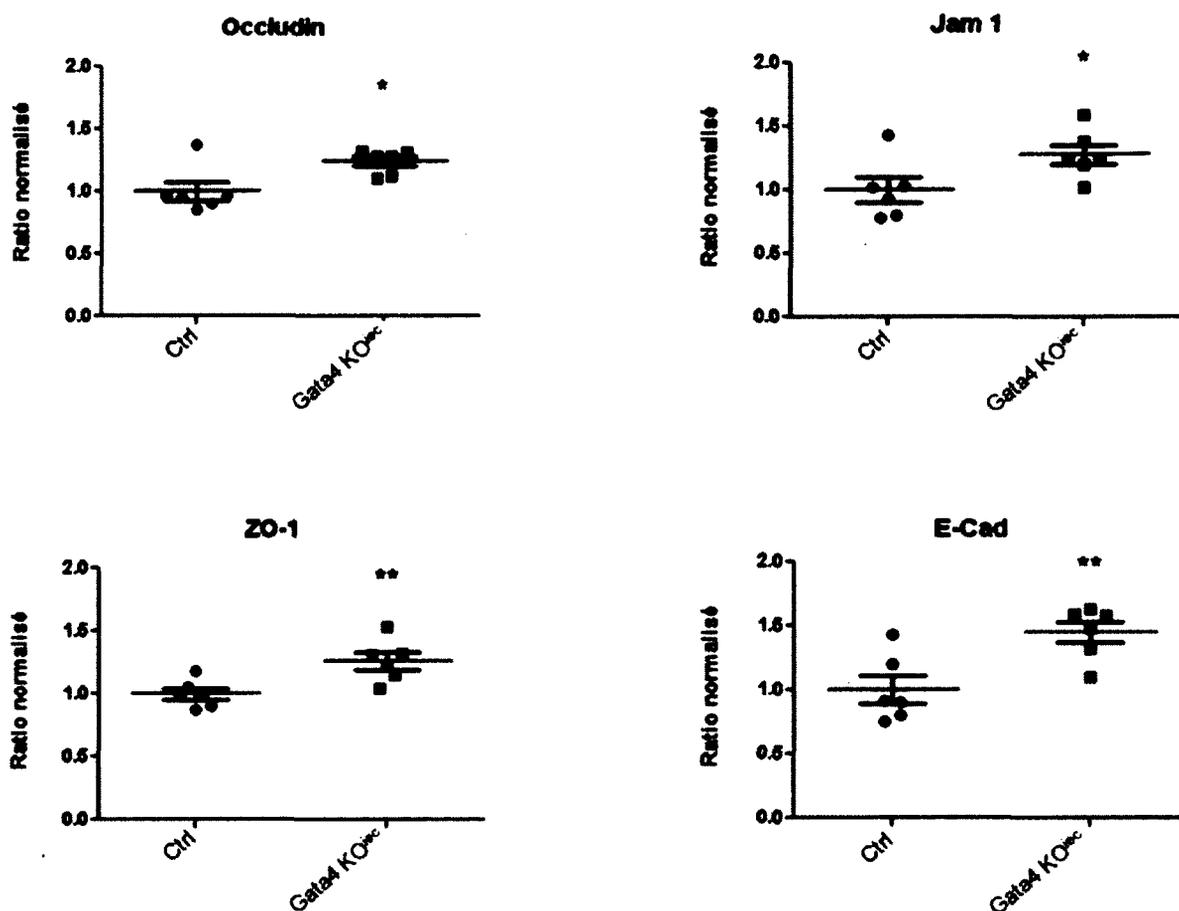
Dans un deuxième temps, l'expression relative de gènes impliqués dans l'assemblage et le maintien des jonctions serrées a été déterminée. La perte de Gata4 entraîne une légère augmentation de l'expression de *Ocln* (1,24;  $P=0,0203$ ), de *Jam1* (1,28;  $P=0,0499$ ) et de *ZO-1* (1,26;  $P= 0,0099$ ) (Figure 10).

Dans un troisième temps, l'expression des messagers d'E-Cad, dont la protéine est retrouvée au niveau des jonctions adhérentes, a été mesurée. On constate une augmentation de 1,45 fois ( $P= 0,0074$ ) de l'ARNm d'E-Cad au niveau du jéjunum de souris invalidées pour *Gata4* (Figure 10).



**Figure 9. L'inactivation de Gata4 modifie l'expression de certains gènes encodant des Claudines.**

L'expression relative des messagers Clau-1, -2, -3, -8 et -15 au niveau du jéjunum proximal d'animaux de 1 an a été mesurée par PCR quantitatif. Les graphiques représentent les moyennes  $\pm$  les SEM. Le ratio des animaux contrôles a été normalisé à la valeur arbitraire de 1. Les niveaux d'expression ont été normalisés à ceux du gène contrôle PBGD. Un test de Student a été réalisé pour mesurer la significativité des résultats (n.s. = non significatif, \* =  $P < 0,05$ , \*\*\* =  $P < 0,001$ , \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ ).



**Figure 10. : L'inactivation de Gata4 modifie l'expression de gènes encodant des molécules de jonction**

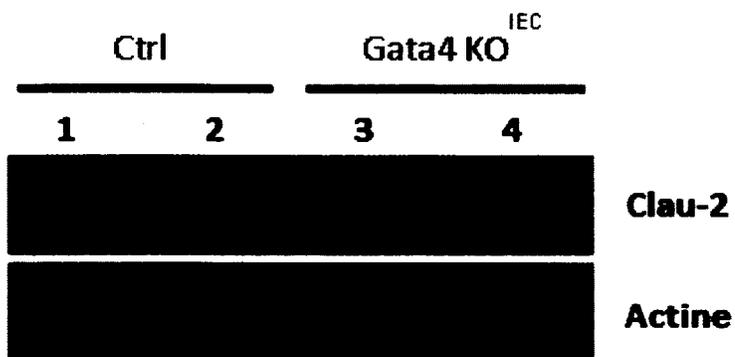
L'expression relative des gènes encodant des molécules de jonction, soit Ocln (occludin), Jam1, ZO-1 et E-Cad au niveau du jéjunum proximal d'animaux de 1 an a été mesurée par PCR quantitatif. Les graphiques représentent les moyennes  $\pm$  les SEM. Le ratio des animaux contrôles a été normalisé à la valeur arbitraire de 1. Les niveaux d'expression ont été normalisés à ceux du gène contrôle PBGD. Un test de Student a été réalisé pour mesurer la significativité des résultats (\* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$ ).

#### **4. L'augmentation de l'ARNm des Claudines 2 et 8 se traduit par une augmentation des niveaux protéiques et de leur localisation au niveau apical de l'épithélium.**

Afin de déterminer la quantité de protéines Clau-2, un immunobuvardage a été effectué à partir d'extraits de protéines totales provenant du jéjunum d'animaux âgés d'un an. On constate que Clau-2 est faiblement exprimée chez les animaux contrôles alors qu'elle est fortement induite dans le jéjunum des animaux invalidés pour *Gata4* (Figure 11). Afin de vérifier la localisation de Clau-2 et Clau-8, des immunofluorescences indirectes ont été réalisées (Figure 12 et 13). Chez les souris contrôles, on constate un faible marquage pour Clau-2 au niveau de la partie apicale des cellules épithéliales de la crypte. Chez les souris invalidées pour *Gata4*, un fort marquage est présent au niveau apical des cellules épithéliales le long de l'axe crypte-villosité, ce qui suggère une localisation au niveau des jonctions serrées (Figure 12). Clau-8 n'est pas détectée par immunofluorescence chez les animaux contrôles. Par contre, chez les animaux invalidés pour *Gata4*, Clau-8 présente un marquage plus diffus que celui de Clau-2, mais on constate qu'une partie se localise aussi au niveau apical des cellules épithéliales intestinales (Figure 13).

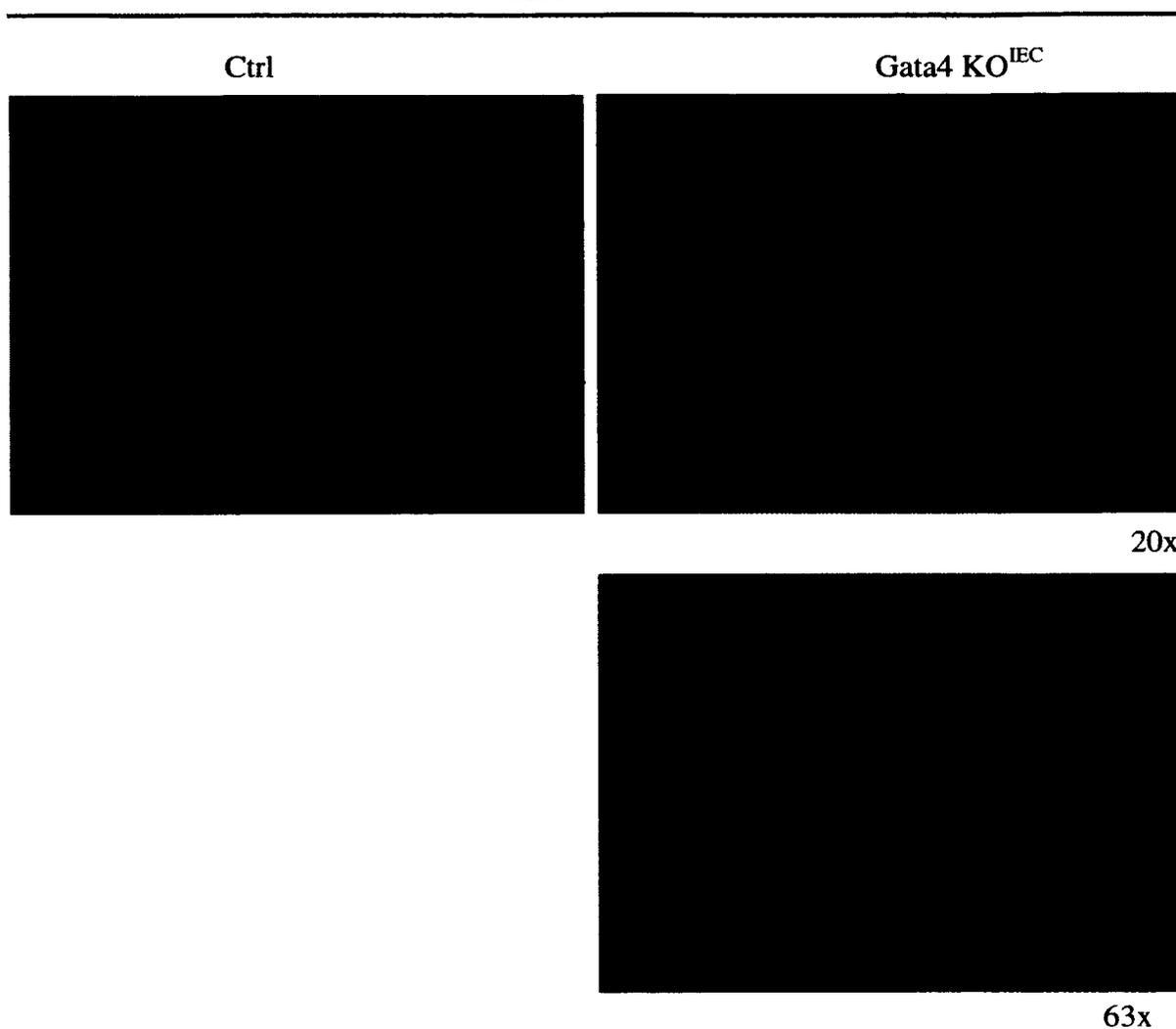
#### **5. L'aspect des jonctions du complexe apical est modifié en absence de *Gata4*.**

L'apparence des jonctions serrées et adhérentes a été visualisée par microscopie électronique (Figure 14). On constate que les jonctions serrées (flèche noire) chez les animaux contrôle sont très foncées, ce qui indique que les jonctions serrées sont bien délimitées et que les membranes plasmiques des deux cellules épithéliales adjacentes sont près l'une de l'autre. Par contre, chez les animaux invalidés pour *Gata4*, les jonctions serrées sont moins foncées et moins bien délimitées. Dans le cas des jonctions adhérentes (flèche blanche), celles retrouvées chez les animaux contrôle ont l'aspect d'un bouton presseur alors que ce motif est absent des animaux invalidé pour *Gata4*.



