

Université de Sherbrooke

LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION GATA-4 ET SON RÔLE DANS LA RÉPONSE
INFLAMMATOIRE INTESTINALE CHEZ LE RAT

Par

Anthony Rémillard

Département d'anatomie et de 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

Septembre 2009

Membres du jury

Dr Claude Asselin, Département d'anatomie et biologie cellulaire

Dr François Boudreau, Département d'anatomie et biologie cellulaire

Dr Abdelaziz Amrani, Département de pédiatrie



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-70801-9
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-70801-9

NOTICE:

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

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

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.

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.

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

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


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	II
LISTE DES FIGURES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VI
LISTE DES COMMUNICATIONS	X
RÉSUMÉ.....	XI
INTRODUCTION.....	12
1. La cellule épithéliale intestinale comme modèle d'étude.....	12
1.1 <i>Le tractus gastro-intestinal</i>	12
1.2 <i>Anatomie et physiologie de l'intestin grêle</i>	12
1.3 <i>La cellule épithéliale intestinale</i>	13
2. L'inflammation intestinale.....	14
2.1 <i>La flore microbienne normale</i>	14
2.2 <i>La réponse inflammatoire</i>	14
2.3 <i>La voie IL-1β</i>	18
2.4 <i>NF-κB</i>	18
2.5 <i>AP-1</i>	22
2.6 <i>C/EBPs</i>	22
2.7 <i>MAPK</i>	23
2.8 <i>Akt</i>	26
3. Le facteur de transcription GATA-4.....	26
3.1 <i>La famille des facteurs de transcription GATA</i>	26
3.2 <i>Expression de GATA-4</i>	30
3.3 <i>Fonctions de GATA-4</i>	31
3.4 <i>Structure de GATA-4</i>	33
3.5 <i>Régulation de l'activité de GATA-4</i>	36
3.6 <i>GATA-4 et prolifération</i>	37
3.7 <i>GATA-4 et la réponse inflammatoire intestinale</i>	37
4. Mon hypothèse de recherche.....	38
MATÉRIEL ET MÉTHODES	39
1. Culture cellulaire.....	39
2. Étude des mécanismes de régulation de la réponse inflammatoire par GATA-4	39
2.1 <i>Inductions</i>	39
2.2 <i>Extraction de protéines totales</i>	39
2.3 <i>Immunobuvardage de type Western</i>	40
2.4 <i>Extraction de protéines nucléaires</i>	40
2.5 <i>Préparation des sondes radioactives pour les gels de rétention</i>	40
2.6 <i>Gel de rétention</i>	42
2.7 <i>Extraction des ARNs totaux</i>	42

2.8 RT-PCR semi quantitatif.....	43
3. Génération et caractérisation des mutants de GATA-4	44
3.1 Mutagenèse dirigée	44
3.2 Production de rétrovirus	53
3.3 Infection rétrovirale	53
3.4 Microscopie en contraste de phase	53
3.5 Essai de prolifération.....	53
3.6 Calcul du temps de doublement	54
3.7 Essai luciférase	55
RÉSULTATS	56
1. Modulation de la réponse inflammatoire intestinale par GATA-4	56
1.1 GATA-4 module de façon sélective l'activité des MAPK et d'Akt	56
1.1.1 GATA-4 n'affecte pas l'activité de Jnk et de p38.....	56
1.1.2 GATA-4 inhibe l'activité de p42/p44 et d'Akt.....	56
1.2 GATA-4 induit des changements dans la liaison à l'ADN et dans la nature des complexes protéiques des facteurs C/EBPs, AP-1 et NF- κ B	61
1.2.1 GATA-4 induit la formation de complexes C/EBPs de hauts poids moléculaires et diminue les isoformes C/EBP β et C/EBP δ à l'ADN	61
1.2.2 GATA-4 augmente la liaison à l'ADN de base des facteurs AP-1 et induit la formation de complexes protéiques de hauts poids moléculaires	61
1.2.3 GATA-4 augmente la liaison à l'ADN de NF- κ B en induisant p50 et p65 ainsi qu'un troisième facteur capable d'interagir avec p65 pour former des complexes de hauts poids moléculaires	66
1.3 GATA-4 module l'expression des ARNm de CCL5 et d'iNOS	66
2. Développement et validation des mutants de GATA-4.....	71
2.1 Surexpression des mutants de GATA-4	71
2.2 Liaison à l'ADN des mutants de GATA-4	71
2.3 Aspect microscopique des mutants de GATA-4	74
2.4 Temps de doublement des mutants de GATA-4	74
2.5 Activité transcriptionnelle de GATA-4 S105A et S261D.....	79
DISCUSSION ET CONCLUSIONS	83
1. GATA-4 module la réponse inflammatoire intestinale chez le rat	83
1.1 GATA-4 affecte de façon sélective la phosphorylation des MAPK et d'Akt	83
1.2 GATA-4 affecte C/EBP et AP-1.....	85
1.3 GATA-4 affecte NF- κ B	85
1.4 GATA-4 affecte l'expression des gènes pro-inflammatoires CCL5 et iNOS.....	86
1.5 Conclusions	87
2. Production et caractérisation des mutants de GATA-4.....	88
2.1 Expression protéique des mutants de GATA-4.....	88
2.2 Aspect microscopique et prolifération des mutants de GATA-4	89
2.3 Liaison à l'ADN et activité des mutants de GATA-4.....	90
2.4 Conclusions	91
3. Conclusion générale	91
REMERCIEMENTS	93
RÉFÉRENCES.....	95