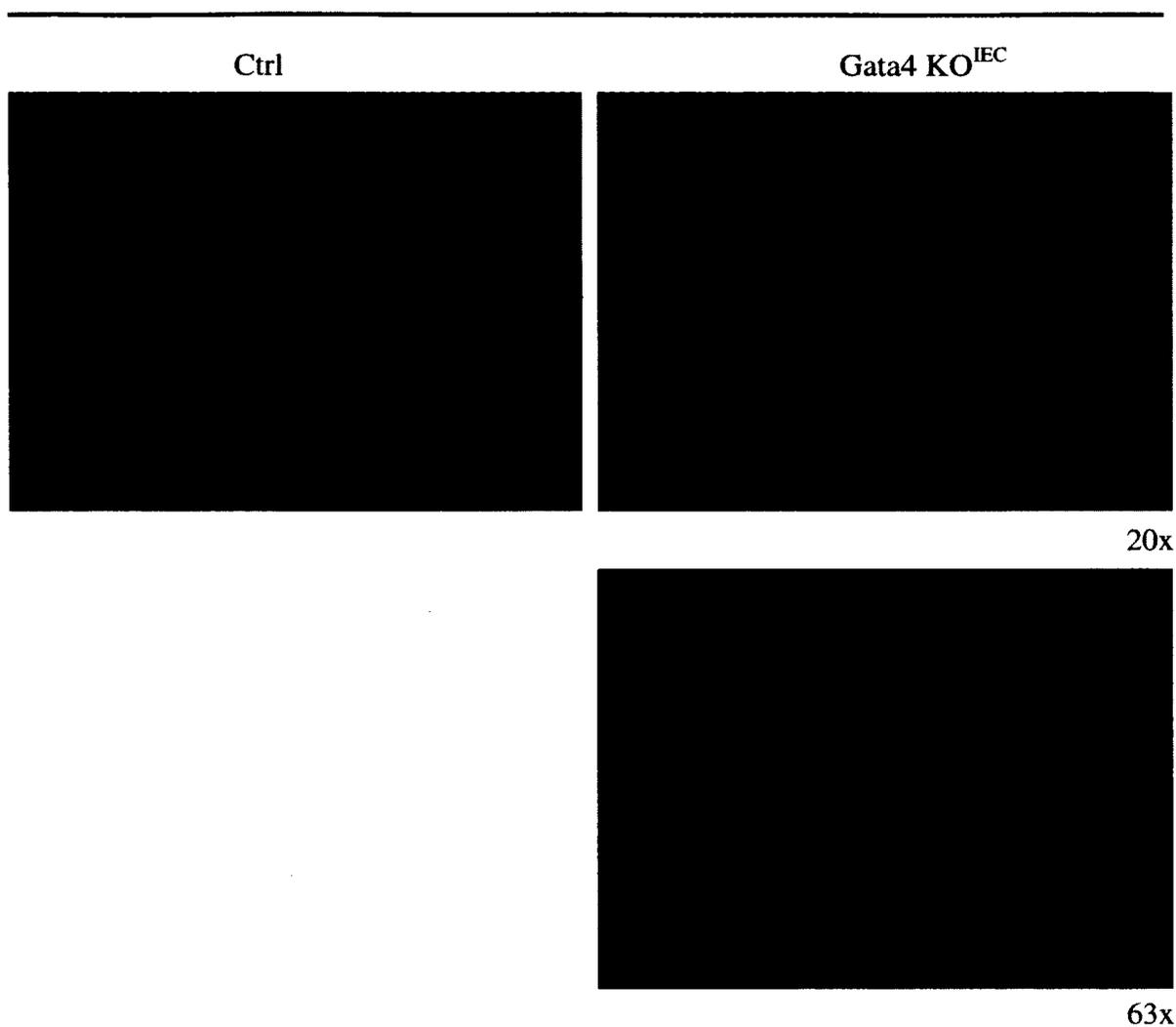
**Figure 11. L'invalidation de Gata4 augmente les niveaux protéiques de la Claudine 2 au niveau du jéjunum proximal de souris.**

Un immunobuvardage a été effectué sur des lysats de protéines totales de jéjunum proximal de souris âgées d'un an. Un anticorps spécifique pour Clau-2 a été utilisé. L'actine a été visualisée afin d'assurer la quantité relative de protéines. Chacune des pistes représentent un animal indépendant contrôle (pistes un et deux) ou mutant (pistes trois et quatre).

**Claudine 2**

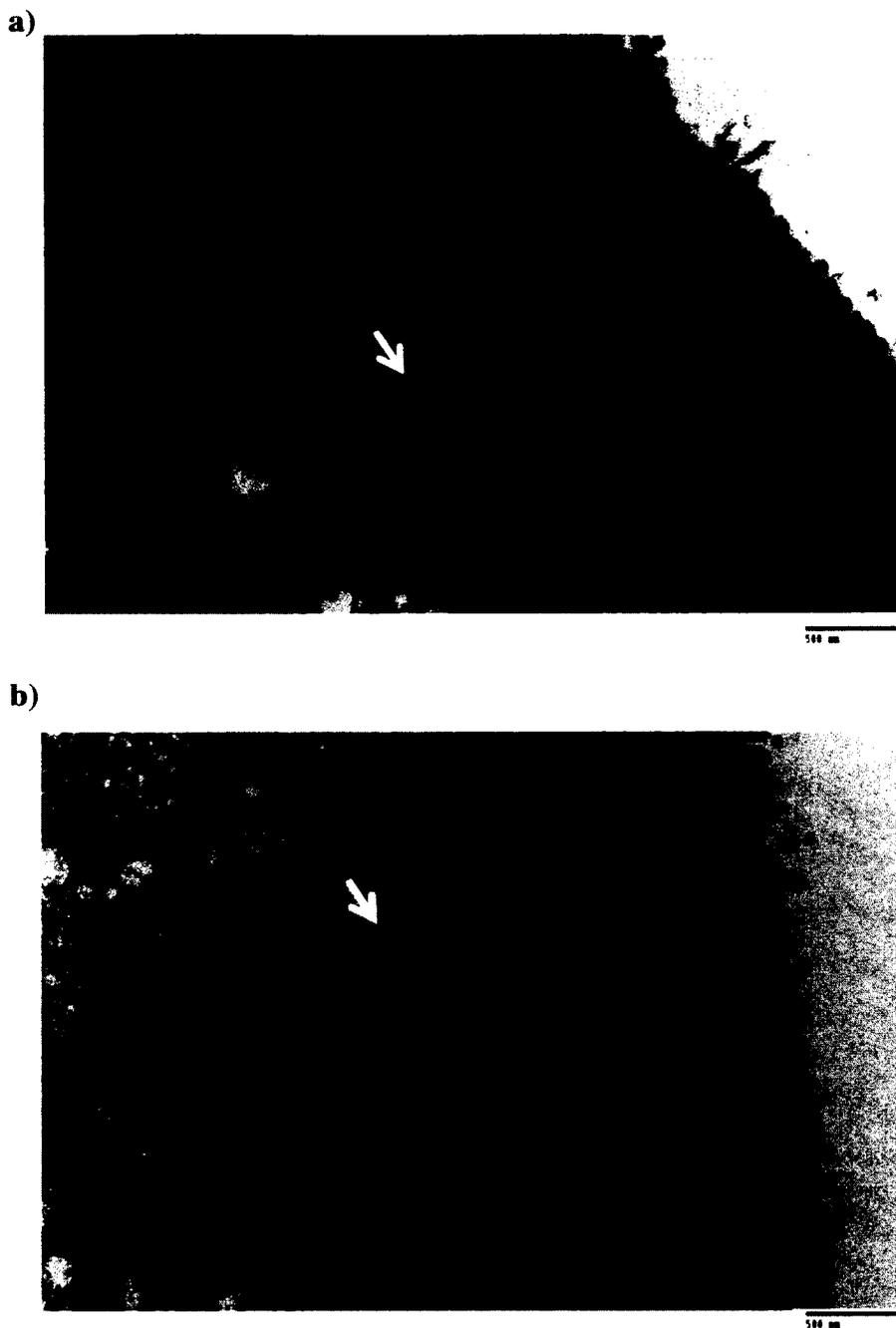
**Figure 12. La Claudine 2 est exprimée au niveau apical du jéjunum de souris invalidées pour Gata4**

Une immunofluorescence indirecte avec un anticorps spécifique pour Clau-2 a été réalisée sur des coupes de tissu de jéjunum proximal de souris. Le marquage vert (FITC) correspond au marquage obtenu avec les anticorps Clau-2. Le marquage rouge est obtenu par coloration des tissus au bleu d'Evans. Le carré jaune représente la zone présentée agrandie à 63x. N=2.

**Claudine 8**

**Figure 13. La Claudine 8 est exprimée au niveau apical du jéjunum de souris invalidées pour Gata4**

Une immunofluorescence indirecte avec un anticorps spécifique pour Clau-8 a été réalisée sur des coupes de tissu de jéjunum proximal de souris. Le marquage vert (FITC) correspond au marquage obtenu avec les anticorps Clau8. Le marquage rouge est obtenu par coloration des tissus au bleu d'Evans. Le carré jaune représente la zone agrandie à 63x. N=2.



**Figure 14. L'aspect du complexe apical de jonction est affecté dans les souris invalidées pour *Gata4*.**

Morphologie des jonctions serrées et adhérentes chez les animaux contrôles (a) et invalidés pour *Gata4* (b). Ces images ont été obtenues par microscopie électronique à un grossissement de 10 000x. Les barres représentent une distance de 500 nm. Les flèches pleines indiquent les jonctions serrées alors que les flèches vides indiquent les jonctions adhérentes. N=3.

## **6. La perte de Gata4 diminue la migration des cellules épithéliales intestinales.**

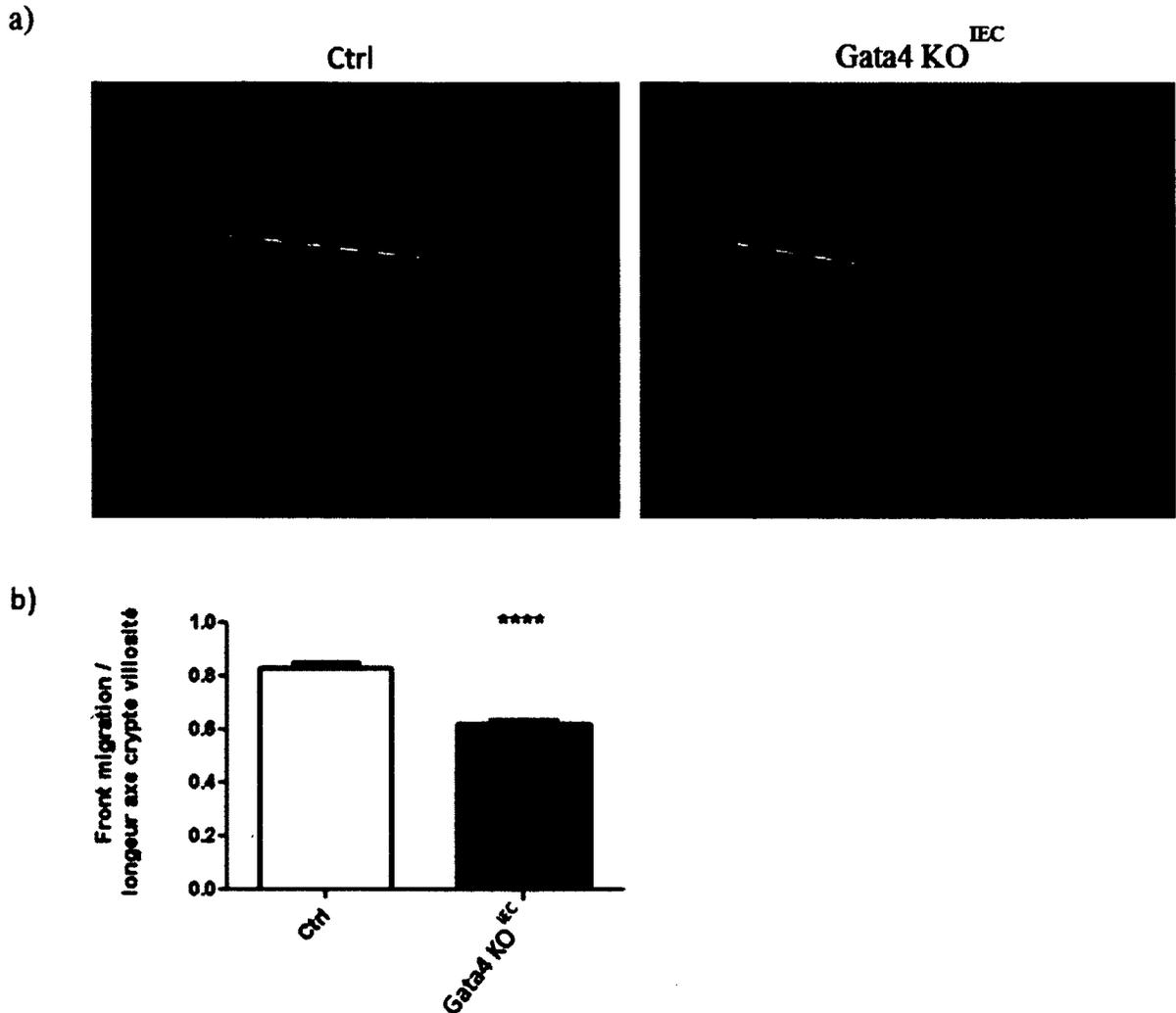
Puisqu'un changement au niveau des propriétés des jonctions cellulaires peut être associé à un changement de la migration cellulaire, nous avons évalué la vitesse de migration cellulaire chez les souris invalidée pour *Gata4* à l'aide d'un marquage au BrdU pendant 48 h. Nous observons que les cellules épithéliales des souris contrôles migrent en moyenne sur 83 % de la distance entre le fond de la crypte et l'apex de la villosité alors que ce pourcentage est de 62 % chez les animaux invalidés pour *Gata4*. Les cellules épithéliales chez les animaux invalidés pour *Gata4* ont donc migré sur une distance inférieure de 25 % ( $p < 0,0001$ ) pendant 48 h (Figure 15), ce qui suggère une réduction de la migration.