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La barrière épithéliale.....	15
Figure 2 : Voies de signalisation de NF- κ B.....	20
Figure 3 : Cascade de signalisation des MAPK.....	24
Figure 4 : Les membres de la famille GATA.....	28
Figure 5 : Structure de GATA-4.....	34
Figure 6 : Schéma des mutants de GATA-4.....	45
Figure 7 : Mutagenèse selon la méthode Quick Change de Stratagene.....	48
Figure 8 : Mutagenèse selon la méthode « overlap extension ».....	50
Figure 9 : GATA-4 n'affecte pas l'activité de Jnk et de p38 dans les IEC-6 en condition inflammatoire.....	57
Figure 10 : GATA-4 inhibe l'activité de p42/p44 et d'Akt dans les IEC-6 en condition inflammatoire.....	59
Figure 11 : GATA-4 induit la formation de complexes C/EBPs de hauts poids moléculaires et diminue le recrutement des isoformes C/EBP β et C/EBP δ à l'ADN dans les IEC-6 en condition inflammatoire.....	62
Figure 12 : GATA-4 induit une augmentation de la liaison de base des facteurs AP-1 à l'ADN et induit la formation de complexes de hauts poids moléculaires dans les IEC-6 en condition inflammatoire.....	64
Figure 13 : GATA-4 augmente la liaison à l'ADN de NF- κ B en induisant p50 et p65 ainsi qu'un troisième facteur capable d'interagir avec p65 pour former des complexes de hauts poids moléculaires dans les IEC-6 en condition inflammatoire.....	67
Figure 14 : GATA-4 module l'expression des ARNm de CCL5 et d'iNOS.....	69
Figure 15 : Surexpression des mutants de GATA-4.....	72
Figure 16 : Liaison à l'ADN des mutants de GATA-4.....	75
Figure 17 : Aspect microscopique des mutants de GATA-4.....	77
Figure 18 : Activité des mutants de GATA-4.....	81

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Détails d'utilisation des anticorps pour les immunobuvardages de type Western	41
Tableau 2 : Séquence des amorces de PCR utilisées pour analyser l'expression de gènes de réponse inflammatoire.....	44
Tableau 3 : Programme utilisé lors des réactions de PCR pour l'observation de l'expression de gènes de réponse inflammatoire	44
Tableau 4 : Séquence des amorces utilisées pour la mutagenèse selon la méthode Quick Change de Stratagene	47
Tableau 5 : Séquence des amorces de PCR utilisées pour la mutagenèse par « overlap extension »	52
Tableau 6 : Temps de doublement des mutants de GATA-4	79