## **7. La perte de Gata4 augmente perméabilité transépithéliale au FITC-Dextran.**

En raison du changement dans la composition des molécules retrouvées au niveau du complexe apical de jonctions, la capacité de ce complexe à sceller l'espace intercellulaire a été mesurée à l'aide du FITC-Dextran. Le Dextran est un polymère de glucose non absorbable par l'épithélium intestinal. Une détection significative du FITC-Dextran au niveau du sérum implique donc un défaut dans les fonctions de barrière des cellules épithéliales intestinales. Chez les animaux contrôles, on retrouve au niveau du sérum une quantité calibrée de 55,1 ng/ml de FITC-Dextran comparativement à 1000,0 ng/ml dans le sérum des animaux invalidés pour *Gata4* 4 h après le gavage des souris. Ceci se traduit par une augmentation significative de 18,2 fois chez les souris mutantes ( $P= 0,0008$ ) (Figure 16), ce qui suggère une augmentation de la perméabilité transépithéliale.

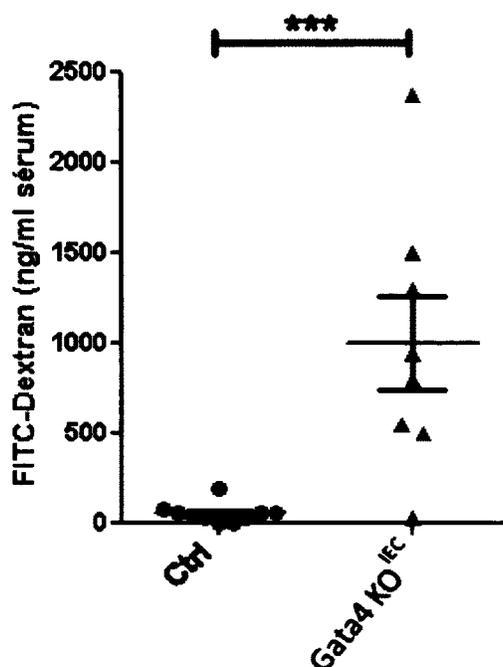
## **8. L'augmentation de la perméabilité transépithéliale au FITC-Dextran se traduit par une augmentation du passage de *Salmonella typhimurium*.**

Puisque le complexe apical de jonctions est moins en mesure de sceller l'espace intercellulaire au FITC-Dextran en l'absence de *Gata4*, nous avons vérifié si ce changement de pouvait résulter en une plus grande accessibilité des bactéries à travers l'épithélium. Pour ce faire, des infections orales par *Salmonella typhimurium* de souche SB103 ont été



**Figure 15. La migration des cellules épithéliales intestinales est diminuée en l'absence de Gata4.**

(a) 48 h suivant une injection au BrdU, les souris ont été sacrifiées et des immunofluorescences indirectes avec un anticorps spécifique pour le BrdU ont été effectuées. Le front de migration délimité par la détection de la plus haute cellule positive pour le BrdU (ligne jaune) sur l'axe crypte-villosité a été mesuré et rapporté sur la longueur totale de l'axe (ligne rouge). (b) Les données ont été obtenues en mesurant 103 fronts de migration pour les animaux contrôles et 119 fronts de migration pour les animaux invalidés pour *Gata4* (N=3 animaux pour chaque groupe). Le ratio 1 représente la distance totale référence pour une cellule qui aurait atteint l'apex de la villosité. Le graphique représente les moyennes  $\pm$  les SEM. Un test de Student a été réalisé pour mesurer la significativité des résultats (\*\*\*\* =  $P < 0,0001$ ).



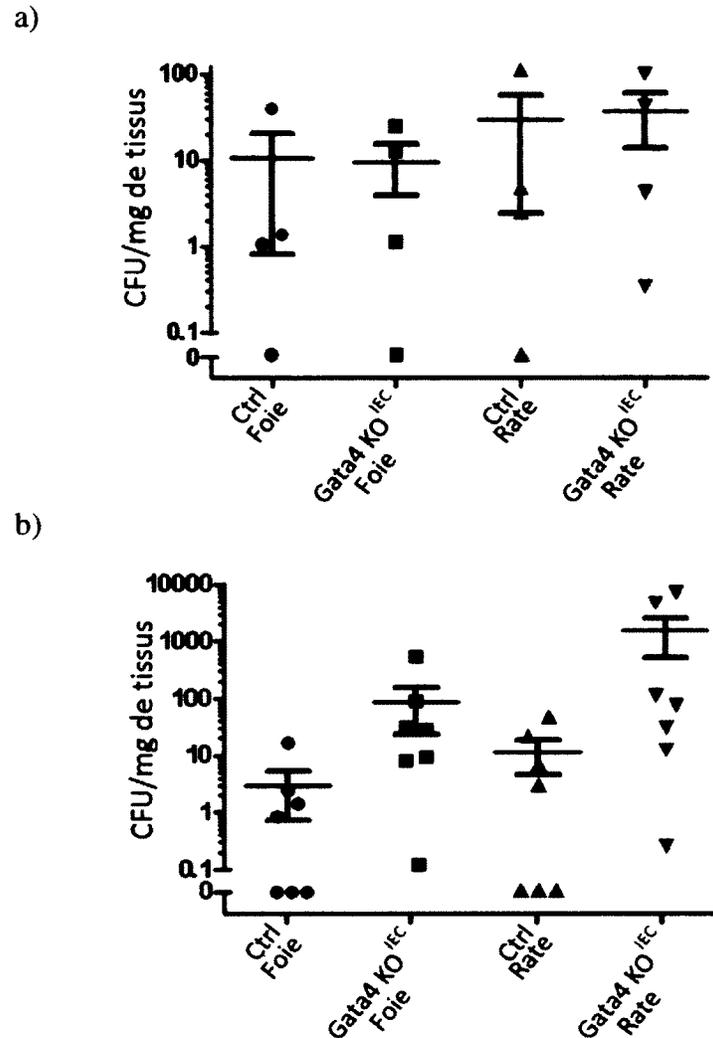
**Figure 16. La perméabilité transépithéliale est augmentée chez les souris invalidées pour *Gata4*.**

La quantité de FITC-Dextran circulante a été mesurée par la détection de la fluorescence au niveau du sérum 4 h après un gavage chez la souris. Le graphique représente les moyennes  $\pm$  les SEM. Les points en rouge représentent les valeurs obtenues chez les souris mâles alors que les points en noir représentent les valeurs obtenues chez les femelles. N=10 pour les animaux contrôles (2 mâles et 8 femelles) et N=8 pour les animaux *Gata4* KO<sup>IEC</sup> (5 mâles et 3 femelles). Un test de Student a été réalisé pour mesurer la significativité des résultats (\*\*\*) =  $P < 0,001$ ).

réalisées, avant de préparer des extraits du foie et de la rate pour ensemencement sur gélose, 72 h après l'infection. Le nombre de bactéries ayant atteint le foie et la rate a été mesuré en comptant le nombre de colonies sur gélose. *S. typhimurium* entraîne une infection systémique par sa capacité à traverser la barrière épithéliale intestinale par un processus d'internalisation au niveau des cellules épithéliales intestinales et des cellules M, suivi d'une captation au niveau des macrophages dans lesquels les bactéries prolifèrent et sont transportées vers les tissus comme la rate et le foie (KAUR et JAIN, 2012; WATSON et HOLDEN, 2010). La souche SB103 est peu internalisée au niveau des cellules épithéliales comparativement à la forme de type sauvage en raison de mutations rendant son système de sécrétion de type III non fonctionnel (GALAN et CURTISS, 1991). Sa présence au niveau du foie et de la rate ne peut être facilitée que par son passage entre les cellules épithéliales intestinales.

On constate un passage accru de *S. typhimurium* chez les animaux femelles invalidés pour *Gata4* (Figure 17), avec une moyenne de 90,4 colonies par milligramme de tissus (CFU/mg tissus) au niveau du foie chez les animaux invalidés pour *Gata4* comparativement à 2,3 CFU/mg tissus chez les animaux contrôles, ce qui correspond à une augmentation de 39,3 fois ( $P=0,2329$ ). Cette tendance est aussi observée au niveau de la rate avec 1748 CFU/mg tissus chez les animaux invalidés pour *Gata4* comparativement à 10,8 CFU/mg de tissus chez les animaux contrôles, soit une augmentation de 161,5 fois ( $P=0,1757$ ).

La tendance à la hausse observée chez les animaux femelles n'est pas retrouvée chez les animaux mâles (Figure 17). La quantité de *S. Typhimurium* retrouvée au niveau du foie des animaux invalidés pour *Gata4* est semblable à celle retrouvée chez les animaux contrôles soit de 9,5 CFU/mg tissus et 10,7 CFU/mg tissus respectivement. Il en va de même au niveau de la rate avec 43,2 CFU/mg de tissus chez les animaux invalidés pour *Gata4* et 30,3 CFU/mg de tissus chez les animaux contrôles.



**Figure 17. L'invalidation de Gata4 facilite le passage de *S. typhimurium***

72 h suivant un gavage de *S. typhimurium* chez les souris contrôles et invalidées pour *Gata4*, le foie et la rate ont été prélevés, lysés puis ensemencés sur gélose permettant la culture sélective de *S. typhimurium*. Les décomptes des colonies pour les animaux mâles (N=4) (a) et les animaux femelles (N=7) (b) ont ensuite été effectués puis rapportés par milligramme de tissu prélevé.

## **9. L'augmentation de la perméabilité intercellulaire n'est pas suffisante pour activer le système immunitaire des souris invalidées pour *Gata4*.**

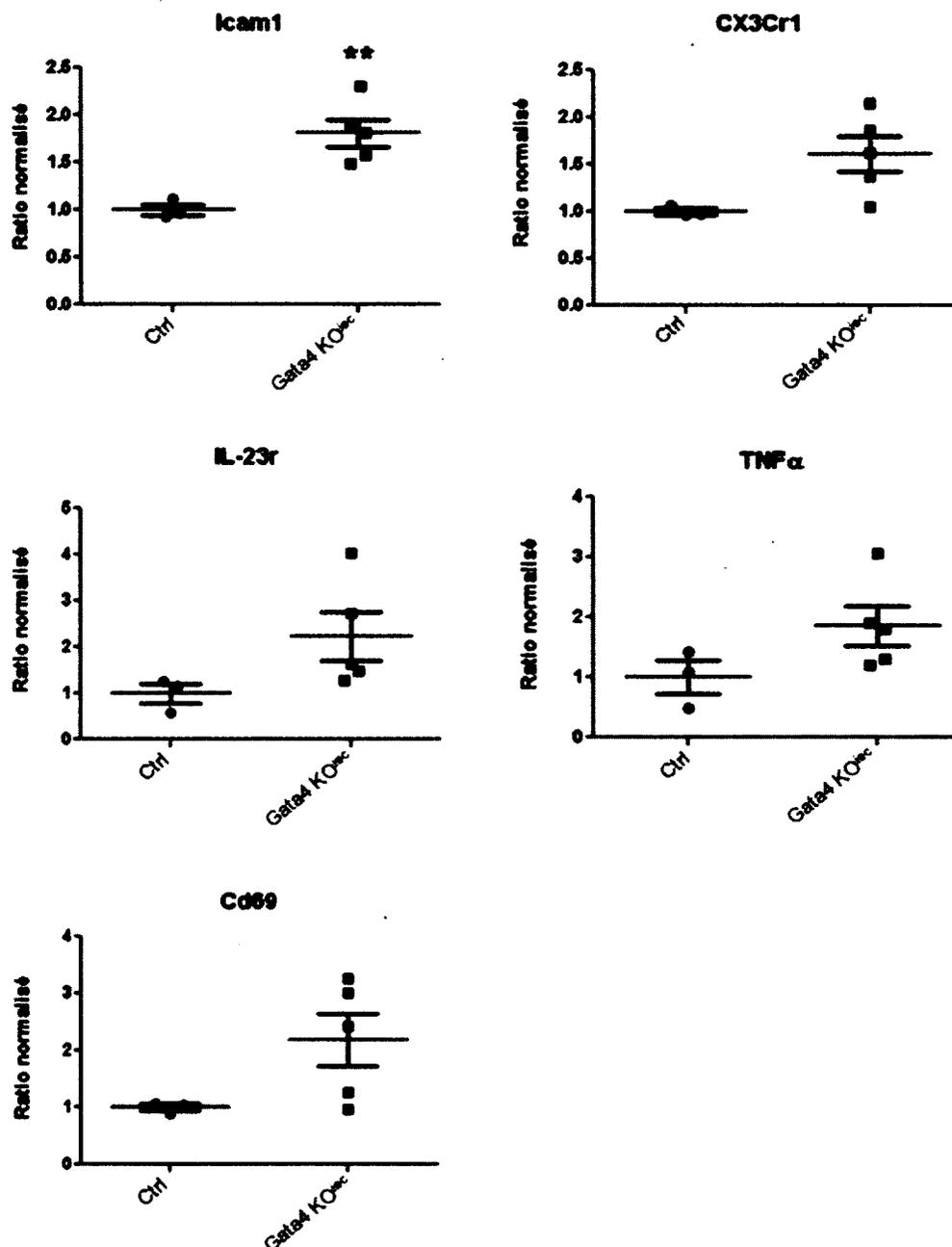
En raison de l'augmentation de la perméabilité intercellulaire observée chez les animaux invalidés pour *Gata4*, nous avons vérifié l'état d'activation du système immunitaire. Des extraits d'ARN totaux du jéjunum proximal d'animaux âgés d'un an ont été isolés. Par la suite, une quantification de l'expression de 27 gènes a été réalisée par la Plateforme d'analyse du transcriptome (RNomique) de l'Université de Sherbrooke. La liste des gènes se retrouve au tableau #7.

Parmi les 27 gènes dont l'expression a été mesurée, seul *Icam1* est modulé significativement dans les animaux femelles invalidés pour *Gata4* (Figure 18), avec une expression augmentée de 1,43 ( $P=0,0060$ ) par rapport aux animaux contrôles.

Cependant, on observe pour certains gènes des tendances d'expression non-significatives. Entre autres, chez les femelles invalidées pour *Gata4*, l'expression relative de *CX3Cr1* (1,63;  $P=0,0535$ ), *TNF- $\alpha$*  (1,85;  $P=0,1287$ ), *Cd69* (2,18;  $P=0,1021$ ) et *IL-23r* (2,23;  $P=0,1304$ ) semble être augmentée par rapport aux animaux contrôles femelles. En raison du petit nombre d'individus mâles dans l'analyse, aucune tendance n'est observée.

**Tableau 7. Liste des gènes analysés par la plateforme d'analyse du transcriptome.**

<b>Gènes</b>	<b>Fonctions et spécificités</b>
Icam1	Récepteur intracellulaire - Cellules endothéliales
Cd5	Récepteur transmembranaire - Lymphocytes B sécrétant des IgM (B-1) et lymphocytes T
Cd25	Chaîne alpha du récepteur à IL-2 - Lymphocytes B et T activés
Cd69	Récepteur transmembranaire - Lymphocytes CD4+ en différenciation
CCL20	Chimiokine - Cellules épithéliales
CCR4	Récepteur transmembranaire - Lymphocytes T CD4+
CCR6	Récepteur transmembranaire à CCL20 - Lymphocytes T
CXCL1	Cytokine pro-inflammatoire - Cellules épithéliales, macrophages et neutrophiles
CXCR4	Récepteur transmembranaire pour CXCL20 - Lymphocyte T CD4+
CX3Cr1	Récepteur transmembranaire - Cellules épithéliales, macrophages et cellules dendritiques
FoxP3	Facteur de transcription - Lymphocytes T régulateurs (T-Reg)
Gata3	Facteur de transcription - Lymphocytes Th2
IL-1 $\beta$	Cytokine pro-inflammatoire - Cellules épithéliales et macrophages
IL-1b-r	Récepteur de IL-1b - Lymphocytes T
IL-2	Cytokine pro-inflammatoire - Lymphocytes T CD4+ et CD8+
IL-10	Cytokine anti-inflammatoire - Cellules épithéliales, lymphocytes Th2 et T-Reg
IL-12 p35	Sous unité alpha du récepteur à IL-12 - Lymphocytes Th1
IL-12 p40	Sous unité bêta du récepteur à IL-12 - Lymphocytes Th1
IL-13	Cytokine pro-inflammatoire - Lymphocytes Th2
IL-17	Cytokine pro-inflammatoire - Lymphocytes T auxiliaires de type 17 (Th17)
IL-21	Cytokine pro-inflammatoire - Lymphocytes Th2 et Th17, cellules NK (Natural killer)
IL-23 $\alpha$	Cytokine pro-inflammatoire - Macrophages
IL-23r	Récepteur transmembranaire à l'interleukine 23 - Lymphocytes Th17
IL-24	Cytokine pro-inflammatoire - Lymphocytes Th2 et Monocytes
INF- $\gamma$	Cytokine pro-inflammatoire - Lymphocytes T CD4+ et CD8+, cellules NK
TGF- $\beta$	Cytokine anti-inflammatoire - Cellules épithéliales et macrophages
TNF- $\alpha$	Cytokine pro-inflammatoire - Macrophages, lymphocytes T CD4+, cellules épithéliales



**Figure 18. L'invalidation de Gata4 augmente l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse inflammatoire.**

Expression relative de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire au niveau du jéjunum proximal pour lesquelles une tendance est observée entre les animaux contrôles et les animaux invalidés pour *Gata4*. Valeurs obtenues pour les animaux de sexe féminin âgés d'un an. Les graphiques représentent les moyennes  $\pm$  les SEM. Le ratio des animaux contrôles a été normalisé à la valeur arbitraire de 1. Un test de Student a été réalisé pour mesurer la significativité des résultats (\*\* =  $P < 0,01$ ).

## Discussion

### 1. L'expression des ARNm de *Pap1* est régulée par les facteurs de transcription *Gata4*, *Cdx2* et *Fog1*.

Des résultats précédents de notre laboratoire ont démontré que le gène encodant le peptide antimicrobien *Pap1* est une cible transcriptionnelle de *Gata4* (BROUILLARD, 2008; BRUNEAU, 2011). Les résultats obtenus ont démontré l'implication des facteurs de transcription *Gata4*, *Cdx2* ainsi que la possible implication du répresseur *Fog1* dans le contrôle transcriptionnel de *Pap1*. De plus, les résultats ont aussi montré que le site *Cdx2* et le site *Gata #7* au niveau du promoteur de *Pap1* sont les sites importants pour le contrôle transcriptionnel.

Nous avons dans un premier temps confirmé que le site *Gata #7* recrute *Gata4* au niveau du promoteur de *Pap1* dans les cellules IEC-6/*Cdx2*, par immunoprécipitation de la chromatine. Ce résultat couplé à ceux obtenus par essais de cotransfection confirme que le recrutement de *Gata4* au site *Gata #7* est nécessaire pour transactiver le promoteur de *Pap1*. Ce mécanisme de transactivation est différent de celui rapporté pour le gène encodant la sucrase-isomaltase dans lequel la liaison de *Gata4* au promoteur n'est pas nécessaire pour assurer une synergie entre *Gata4* et *Cdx2* (BOUDREAU *et al.*, 2002).

Nos expériences de cotransfection avaient démontré qu'une délétion du doigt de zinc N-terminal mène à l'augmentation de la transcription de *Pap1*. Nous avons confirmé l'implication des corépresseurs *Fog* dans le contrôle de l'expression de *Pap1*, en générant un mutant de *Gata4* avec une glycine au lieu d'une valine à la position 217. Cette mutation permet de diminuer très fortement la capacité de *Gata4* d'interagir avec les *Fog* (CRISPINO *et al.*, 2001). La surexpression du mutant *Gata4 V217G* a permis de démontrer que les *Fog* sont impliqués dans la régulation négative de *Pap1*. Cependant, pour confirmer que ceux-ci sont présents au niveau du promoteur de *Pap1* et qu'ils interagissent physiquement avec *Gata4*, une immunoprécipitation de la chromatine serait nécessaire. Puisque l'expression de *Fog1* au niveau intestinal est d'environ 1000 fois supérieures à celle de *Fog2* (BEULING *et al.*, 2008), nous spéculons que *Fog1* est le corépresseur impliqué dans le contrôle de l'expression de *Pap1*. *Fog2* jouerait alors un rôle mineur dans

la régulation de l'expression de *Pap1*. C'est dans cette optique que nous avons diminué les niveaux protéiques de Fog1 par méthode d'interférence à l'ARN dans les cellules IEC-6/Cdx2. L'augmentation de l'expression de *Pap1* observée dans les IEC-6/Cdx2 a permis de confirmer le rôle de Fog1 dans le contrôle négatif de l'expression de *Pap1*. Il est intéressant de constater que la diminution des niveaux protéiques de Fog1 a un impacte plus grand sur l'expression de *Pap1* dans les IEC-6/Cdx2 arrivant à confluence et peu différenciées comparativement à des IEC-6/Cdx2 induit à se différencier en présence d'IPTG. Puisque d'anciens travaux du laboratoire ont montré que l'expression de *Pap1* est induite lors de la différenciation des IEC-6/Cdx2, il est possible que cette augmentation de l'expression de *Pap1* dans ce contexte sont en partie dû au détachement de Fog1 à Gata4. Un modèle sur la régulation de l'expression de *Pap1* par Gata4, Cdx2 et Fog1 a été élaboré et se retrouve à la figure 19 de l'annexe.

Nos données démontrent que Gata4 participe à la régulation de l'expression du peptide antimicrobien *Pap1* durant la différenciation *in cellulo*. De plus, les résultats de la micropuce à ADN réalisé sur des cellules IEC-6/Cdx2 avec un ARN interférent contre Gata4 (Annexe, Tableau 8) montrent que l'expression d'une autre lectine de type C, soit *Pap3*, est régulée par Gata4. Une analyse des promoteurs de ces deux gènes révèle une structure très similaire (Figure 20). D'ailleurs, il est suggéré que les gènes appartenant à la famille des *Pap/Reg* proviennent d'un gène ancestral commun (ABE *et al.*, 2000).

Puisque le promoteur de *Pap1* est très similaire à celui de l'homologue murin *Reg $\beta$*  (Figure 20), nous pensons que Gata4 serait impliqué dans la régulation de *Reg $\beta$*  chez la souris. Par contre, Battle *et al.* (2008) n'ont identifié ni *Reg3 $\beta$*  (*Pap1*), ni *Reg3 $\gamma$*  (*Pap3*) comme cibles transcriptionnelles potentielles de Gata4 chez des souris invalidées pour *Gata4*. Cependant, *Reg3 $\beta$*  n'est pas exprimé en condition normale, mais est induit suivant un stress inflammatoire ou bactérien. Il est donc possible que Gata4 participe à l'expression de ce peptide antimicrobien dans des conditions inflammatoires.

Cette micropuce a par contre identifiée deux cibles de la famille des *Pap/Reg*, soit *Reg1* et *Reg3a*. Puisque les six membres de la famille des *Reg* (*Reg1*, *Reg2*, *Reg3 $\alpha/\beta/\delta/\gamma$* ) se retrouvent dans la même région de 75 kb du chromosome 6c chez la souris et que l'analyse

des promoteurs prédit plusieurs sites Gata et Cdx2, il est fort possible que les facteurs de transcription Cdx2 et Gata4 ainsi que le corépresseur Fog1 participent à la régulation de cette famille de gènes (ABE *et al.*, 2000).

## **2. Gata4 régule des gènes encodant des molécules de jonction *in vivo*.**

Le facteur de transcription Gata4 est exprimé durant la différenciation des cellules épithéliales intestinales, et contrôle l'expression de plusieurs enzymes, dont la sucrase-isomaltase. Quelques études ont démontré que Gata4 participe aussi à la régulation de gènes encodant des molécules de jonction.