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc :	ADN complémentaire
AGP :	glycoprotéine α -acide
AII :	angiotensine II
α -MHC :	chaîne lourde alpha de myosine
AMP :	adénosine monophosphate
AMPC :	AMP cyclique
ANF :	facteur natriurétique auriculaire
ANP :	peptide natriurétique auriculaire
AP-1 :	activator protein-1
ASBT :	apical sodium dependent bile acid transporter
AT1R :	récepteur de type 1 de l'angiotensine
ATF :	activating transcription factor
ATM :	ataxia telangiectasia mutated
ASD :	communication inter-auriculaire
BAFF :	B cell-activating factor
BMP :	bone morphogenic protein
BNP :	peptide cerebral natriurétique
CD :	cellule dendritique
CD4 :	cluster of differentiation 4
CDX2 :	caudal type homeobox transcription factor 2
C/EBP :	CCAAT-enhancer binding protein
CHD :	cardiopathies congénitales
CK2 :	caséine kinase 2
COS-7 :	fibroblastes de singe vert africain transformés par SV40
CPS :	comptes par seconde
cTnI :	troponine cardiaque I
DMEM :	Dulbecco's modified Eagle medium
dCTP :	désoxycytidine triphosphate
DMSO :	dimethyl sulfoxide
dNTP :	désoxyribonucleotide triphosphate

DSE :	dôme subépithélial
DTT :	dithiothreitol
EDTA :	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS :	sérum de veau fœtal
FOG :	friend of GATA
FT :	facteur de transcription
GM-CSF :	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GSK-3 β :	glycogen synthase kinase-3 beta
HEK 293T :	cellules rénales humaines embryonnaires transformées
HEPES :	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HES :	hairy/enhancer of split
HNF :	facteur hépatique nucléaire
HRP :	horseradish peroxidase
IAP :	phosphatase alcaline intestinale
IEC-6 :	cellules épithéliales intestinales de cryptes de rat
I-FABP :	intestinal fatty acid-binding protein
IKK :	I κ B kinase
IL :	interleukine
IL-1RI :	récepteur à l'interleukine de type 1
ILBP :	ileal lipid binding protein
iNOS :	NOS inductible
IRF :	interferon regulatory factor
JAK :	Janus kinase
KGF :	facteur de croissance des kératinocytes
LEF :	lymphoid enhancer factor
L-FABP :	liver fatty acid-binding protein
LPH :	lactase-phlorizin hydrolase
LPS :	lipopolysaccharide
MAPK :	mitogen-activated protein kinase
MEF-2 :	myocyte enhancer factor-2
mTOR :	mammalian target of rapamycin
NaBu :	butyrate de sodium
NEMO :	NF- κ B essential modulator

NF- κ B :	nuclear factor-kappa B
NFATc4 :	nuclear factor of activated T-cells-c4
NK :	natural killer
NLR :	Nod-like receptor
NOD :	nucleotide-binding oligomerization domain
NOS :	NO (oxide nitrique) synthase
NP-40 :	nonyl phenoxy polyethoxy ethanol
PAGE :	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS :	phosphate-buffered saline
PCOS :	polycystic ovary syndrome
PCR :	réaction de polymérisation en chaîne
PDK :	phosphoinositide-dependent kinase
pdT-18 :	poly desoxythymidine-18
PI3K :	phosphoinositide 3-kinase
PKA :	protéine kinase A
PKC :	protéine kinase C
PMSF :	phenylmethylsulphonyl fluoride
PRR :	pattern recognition receptor
PVDF :	polyvinylidene fluoride
RANKL :	receptor activator of NF- κ B ligand
RHD :	rel homology domain
RIG-1 :	retinoic acid-inducible gene I
RLH :	RIG-I-like helicase
RPM :	rotations par minute
RT :	transcriptase inverse
SDS :	sodium dodecyl sulfate
SI :	sucrase isomaltase
SLN :	signal de localisation nucléaire
STAT :	signal transducers and activator of transcription
TBE :	tris/borate/EDTA
TBS :	tris-buffered saline
TBX5 :	T-box 5
TCF :	T cell factor

TCR :	récepteur des cellules T
TFF1 :	trefoil factor 1
TFG- β :	transforming growth factor-beta
TLR :	toll-like receptor
TNF :	facteur de nécrose tumorale
Tris :	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TWEAK :	TNF-related weak inducer of apoptosis
UV :	ultraviolet
V :	volt
Wnt :	wingless-type

LISTE DES COMMUNICATIONS

Communications orales :

Rémillard A. et Asselin C. 3 octobre 2008. *GATA-4 module la réponse inflammatoire des cellules épithéliales intestinales*. 50^e réunion annuelle du Club de recherche clinique du Québec (CRCQ), Hôtel Fairmount, Manoir Richelieu, La Malbaie, QC.