En effet, la surexpression du facteur de transcription Gata4 dans les cellules Caco-2/15 induit positivement Clau-2 (ESCAFFIT *et al.*, 2005). De plus, la surexpression de Gata4, avec Cdx2 et Hnf1 $\alpha$ , dans les cellules HIEC, contrôle l'expression de molécules de jonction, dont Clau-11 et ZO-2 (BENOIT *et al.*, 2010). Puisque Gata4 semblait impliqué dans la régulation de l'expression de molécules de jonction *in cellulo*, nous avons émis l'hypothèse que Gata4 pourrait réguler l'expression de molécules de jonction *in vivo*. Nous avons vérifié par PCR quantitatif l'expression de plusieurs molécules de jonction au niveau du jéjunum de souris invalidées pour *Gata4*. Les deux molécules de jonction dont l'expression est la plus modulée en l'absence de Gata4 sont Clau-2 et Clau-8. Des immunobuvardages ont confirmé que l'augmentation de l'ARNm de Clau-2 corrèle avec une forte induction des niveaux protéiques. De plus, des immunofluorescences indirectes montrent que les deux Claudines sont localisées au complexe apical de jonction, ce qui suggère qu'elles participent au contrôle de la perméabilité des jonctions serrées.

L'augmentation de Clau-2 que nous observons *in vivo* en l'absence de Gata4, est contraire aux résultats d'Escaffit *et al.* (2005) qui suggèrent que Gata4 est un régulateur positif de Clau-2 *in cellulo*. Ces différences pourraient s'expliquer par l'utilisation d'un modèle cellulaire de carcinome de colon dépourvu de l'expression de Gata4. De plus, malgré l'expression de *Cdx2* et *HNF1 $\alpha$*  dans les cellules Caco-2/15, on ne sait pas si le corépresseur *Fog1* est exprimé. Nous pouvons spéculer que l'activité de *Fog1* n'est pas élevée dans les cellules Caco-2/15 alors qu'*in vivo*, Gata4 et *Fog1* sont coexprimés dans le

jéjunum. Il est donc possible que Gata4 ne peut agir comme répresseur dans ce modèle cellulaire lorsque surexprimé si Fog1 n'est pas exprimé.

L'expression d'autres molécules de jonction est modulée dans notre modèle animal. Puisque leur niveau protéique et leur localisation n'ont pas été évalués dans le cadre de ce mémoire, nous ne pouvons pas affirmer que la faible variation en ARNm telle que détectée en PCR quantitatif se reflète par un changement au niveau de la protéine. De plus, la faible variation observée dans leur expression n'est peut-être pas un effet transcriptionnel directement causé par la perte de Gata4. Cependant, l'analyse des promoteurs de ces molécules de jonctions permet de prédire la présence de plusieurs sites Gata. Dans le cas d'E-Cad, Benoit *et al.* (2008) ont suggéré que Gata4 agit comme répresseur transcriptionnel, du moins dans le contexte de la lignée cellulaire HIEC surexprimant Cdx2 et Hnf1 $\alpha$ .

Le facteur de transcription Gata4 pourrait jouer un rôle de répresseur transcriptionnel important pour le maintien de l'homéostasie en contrôlant l'expression de gènes dont les produits forment les jonctions serrées et adhérentes. Il est tentant de spéculer que le corépresseur Fog1 pourrait aussi être impliqué dans le contrôle de la composition des jonctions cellulaires par l'interaction avec le facteur de transcription Gata4. Cette étude est la première à suggérer un rôle du corépresseur Fog1 dans le contrôle de l'expression de molécules de jonctions. Le modèle développé pour le contrôle transcriptionnel de l'expression du peptide antimicrobien Pap1 *in cellulo* pourrait donc s'appliquer pour le contrôle de l'expression de plusieurs molécules de jonction *in vivo*.

### **3. La perte du facteur de Gata4 modifie la perméabilité transépithéliale.**

Plusieurs évidences démontrent un rôle important la famille des Claudines dans le contrôle de la perméabilité transépithéliale. En effet, la surexpression des Claudines augmente l'étanchéité des jonctions dans plusieurs modèles cellulaires (LAL-NAG et MORIN, 2009; VAN ITALLIE et ANDERSON, 2006). Par contre, Clau-2 joue un rôle différent puisqu'elle est impliquée dans l'augmentation de la perméabilité au niveau des jonctions serrées (AMASHEH *et al.*, 2002). Puisque Clau-2 est fortement induite dans nos

animaux invalidés pour *Gata4*, nous avons émis l'hypothèse que la perméabilité transépithéliale serait augmentée.

En accord avec le profil d'expression de *Clau-2*, l'aspect des jonctions au microscope électronique a révélé que certaines régions du jéjunum des souris invalidées pour *Gata4* possèdent des jonctions serrées et adhérentes moins délimitées. Par contre, d'autres régions semblent être moins affectées, avec un aspect normal des jonctions. Nous avons par la suite quantifié la perméabilité transépithéliale avec une solution de FITC-dextran. Le dextran de 4kD ne traverse que très peu la barrière épithéliale intestinale chez les souris de type sauvage (FURUTA *et al.*, 2001; PETERSON *et al.*, 2010). Dans nos expériences, nous avons observé une augmentation des quantités de FITC-dextran dans le sérum des souris invalidées pour *Gata4* comparativement aux souris contrôles suggérant donc que les changements observés dans la composition des jonctions serrées diminuent la capacité à sceller efficacement la voie paracellulaire et à bloquer le passage des macromolécules. Les deux molécules de jonction dont l'expression est la plus modulée en absence de *Gata4* sont *Clau-2* et *Clau-8*. *Clau-8* scelle l'espace intermembranaire (JEANSONNE *et al.*, 2003). Il est possible que *Clau-2*, par son induction chez les animaux invalidés pour *Gata4*, pourrait être en partie responsable de l'augmentation de la perméabilité transépithéliale, malgré l'expression de *Clau-8*. L'augmentation de *Clau-8* permet possiblement de limiter l'augmentation de la perméabilité induite par *Clau-2*. L'augmentation des niveaux de *Clau-8* pourrait être un mécanisme de compensation afin de limiter l'effet de la perte de *Gata4* sur la perméabilité transépithéliale. Il demeure possible que d'autres molécules de jonctions, dont l'expression n'a pas été évaluée, soient modulées en l'absence de *Gata4*, contribuant ainsi à l'augmentation de la perméabilité transépithéliale.

Il est aussi possible que d'autres causes contribuent au passage accru du FITC-dextran chez les souris invalidées pour *Gata4*, notamment des brèches dans l'épithélium des souris mutantes, formées suite au détachement de cellules épithéliales par apoptose ou par un stress physique, comme un contact entre les cellules épithéliales et le bol alimentaire. Le nombre de cellules épithéliales en apoptose reste à être mesuré chez nos animaux. Un lien entre *Gata4* et le contrôle de l'apoptose a été révélé chez les cardiomyocytes puisque *Gata4* est un régulateur positif de *Bcl2*, un gène jouant un rôle

important dans la survie cellulaire (KOBAYASHI *et al.*, 2006). De plus, l'expression de l'homologue Bcl-2 pro-apoptotique Bid est augmentée chez les souris invalidées pour *Gata4* dans les cellules épithéliales intestinales (BATTLE *et al.*, 2008). Les cellules épithéliales des souris invalidées pour *Gata4* pourraient être plus sensibles à l'apoptose, menant ainsi à la formation de brèches au niveau de l'épithélium.

Une brèche dans l'épithélium doit être refermée rapidement pour empêcher le passage des microorganismes présents dans la lumière intestinale, par un mécanisme de restitution épithéliale. Nous avons observé une diminution de la migration cellulaire dans les souris mutantes, qui corrèle avec une augmentation de l'expression de E-Cad (HERMISTON *et al.*, 1996). *Gata4* pourrait donc influencer sur la perméabilité épithéliale en contrôlant la migration épithéliale, et la capacité de refermer les blessures au niveau de l'épithélium.

#### **4. La perte de *Gata4* facilite le passage de *Salmonella Typhimurium* chez les souris femelles.**

Puisque nous avons observé une augmentation de la perméabilité cellulaire, nous avons voulu déterminer si le passage de bactéries de la lumière intestinale vers la circulation sanguine et les organes périphériques était facilité chez les souris invalidées pour *Gata4*. Nous avons quantifié *S. typhimurium* au niveau de la rate et du foie. Étonnamment, nous observons une tendance à la hausse du nombre de bactéries présentes dans la rate et le foie des souris femelles invalidées pour *Gata4* alors qu'aucune tendance n'est présente chez les souris mâles, même si on observe une augmentation de la perméabilité au FITC-dextran. Comme le dextran est plus petit qu'une bactérie, il est possible que les changements dans la composition des jonctions serrées et adhérentes favorisent le passage de petites molécules seulement, et non de bactéries. Cependant, en raison du nombre limité d'animaux mâles, il faudra confirmer ce résultat.

Au contraire des souris mâles, les souris femelles montrent une perméabilité accrue à *S. typhimurium*, même si l'augmentation d'expression de Clau-2 et de la perméabilité au dextran sont semblables chez les souris mâles et femelles. L'augmentation du passage de *S.*

*typhimurium* chez les souris femelles pourrait être causée par une réponse inflammatoire plus forte chez les souris femelles que chez les souris mâles, en l'absence de Gata4.

Il est aussi possible que le rôle transcriptionnel de Gata4 est influencé par des récepteurs hormonaux. Certaines hormones présentes à de plus hauts niveaux chez les femelles, comme les œstrogènes, jouent des rôles importants dans la régulation des processus inflammatoires autant *in vitro* qu'*in vivo* (BOUMAN *et al.*, 2001; JILKA *et al.*, 1992; SPEYER *et al.*, 2005). L'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  sont des exemples de cytokines dont l'expression est régulée négativement par les œstrogènes. Dans des ostéoblastes, Gata4 participe à la régulation des gènes cibles des œstrogènes en facilitant le recrutement du récepteur aux œstrogènes alpha (ER $\alpha$ ) (MIRANDA-CARBONI *et al.*, 2011). En effet, Gata4 recrute des histones méthyltransferases qui entraînent la diméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me2), ce qui permet le recrutement subséquent d'ER $\alpha$  à ses éléments de réponse. Au niveau intestinal, les deux récepteurs d'ER $\alpha$  et ER $\beta$ , qui ont une structure moléculaire semblable et lient le même élément de réponse (KUMAR *et al.*, 2011), sont présents. Par contre, ER $\beta$  est l'isoforme majoritairement exprimé au niveau des cellules épithéliales (CAMPBELL-THOMPSON *et al.*, 2001; KONSTANTINOPOULOS *et al.*, 2003). Il est donc possible que Gata4 peut aussi recruter ER $\beta$  au promoteur de ses gènes cibles. Puisque la régulation par les œstrogènes est plus active chez les femelles et que Gata4 participe à la régulation des gènes cibles des œstrogènes, il est possible que la perte de Gata4 ait une incidence plus grande chez les femelles que chez les mâles.

Le passage accru de *S. typhimurium* pourrait être aussi attribuable en partie à une baisse de l'expression de peptides antimicrobiens comme Pap1. En effet, le passage de *S. typhimurium* est aussi augmenté chez des souris invalidées pour Pap1 (VAN AMPTING *et al.*, 2012). Nous avons d'ailleurs démontré que ce peptide antimicrobien est contrôlé par Gata4 *in cellulo*. Puisque Gata4 est exprimé dans les cellules de Paneth, il est fort possible qu'il régule l'expression de Pap1 *in vivo* (BEULING *et al.*, 2008). Par contre, lorsque l'on analyse les résultats de la micropuce à ADN réalisée chez les animaux invalidés pour Gata4, Pap1 n'est pas modulé. La perte de Gata4 n'affecterait donc pas l'expression de Pap1 en conditions non stimulées, mais pourrait entraîner une régulation en conditions inflammatoires.

## **5. Le système immunitaire est légèrement affecté par la perte de *Gata4* à long terme.**

Nous avons déterminé l'expression relative de plusieurs gènes reliés au système immunitaire, afin de vérifier si le système immunitaire était activé chez les souris femelles dépourvues de *Gata4* dans l'épithélium intestinal. Parmi les 27 gènes analysés, seul le gène ICAM-1 est modulé significativement chez les femelles invalidées pour *Gata4*. L'expression d'ICAM-1 est induite par des signaux inflammatoires dans les cellules intestinales épithéliales, notamment par la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  (JOBIN *et al.*, 1998). Chez les animaux invalidés pour *Gata4*, nous observons une augmentation non significative de l'expression du TNF- $\alpha$  chez les souris femelles invalidées pour *Gata4*. Il est possible que l'augmentation des niveaux de TNF- $\alpha$  puisse expliquer l'augmentation de l'expression d'ICAM-1. En plus d'ICAM-1, d'autres gènes montrent une tendance à la hausse au niveau de leur expression, notamment Cx3Cr1, un récepteur transmembranaire pour la fractalkine (chimiokine) retrouvé à la surface des macrophages et des cellules dendritiques, l'IL-23r, le récepteur à l'interleukine 23 qui induit la différenciation des lymphocytes T Cd4+ en cellules T de type 17 (Th17) une fois activé, Cd69, un récepteur transmembranaire présent à la surface des lymphocytes T Cd4+ en différenciation. Ces augmentations au niveau de l'expression restent à confirmer statistiquement.

Les changements dans l'expression de quelques gènes de la réponse inflammatoire chez les souris invalidées pour *Gata4* suggèrent que la perte de *Gata4* à long terme n'entraîne pas une suractivation du système immunitaire, malgré les défauts dans la barrière épithéliale intestinale. Il est probable que la microflore présente chez ses animaux entre un peu plus souvent en contact avec les cellules immunitaires sans nécessairement enclencher une réponse inflammatoire forte et prolongée. Même si nous ne pouvons pas affirmer avec certitude que la population de cellules immunitaires est différente entre les animaux contrôles et mutants, il est probable que l'inactivation de *Gata4* dans le jéjunum des souris invalidées pour *Gata4* altère le recrutement des lymphocytes puisque l'expression de trois gènes exprimés par les lymphocytes T est augmentée.

Plusieurs études ont démontré que l'augmentation de la perméabilité intestinale n'est généralement pas suffisante pour entraîner une activation du système immunitaire et

l'établissement d'un état inflammatoire chronique chez la souris (GARRETT *et al.*, 2010; LAUKOETTER *et al.*, 2008; MARCHIANDO *et al.*, 2010). La microflore chez les animaux joue un rôle important dans le déclenchement d'une réponse inflammatoire (NELL *et al.*, 2010). Comme nos animaux sont maintenus dans une unité de souris transgéniques avec une présence négligeable de bactéries pathogènes, il est donc possible que les bactéries présentes dans cet environnement ne soient pas suffisantes pour activer le système immunitaire malgré le passage accru à travers l'épithélium.

## Conclusion

La présente étude a permis de confirmer que le facteur de transcription Gata4 ainsi que le corépresseur Fog1 contrôlent l'expression des ARNm du peptide antimicrobien Pap1 dans la lignée cellulaire IEC-6/Cdx2. Ce résultat démontre que Gata4 et Fog1 sont possiblement impliqués dans le contrôle de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales intestinales.

Cette étude est aussi la première à rapporter un rôle pour Gata4 dans le maintien de la barrière épithéliale intestinale *in vivo* en régulant l'expression de gènes encodant des molécules de jonction, notamment Clau-2, qui est fortement induit chez les animaux dépourvus de Gata4 dans l'épithélium intestinal. La présence de Clau-2 au niveau des jonctions serrées corrèle avec une augmentation marquée de la perméabilité transcellulaire au FITC-Dextran. Nous avons observé une tendance à la hausse du passage de *S. typhimurium* à travers l'épithélium suivant une infection orale chez les souris femelles seulement. L'effet du sexe sur le phénotype observé reste pour l'instant à confirmer en raison du petit nombre d'animaux utilisés dans le cadre de nos expériences. De plus, nous ne pouvons exclure un changement dans la réponse inflammatoire pour expliquer le passage accru de la bactérie.

Finalement, il est fort possible qu'*in vivo*, le facteur de transcription Gata4 joue un double rôle afin de limiter les contacts entre la microflore et les cellules immunitaires, soit en limitant le passage des bactéries par la voie paracellulaire et en régulant l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire comme Pap1.

## Perspectives

Plusieurs aspects doivent être complétés afin de confirmer le rôle du facteur de transcription Gata4 dans la régulation de la perméabilité transépithéliale et de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales intestinales.

Des immunobuvardages de type western ainsi que des immunofluorescences indirectes devront être effectués afin de valider si la modulation des ARNm de plusieurs gènes encodant des molécules de jonctions en l'absence de Gata4 affecte le niveau protéique ainsi que la localisation. De plus, l'expression de plusieurs autres molécules de jonctions demeure pour l'instant inconnue. Par exemple, plus d'une vingtaine de Claudines sont répertoriées et nous avons analysé l'expression de cinq d'entre elles. Une approche par PCR quantitatif ou par micropuce à ADN permettra de compléter cet aspect du travail.

Il serait aussi intéressant de confirmer que les gènes encodant les molécules de jonction comme Clau-2 sont directement régulés par Gata4. Il serait alors nécessaire d'effectuer des EMSA, des essais luciférase et des immunoprécipitations de la chromatine.

Nos résultats semblent indiquer qu'il y a une différence dans la capacité à répondre à un stress bactérien entre les souris mâles et femelles invalidées pour Gata4. Il sera alors important dans un premier temps d'augmenter le nombre d'animaux dans les deux catégories afin de confirmer ces résultats préliminaires. Il serait aussi nécessaire d'effectuer des infections bactériennes avec d'autres souches que *S. typhimurium* SB103, car chaque espèce de bactéries possède un mode d'action différent pour envahir l'hôte. Par exemple, certaines espèces d'*Helicobacter* utilisent la voie paracellulaire pour infecter l'hôte, au contraire de *S. typhimurium*. Ceci permettrait alors de valider la capacité des jonctions à bloquer la voie paracellulaire aux bactéries.

De plus, afin de déterminer si le passage accru des bactéries à travers l'épithélium est dépendant d'une capacité altérée de réponse inflammatoire intestinale, il serait important d'identifier le réseau de gènes dépendants de Gata4 dans ce contexte. Puisque nous avons vérifié l'expression de quelques marqueurs inflammatoires en conditions de base, il serait

intéressant de mesurer l'expression de ces cibles suivant une infection bactérienne. Une expérience pertinente serait de comparer les variations de l'expression des ARNm à grande échelle en conditions d'infection bactériennes chez les souris contrôles et mutantes mâles et femelles. Concernant la liste de gènes inflammatoires dont l'expression a été quantifiée, peu de gènes sont des marqueurs spécifiques d'un seul type cellulaire. Il serait intéressant d'analyser l'expression de marqueurs plus spécifiques comme la MPO (neutrophiles) et CD31 (macrophages) afin d'évaluer les variations possibles entre différentes populations de cellules immunitaires.

Il serait aussi intéressant de mesurer l'expression de *Pap1* suite aux infections bactériennes dans les souris invalidées pour *Gata4* puisque nous avons démontré que *Gata4* peut participer la réponse inflammatoire des cellules épithéliales en régulant *Pap1 in cellulo*. L'expression d'autres membres des lectines de type C, tel que *Pap3*, pourrait être aussi évaluée. En effet, une analyse du promoteur de *Pap3* permet de prédire la présence de plusieurs sites de liaison pour *Gata4* et *Cdx2* (Figure 20). Il en va de même pour les équivalents murins *Reg3 $\beta$*  (*Pap1*) et *Reg3 $\gamma$*  (*Pap3*). Ceci laisse présager que les mécanismes de régulation démontrés pour *Pap1* pourraient s'appliquer à d'autres membres de cette famille.

## Remerciements

Pendant les 2 années passées dans le laboratoire, j'ai côtoyé des gens formidables qui m'ont aidé à compléter cette maîtrise.

Premièrement, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le professeur François Boudreau. Merci de m'avoir accueilli dans ton laboratoire et de m'avoir fait confiance pour un stage ainsi que pour mon projet de maîtrise. Merci de m'avoir transmis tes connaissances et d'avoir développé mon esprit scientifique. Tu as su m'encourager pendant les périodes plus difficiles et me féliciter lors de mes réussites. Ton enthousiasme est contagieux. Je repars du laboratoire avec une expertise formidable et qui me servira tout au cours de ma future carrière.

Deuxièmement, je voudrais remercier mes collègues de laboratoire; Isabelle Fréchette, Roxanne Latreille, Christine Jones, Stéphanie St-Jean, Jean-Philippe Babeu, François Brial, Mathieu Darsigny et Sébastien Mongrain. Chacun d'entre eux m'a aidé ou apporté de précieux conseils à un moment donné. Ce fut un plaisir de travailler avec vous tous et j'espère que l'on restera en contact. Un merci plus particulier à François Brial avec qui j'ai développé une belle complicité. J'ai eu beaucoup de plaisir à te côtoyer et tu as su me faire rire chaque jour avec ton humour.

Troisièmement, je tiens à remercier les professeurs Claude Asselin et Brendan Bell qui ont accepté de donner du temps pour la révision de ce mémoire.

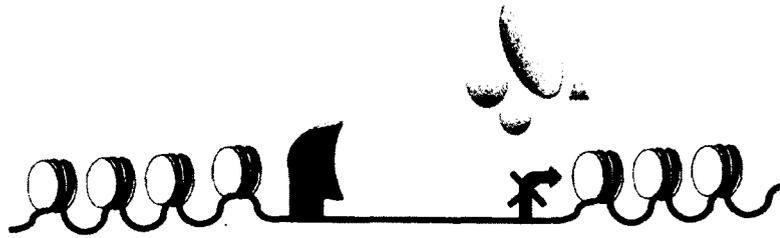
Quatrièmement, je voudrais remercier le professeur Alfredo Menendez ainsi que Sarah Tremblay pour leur aide avec les infections bactériennes de souris à la Salmonelle. Votre expertise a été très importante pour compléter mon projet de maîtrise.

## Annexes

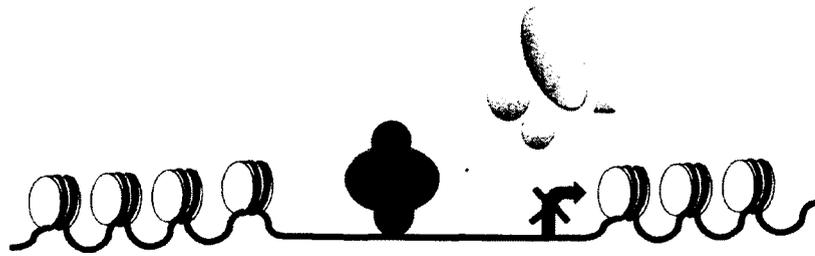
**Figure 19. Modèle de régulation de l'expression de *Pap1* par *Gata4*, *Cdx2* et *Fog1*.**

*Cdx2* seul (a) ou *Gata4* seul (b) ne sont pas en mesure d'activer le promoteur de *Pap1*. En présence de *Fog1*, *Gata4* et *Cdx2* sont capables d'activer le promoteur de *Pap1*, mais de façon moins efficace comparativement à *Gata4* et *Cdx2* qui n'interagissent pas avec *Fog1*, (d).

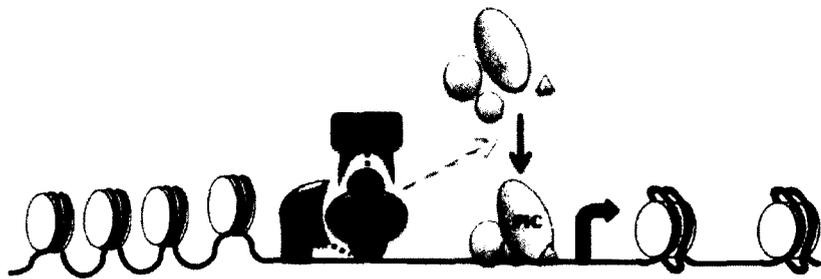
a)



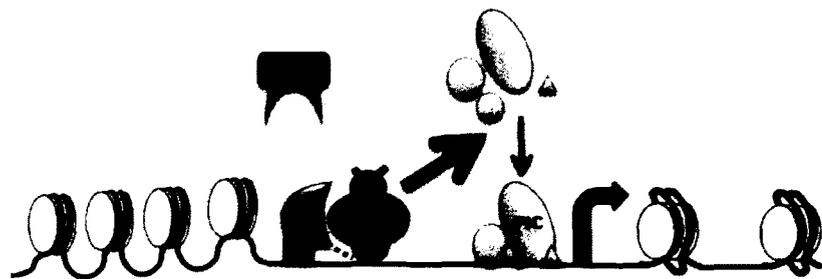
b)



c)