Communications par affiche :

Rémillard A., Deschênes C. et Asselin A. 24 mars 2009. *GATA-4 regulates the inflammatory response in intestinal epithelial cells*. 38^e Journée scientifique de la faculté de médecine et des sciences de la santé. Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada.

Rémillard A., Deschênes C. et Asselin A. 28 février 2009. *GATA-4 regulates the inflammatory response in intestinal epithelial cells*. Rencontre annuelle du Canadian Digestive Diseases Week (CDDW). Fairmont Banff Springs Hotel, Banff, AB, Canada.

Rémillard A. et Asselin C. 5 juin 2008. *Le rôle de GATA-4 dans la modulation de la réponse inflammatoire intestinale générée par des produits microbiens*. 7^e symposium de physiopathologie du tube digestif. Auberge Estrimont, Orford, QC, Canada.

LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION GATA-4 ET SON RÔLE DANS LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE INTESTINALE CHEZ LE RAT

Présenté par : Anthony Rémillard

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences, Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

RÉSUMÉ

GATA-4 est un facteur de transcription essentiel dans la formation du tube cardiaque primitif. Dans l'intestin, GATA-4 joue un rôle dans le développement et dans le maintien de l'identité jujéno-iléale. L'analyse par micropuce à ADN effectuée sur des cellules IEC-6 surexprimant GATA-4 suggère un rôle de GATA-4 dans la réponse inflammatoire et des études antérieures réalisées au laboratoire ont permis de confirmer l'implication de GATA-4 dans la modulation de la réponse inflammatoire C/EBP-dépendante. L'objectif de mon projet était de déterminer si GATA-4 module la réponse inflammatoire par d'autres mécanismes que ceux déjà découverts au laboratoire et de générer des mutants de GATA-4 pour caractériser l'implication de certains domaines et sites spécifiques de GATA-4 dans la modulation de la réponse inflammatoire intestinale.

Des cellules IEC-6 surexprimant GATA-4 ou des mutants de GATA-4 de façon stable, induites ou non à l'IL-1 β ont été utilisées comme modèle. L'activation des voies MAPK et Akt a été vérifiée par immunobuvardage de type Western. La liaison à l'ADN des facteurs de transcription AP-1, C/EBPs et NF- κ B a été vérifiée par gel de rétention. L'expression de certains gènes de réponse inflammatoire a été vérifiée par RT-PCR. Finalement, des lignées cellulaires exprimant des mutants de GATA-4 ont été partiellement caractérisées.

Mes résultats montrent qu'une surexpression de GATA-4 dans les IEC-6 traitées à l'IL-1 β réduit la phosphorylation de p42/p44 et d'Akt. Les facteurs de transcription AP-1, C/EBP et NF- κ B sont davantage recrutés à l'ADN. La nature de leurs complexes semble être également affectée. Cette induction de liaison coïncide avec une baisse d'expression des gènes pro-inflammatoires CCL5 et iNOS. La caractérisation des mutants de GATA-4 suggère que le premier doigt de zinc (216-240) pourrait moduler la morphologie cellulaire et que la région basique (294-336) pourrait contribuer à la vitesse de prolifération augmentée des cellules IEC-6 surexprimant GATA-4.

En somme, mes résultats suggèrent que GATA-4 pourrait participer à l'instauration d'une tolérance immunitaire prenant place lors de la différenciation entérocytaire.

Mots clés : GATA-4, épithélium intestinal, inflammation, NF- κ B, IL-1 β .

INTRODUCTION

1. La cellule épithéliale intestinale comme modèle d'étude

1.1 Le tractus gastro-intestinal

Le tractus gastro-intestinal est un regroupement d'organes qui assure l'ingestion de la nourriture, la digestion et l'absorption des nutriments contenus dans le bol alimentaire, puis l'excrétion des excédents sous forme de fèces. L'intestin grêle et le côlon assurent un rôle de digestion et d'absorption. Le côlon constitue la partie terminale de l'intestin. Il est composé du caecum, du colon ascendant, du côlon transverse, du côlon descendant et du côlon sigmoïde. Ses principaux rôles sont l'accumulation des fèces, l'absorption d'eau, le maintien de l'équilibre hydrique et l'absorption de certains nutriments, comme la vitamine K. L'intestin grêle, en amont du côlon, est composé du duodénum, du jéjunum, et de l'iléon. Ensemble, ils assurent la majeure partie de la fonction absorbante du tube digestif.