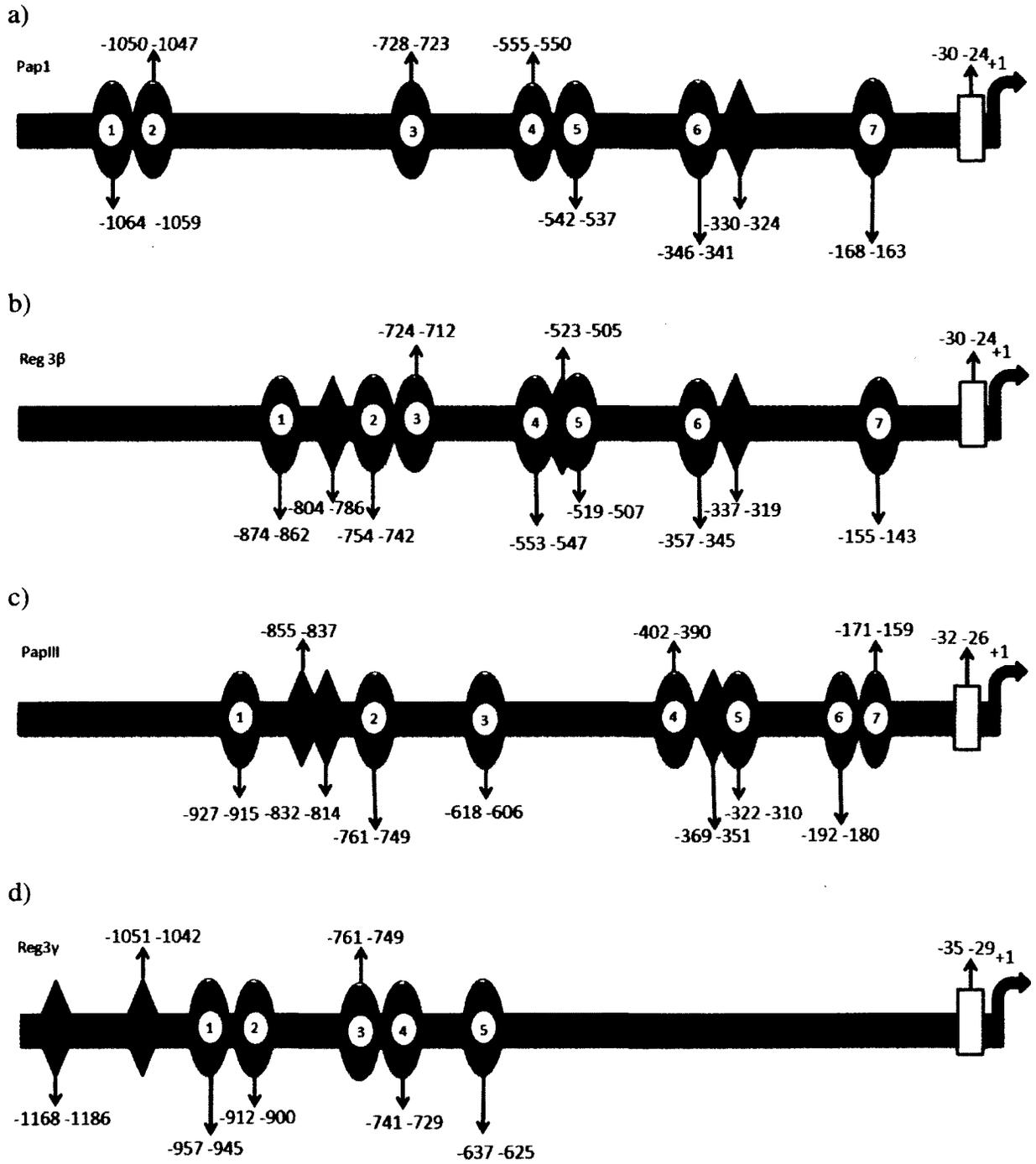


d)



**Figure 20 Analyses du promoteur de gènes encodant quelques lectines de type C chez le rat et la souris.**

Analyse des 1200 premières paires de bases des promoteurs de *Pap1* de rat (a), de *Reg 3 $\beta$*  de souris (b), de *Pap3* de rat (c) et de *Reg3 $\gamma$*  de souris (d), avec le logiciel MatInspector. Les cercles verts représentent les sites Gata, les losanges orangés représentent les sites Cdx2 et les rectangles vides représentent la boîte TATA. Les flèches noires pointant vers le haut représentent un site sur le brin positif de l'ADN alors que les flèches noires pointant vers le bas représentent un site sur le brin négatif de l'ADN. Les flèches vertes représentent le site d'initiation de la transcription.



<b>Gene</b>	<b>Fold difference (shGATA/shctrl)</b>
Pancreatitis-associated protein I (PAPI)	-1.8
Pancreatitis-associated protein III (PAPIII)	-1.8
Glutathione peroxidase 2 (GPX2)	-1.6
JNK Inhibitory Kinase (JNK)	-1.5
Guanine nucleotide binding protein 12 (Gng12)	-1.8
FH1/FH2 domains-containing protein Formin homologue	-1.6
RAB3A interacting protein (Rabin 3)	-1.7
Predicted similar to LIM cell antigen-like domains 1	-1.5
GATA-4	-2.1
Neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1)	1.7
Low density lipoprotein related protein 6	1.7
Predicted F-box protein 28	1.5
Similar to RIKEN cDNA 2010005013	1.6

**Tableau 8. Micropuce à ADN réalisée à partir de cellules IEC-6/Cdx2 dans lesquelles l'expression de Gata4 a été diminuée par interférence à l'ARN.**

L'expression de Gata4 a été diminuée par interférence à l'ARN dans les cellules IEC-6/Cdx2 puis celles-ci ont été traitées 48 h à l'IPTG. Une micropuce à ADN a ensuite été réalisée sur ces échantillons. Pap1 et Pap3 ont été identifiées comme cible transcriptionnelle de Gata4.

## Références

- Aiello, L., Guilfoyle, R., Huebner, K. et Weinmann, R. (1979) Adenovirus 5 DNA sequences present and RNA sequences transcribed in transformed human embryo kidney cells (HEK-Ad-5 or 293). *Virology*, **94**(2), 460-469.
- Abe M., Nata K., Akiyama T., Shervani N. J., Kobayashi S., Tomioka-Kumagai T., Sadayoshi I., Takasawa S. et Okamoto H. (2000) Identification of a novel Reg family gene, Reg IIIdelta, and mapping of all three types of Reg family gene in a 75 kilobase mouse genomic region. *Gene*, **246** (1), 111-122
- Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A. H., Schoneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J. D. et Fromm, M. (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *Journal of Cell Science*, **115**(Pt 24), 4969-4976.
- Arceci, R. J., King, A. A., Simon, M. C., Orkin, S. H. et Wilson, D. B. (1993) Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Molecular and Cellular Biology*, **13**(4), 2235-2246.
- Artis, D. (2008) Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Reviews Immunology*, **8**(6), 411-420.
- Barker, N., van de Wetering, M. et Clevers, H. (2008) The intestinal stem cell. *Genes and Development*, **22**(14), 1856-1864.
- Barnes, P. J. (2008) Role of GATA-3 in allergic diseases. *Current Molecular Medicine*, **8**(5), 330-334.
- Barnes, P. J. (2011) Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunological Reviews*, **242**(1), 31-50.
- Battle, M. A., Bondow, B. J., Iverson, M. A., Adams, S. J., Jandacek, R. J., Tso, P. et Duncan, S. A. (2008) GATA4 is essential for jejunal function in mice. *Gastroenterology*, **135**(5), 1676-1686.
- Belaguli, N. S., Zhang, M., Garcia, A. H. et Berger, D. H. (2012) PIAS1 is a GATA4 SUMO ligase that regulates GATA4-dependent intestinal promoters independent of SUMO ligase activity and GATA4 sumoylation. *PLoS One*, **7**(4), e35717.

Benoit, Y. D., Pare, F., Francoeur, C., Jean, D., Tremblay, E., Boudreau, F., Escaffit, F. et Beaulieu, J. F. (2010) Cooperation between HNF-1alpha, Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, **298**(4), G504-517.

Bernaudin, J.-F., *Atlas en couleur d'histologie*, Éditions Pradel, 1997.

Beuling, E., Bosse, T., van de Kerk, D. J., Piaseckyj, C. M., Fujiwara, Y., Katz, S. G., Orkin, S. H., Grand, R. J. et Krasinski, S. D. (2008) GATA4 mediates gene repression in the mature mouse small intestine through interactions with friend of GATA (FOG) cofactors. *Developmental Biology*, **322**(1), 179-189.

Beuling, E., Baffour-Awuah, N. Y., Stapleton, K. A., Aronson, B. E., Noah, T. K., Shroyer, N. F., Duncan, S. A., Fleet, J. C. et Krasinski, S. D. (2011) GATA factors regulate proliferation, differentiation, and gene expression in small intestine of mature mice. *Gastroenterology*, **140**(4), 1219-1229.

Bosse, T., Piaseckyj, C. M., Burghard, E., Fialkovich, J. J., Rajagopal, S., Pu, W. T. et Krasinski, S. D. (2006) Gata4 is essential for the maintenance of jejunal-ileal identities in the adult mouse small intestine. *Molecular and Cellular Biology*, **26**(23), 9060-9070.

Boudreau, F., Rings, E. H., van Wering, H. M., Kim, R. K., Swain, G. P., Krasinski, S. D., Moffett, J., Grand, R. J., Suh, E. R. et Traber, P. G. (2002) Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**(35), 31909-31917.

Boulende Sab, A., Bouchard, M. F., Beland, M., Prud'homme, B., Souchkova, O., Viger, R. S. et Pilon, N. (2011) An Ebox element in the proximal Gata4 promoter is required for Gata4 expression in vivo. *PLoS One*, **6**(12), e29038.

Bouman, A., Moes, H., Heineman, M. J., de Leij, L. F. et Faas, M. M. (2001) The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: increasing sensitivity of human monocytes to endotoxin. *Fertility and Sterility*, **76**(3), 555-559.

Brittan, M. et Wright, N. A. (2002) Gastrointestinal stem cells. *The Journal of Pathology*, **197**(4), 492-509.

Brivanlou, A. H. et Darnell, J. E., Jr. (2002) Signal transduction and the control of gene expression. *Science*, **295**(5556), 813-818.

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

Bruneau, J. (2011) Gata4 et Cdx2 sont des régulateurs transcriptionnels intestinaux du gène encodant la protéine sécrétoire de type lectine Pap1. Université de Sherbrooke. 90 pages.

Campbell-Thompson, M., Lynch, I. J. et Bhardwaj, B. (2001) Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Research*, **61**(2), 632-640.

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

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

Chen, Y., Mao, J., Sun, Y., Zhang, Q., Cheng, H. B., Yan, W. H., Choy, K. W. et Li, H. (2010) A novel mutation of GATA4 in a familial atrial septal defect. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, **411**(21-22), 1741-1745.

Christa, L., Felin, M., Morali, O., Simon, M. T., Lasserre, C., Brechot, C. et Seve, A. P. (1994) The human HIP gene, overexpressed in primary liver cancer encodes for a C-type carbohydrate binding protein with lactose binding activity. *FEBS Letters*, **337**(1), 114-118.

Clayburgh, D. R., Shen, L. et Turner, J. R. (2004) A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, **84**(3), 282-291.

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

Coskun, M., Troelsen, J. T. et Nielsen, O. H. (2011) The role of CDX2 in intestinal homeostasis and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1812**(3), 283-289.

Crispino, J. D., Lodish, M. B., MacKay, J. P. et Orkin, S. H. (1999) Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. *Molecular Cell*, **3**(2), 219-228.

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

Crosnier, C., Stamataki, D. et Lewis, J. (2006) Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews Genetics*, **7**(5), 349-359.

Cummings, D. E. et Overduin, J. (2007) Gastrointestinal regulation of food intake. *The Journal of Clinical Investigation*, **117**(1), 13-23.

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

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

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

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

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

Fujiwara, Y., Browne, C. P., Cunniff, K., Goff, S. C. et Orkin, S. H. (1996) Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription

factor GATA-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(22), 12355-12358.

Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H. et Tsukita, S. (2001) Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *The Journal of Cell Biology*, **153**(2), 263-272.

Furuta, G. T., Turner, J. R., Taylor, C. T., Hershberg, R. M., Comerford, K., Narravula, S., Podolsky, D. K. et Colgan, S. P. (2001) Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *The Journal of Experimental Medicine*, **193**(9), 1027-1034.

Galan, J. E. et Curtiss, R., 3rd. (1991) Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infection and Immunity*, **59**(9), 2901-2908.

Gao, X., Sedgwick, T., Shi, Y. B. et Evans, T. (1998) Distinct functions are implicated for the GATA-4, -5, and -6 transcription factors in the regulation of intestine epithelial cell differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, **18**(5), 2901-2911.

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

Gersemann, M., Wehkamp, J. et Stange, E. F. (2012) Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Journal of Internal Medicine*, **271**(5), 421-428.

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

Grepin, C., Robitaille, L., Antakly, T. et Nemer, M. (1995) Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, **15**(8), 4095-4102.

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

Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A. H., Burgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W. et Schulzke, J. D. (2005) Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*, **129**(2), 550-564.

Henninger, D. D., Panes, J., Eppihimer, M., Russell, J., Gerritsen, M., Anderson, D. C. et Granger, D. N. (1997) Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *Journal of Immunology*, **158**(4), 1825-1832.

Hermiston, M. L., Wong, M. H. et Gordon, J. I. (1996) Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. *Genes and Development*, **10**(8), 985-996.

Hirayama-Yamada, K., Kamisago, M., Akimoto, K., Aotsuka, H., Nakamura, Y., Tomita, H., Furutani, M., Imamura, S., Takao, A., Nakazawa, M. et Matsuoka, R. (2005) Phenotypes with GATA4 or NKX2.5 mutations in familial atrial septal defect. *American journal of Medical Genetics, Part A*, **135**(1), 47-52.

Ho, I. C. et Pai, S. Y. (2007) GATA-3 - not just for Th2 cells anymore. *Cellular and Molecular Immunology*, **4**(1), 15-29.

Holmes, J. L., Van Itallie, C. M., Rasmussen, J. E. et Anderson, J. M. (2006) Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expression Patterns*, **6**(6), 581-588.

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

Ishibashi, T., Yokura, Y., Ohashi, K., Yamamoto, H. et Maeda, M. (2011) Conserved GC-boxes, E-box and GATA motif are essential for GATA-4 gene expression in P19CL6 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **413**(2), 171-175.

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

- Jeansonne, B., Lu, Q., Goodenough, D. A. et Chen, Y. H. (2003) Claudin-8 interacts with multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) and reduces paracellular conductance in epithelial cells. *Cellular and Molecular Biology*, **49**(1), 13-21.
- Jenny, M., Uhl, C., Roche, C., Duluc, I., Guillermin, V., Guillemot, F., Jensen, J., Kedinger, M. et Gradwohl, G. (2002) Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *The EMBO Journal*, **21**(23), 6338-6347.
- Jilka, R. L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D. C., Abrams, J. S., Boyce, B., Broxmeyer, H. et Manolagas, S. C. (1992) Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, **257**(5066), 88-91.
- Kaur, J. et Jain, S. K. (2012) Role of antigens and virulence factors of Salmonella enterica serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiological Research*, **167**(4), 199-210.
- Keim, V., Rohr, G., Stockert, H. G. et Haberich, F. J. (1984) An additional secretory protein in the rat pancreas. *Digestion*, **29**(4), 242-249.
- Kelley, C., Blumberg, H., Zon, L. I. et Evans, T. (1993) GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart. *Development*, **118**(3), 817-827.
- Kim, Y. S. et Ho, S. B. (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*, **12**(5), 319-330.
- Ko, L. J. et Engel, J. D. (1993) DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Molecular and Cellular Biology*, **13**(7), 4011-4022.
- Kobayashi, S., Lackey, T., Huang, Y., Bisping, E., Pu, W. T., Boxer, L. M. et Liang, Q. (2006) Transcription factor gata4 regulates cardiac BCL2 gene expression in vitro and in vivo. *FASEB Journal*, **20**(6), 800-802.
- Konstantinopoulos, P. A., Kominea, A., VANDOROS, G., Sykiotis, G. P., Andricopoulos, P., Varakis, I., Sotiropoulou-Bonikou, G. et Papavassiliou, A. G. (2003) Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *European Journal of Cancer*, **39**(9), 1251-1258.

Kumar, R., Zakharov, M. N., Khan, S. H., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., Singh, R., Bhasin, S. et Jasuja, R. (2011) The dynamic structure of the estrogen receptor. *Journal of Amino Acids*, **2011**, 1-7

Lal-Nag, M. et Morin, P. J. (2009) The claudins. *Genome Biology*, **10**(8), 235.3-235.7.

Lamina, C., Coassin, S., Illig, T. et Kronenberg, F. (2011) Look beyond one's own nose: combination of information from publicly available sources reveals an association of GATA4 polymorphisms with plasma triglycerides. *Atherosclerosis*, **219**(2), 698-703.

Laukoetter, M. G., Nava, P. et Nusrat, A. (2008) Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : World Journal of Gastroenterology*, **14**(3), 401-407.

Laverriere, A. C., MacNeill, C., Mueller, C., Poelmann, R. E., Burch, J. B. et Evans, T. (1994) GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**(37), 23177-23184.

Lee, Y. H., Sauer, B. et Gonzalez, F. J. (1998) Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1alpha knockout mouse. *Molecular and Cellular Biology*, **18**(5), 3059-3068.

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

Long, E. O. (2011) ICAM-1: getting a grip on leukocyte adhesion. *Journal of Immunology*, **186**(9), 5021-5023.

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

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

Lussier, C. R., Brial, F., Roy, S. A., Langlois, M. J., Verdu, E. F., Rivard, N., Perreault, N. et Boudreau, F. (2010) Loss of hepatocyte-nuclear-factor-1alpha impacts on adult mouse intestinal epithelial cell growth and cell lineages differentiation. *PloS One*, **5**(8), e12378.

Madison, B. B., Dunbar, L., Qiao, X. T., Braunstein, K., Braunstein, E. et Gumucio, D. L. (2002) Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**(36), 33275-33283.

Marchiando, A. M., Graham, W. V. et Turner, J. R. (2010) Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annual Review of Pathology*, **5**, 119-144.

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

Marshman, E., Booth, C. et Potten, C. S. (2002) The intestinal epithelial stem cell. *BioEssays*, **24**(1), 91-98.

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

Mazaud Guittot, S., Bouchard, M. F., Robert-Grenon, J. P., Robert, C., Goodyer, C. G., Silvérides, D. W. et Viger, R. S. (2009) Conserved usage of alternative 5' untranslated exons of the GATA4 gene. *PloS One*, **4**(12), e8454.

Mendel, D. B. et Crabtree, G. R. (1991) HNF-1, a member of a novel class of dimerizing homeodomain proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**(2), 677-680.

Merika, M. et Orkin, S. H. (1993) DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Molecular and Cellular Biology*, **13**(7), 3999-4010.

Miranda-Carboni, G. A., Guemes, M., Bailey, S., Anaya, E., Corselli, M., Peault, B. et Krum, S. A. (2011) GATA4 regulates estrogen receptor-alpha-mediated osteoblast transcription. *Molecular Endocrinology*, **25**(7), 1126-1136.

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

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

Morrisey, E. E., Ip, H. S., Tang, Z. et Parmacek, M. S. (1997) GATA-4 activates transcription via two novel domains that are conserved within the GATA-4/5/6 subfamily. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**(13), 8515-8524.

Morrisey, E. E., Tang, Z., Sigrist, K., Lu, M. M., Jiang, F., Ip, H. S. et Parmacek, M. S. (1998) GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes and Development*, **12**(22), 3579-3590.

Nell, S., Suerbaum, S. et Josenhans, C. (2010) The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. *Nature Reviews Microbiology*, **8**(8), 564-577.

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

Pabo, C. O. et Sauer, R. T. (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annual Review of Biochemistry*, **61**, 1053-1095.

Patankar, J. V., Chandak, P. G., Obrowsky, S., Pfeifer, T., Diwoky, C., Uellen, A., Sattler, W., Stollberger, R., Hoefler, G., Heinemann, A., Battle, M., Duncan, S., Kratky, D. et Levak-Frank, S. (2011) Loss of intestinal GATA4 prevents diet-induced obesity and promotes insulin sensitivity in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **300**(3), E478-488.

Peterson, C. Y., Costantini, T. W., Loomis, W. H., Putnam, J. G., Wolf, P., Bansal, V., Eliceiri, B. P., Baird, A. et Coimbra, R. (2010) Toll-like receptor-4 mediates intestinal barrier breakdown after thermal injury. *Surgical Infections*, **11**(2), 137-144.

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

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

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

Rindi, G., Leiter, A. B., Kopin, A. S., Bordi, C. et Solcia, E. (2004) The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1014**, 1-12.

Rojas, A., Kong, S. W., Agarwal, P., Gilliss, B., Pu, W. T. et Black, B. L. (2008) GATA4 is a direct transcriptional activator of cyclin D2 and Cdk4 and is required for cardiomyocyte proliferation in anterior heart field-derived myocardium. *Molecular and Cellular Biology*, **28**(17), 5420-5431.

Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N. F., van de Wetering, M. et Clevers, H. (2011) Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, **469**(7330), 415-418.

Schneider, M. R., Dahlhoff, M., Horst, D., Hirschi, B., Trulzsch, K., Muller-Hocker, J., Vogelmann, R., Allgauer, M., Gerhard, M., Steininger, S., Wolf, E. et Kolligs, F. T. (2010) A key role for E-cadherin in intestinal homeostasis and Paneth cell maturation. *PloS One*, **5**(12), e14325.

Scoville, D. H., Sato, T., He, X. C. et Li, L. (2008) Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology*, **134**(3), 849-864.

Simon, M. T., Pauloin, A., Normand, G., Lieu, H. T., Mouly, H., Pivert, G., Carnot, F., Tralhao, J. G., Brechot, C. et Christa, L. (2003) HIP/PAP stimulates liver regeneration after partial hepatectomy and combines mitogenic and anti-apoptotic functions through the PKA signaling pathway. *FASEB Journal*, **17**(11), 1441-1450.

Snippert, H. J., van der Flier, L. G., Sato, T., van Es, J. H., van den Born, M., Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A. M., van Rheenen, J., Simons, B. D. et Clevers, H. (2010) Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell*, **143**(1), 134-144.

Speyer, C. L., Rancilio, N. J., McClintock, S. D., Crawford, J. D., Gao, H., Sarma, J. V. et Ward, P. A. (2005) Regulatory effects of estrogen on acute lung inflammation in mice. *American Journal of Physiology. Cell physiology*, **288**(4), C881-890.

Strumpf, D., Mao, C. A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F. et Rossant, J. (2005) Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoderm in the mouse blastocyst. *Development*, **132**(9), 2093-2102.

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

Suzuki, Y. J., Nagase, H., Day, R. M. et Das, D. K. (2004) GATA-4 regulation of myocardial survival in the preconditioned heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **37**(6), 1195-1203.

Svensson, E. C., Tufts, R. L., Polk, C. E. et Leiden, J. M. (1999) Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(3), 956-961.

Tevosian, S. G., Deconinck, A. E., Cantor, A. B., Rieff, H. I., Fujiwara, Y., Corfas, G. et Orkin, S. H. (1999) FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(3), 950-955.

Tevosian, S. G., Deconinck, A. E., Tanaka, M., Schinke, M., Litovsky, S. H., Izumo, S., Fujiwara, Y. et Orkin, S. H. (2000) FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. *Cell*, **101**(7), 729-739.

Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D. et Sauvage, F. J. (2011) A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, **478**(7368), 255-259.

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

Troelsen, J. T., Mitchelmore, C., Spodsberg, N., Jensen, A. M., Noren, O. et Sjostrom, H. (1997) Regulation of lactase-phlorizin hydrolase gene expression by the caudal-related homoeodomain protein Cdx-2. *The Biochemical Journal*, **322** (Pt 3), 833-838.

Tsang, A. P., Visvader, J. E., Turner, C. A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M. J., Crossley, M. et Orkin, S. H. (1997) FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for

transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*, **90**(1), 109-119.

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

Turgeon, N., Rousseau, D., Roy, E. et Asselin, C. (2008) GATA-4 modulates C/EBP-dependent transcriptional activation of acute phase protein genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **370**(2), 371-375.

Turner, J. R. (2006) Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *The American Journal of Pathology*, **169**(6), 1901-1909.

van Ampting, M. T., Loonen, L. M., Schonewille, A. J., Konings, I., Vink, C., Iovanna, J., Chamailard, M., Dekker, J., van der Meer, R., Wells, J. M. et Bovee-Oudenhoven, I. M. (2012) Intestinally secreted C-type lectin Reg3b attenuates salmonellosis but not listeriosis in mice. *Infection and Immunity*, **80**(3), 1115-1120.

Van Itallie, C. M. et Anderson, J. M. (2006) Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology*, **68**, 403-429.

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

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

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

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

- Wang, J., Feng, X. H. et Schwartz, R. J. (2004) SUMO-1 modification activated GATA4-dependent cardiogenic gene activity. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**(47), 49091-49098.
- Watson, K. G. et Holden, D. W. (2010) Dynamics of growth and dissemination of Salmonella in vivo. *Cellular Microbiology*, **12**(10), 1389-1397.
- Watt, A. J., Battle, M. A., Li, J. et Duncan, S. A. (2004) GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(34), 12573-12578.
- Weiss, M. J. et Orkin, S. H. (1995) GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Experimental Hematology*, **23**(2), 99-107.
- Whyatt, D. J., deBoer, E. et Grosveld, F. (1993) The two zinc finger-like domains of GATA-1 have different DNA binding specificities. *The EMBO Journal*, **12**(13), 4993-5005.
- Yang, H. Y. et Evans, T. (1992) Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains. *Molecular and Cellular Biology*, **12**(10), 4562-4570.
- Zeissig, S., Burgel, N., Gunzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A. J., Zeitz, M., Fromm, M. et Schulzke, J. D. (2007) Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*, **56**(1), 61-72.