1.2 Anatomie et physiologie de l'intestin grêle

La paroi de l'intestin grêle se compose de deux couches musculaires circulaire et longitudinale assurant la motilité intestinale et le péristaltisme, d'une couche de tissu conjonctif assurant le maintien de la structure intestinale, et d'une couche de cellules épithéliales qui joue deux rôles primordiaux, soit absorber les nutriments et protéger le milieu interne des microorganismes contenus dans la lumière intestinale. Le duodénum est rattaché à l'estomac par le pylore. La progression du contenu gastrique vers le duodénum stimule la relâche des sucs pancréatiques contenant plusieurs enzymes digestives, telles que la trypsinogène et la chymotrypsinogène, les élastases et les carboxypeptidases, responsables de la digestion des nutriments. Le duodénum participe également au contrôle de la vitesse de vidange de l'estomac (BELL et MOSTAGHNI, 1975). Le jéjunum est replié dans l'abdomen et rattaché par le tissu conjonctif, ou mésentère lui conférant une bonne motilité. Son rôle est essentiellement d'absorber les nutriments et ce par divers moyens comme la diffusion, le transport passif ou actif. L'iléon joue également un rôle d'absorption. Les plaques de Peyer s'y retrouvent en grande quantité. Elles constituent des régions où l'épithélium intestinal est moins étanche vis-à-vis du contenu de la lumière intestinale et sous lesquelles se retrouvent des regroupements de tissus lymphoïdes et de

cellules lymphocytaires immatures. Ces structures permettent un contact plus fréquent entre les antigènes de la lumière intestinale et les précurseurs lymphocytaires, favorisant ainsi leur maturation (ARTIS, 2008). La paroi interne de l'intestin grêle est organisée sous forme de cryptes et de villosités. De plus, le côté apical des cellules épithéliales intestinales est composé de microvillosités. La présence de villosités et microvillosités augmente de 500 fois la surface de contact entre les cellules épithéliales et le bol alimentaire, maximisant ainsi l'efficacité d'absorption.

1.3 La cellule épithéliale intestinale

Les cellules épithéliales intestinales tapissent l'intérieur de l'intestin et sont en contact avec le contenu de la lumière intestinale. Les cellules souches, situées à la base des cryptes intestinales, assurent à tous les quatre ou cinq jours le renouvellement de l'épithélium intestinal (VAN DER FLIER et CLEVERS, 2009). Le maintien de l'équilibre entre la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales intestinales s'effectue entre autre grâce à l'activation régulée des voies Wnt/ β -caténine/TCF/LEF (voie pro-prolifération) et BMP/Smads (voie pro-différenciation) (VAN DER FLIER et CLEVERS, 2009). Quatre types cellulaires différenciés composent l'épithélium intestinal. Les cellules de Paneth, retrouvées à la base des cryptes, jouent un rôle dans la défense antimicrobienne. Les cellules à mucus sont responsables de la production et de la sécrétion du mucus recouvrant la surface interne de l'intestin. Les cellules entéroendocrines synthétisent et sécrètent des hormones telles que la sérotonine, la somatostatine et la cholécystokinine. Finalement, les cellules absorbantes, constituant la majorité de l'épithélium, assurent l'absorption des nutriments. La voie de signalisation Notch joue un rôle important dans l'établissement de la destinée cellulaire des cellules épithéliales. Son activation conduit à l'expression du facteur de transcription Hes1 qui à son tour réprime l'expression du facteur de transcription Math1 (JENSEN *et al.*, 2000). Des souris Hes1^{-/-} meurent à l'état embryonnaire, mais leurs intestins montrent un nombre accru de cellules de Paneth, de cellules entéroendocrines et de cellules à mucus au détriment du nombre de cellules entérocytaires, suggérant que l'activité Math1 favorise l'apparition de cellules sécrétrices au détriment de cellules absorbantes (SUZUKI *et al.*, 2005 ; JENSEN *et al.*, 2000). Au contraire, des souris mutantes pour Math1 possèdent un épithélium uniquement constitué d'entérocytes (YANG *et al.*, 2001).

2. L'inflammation intestinale

2.1 La flore microbienne normale

Cent trillions (10^{14}) de bactéries de plus de 500 souches différentes résident dans l'intestin humain adulte, soit environ dix fois plus que le nombre total de cellules eucaryotes qui composent l'organisme humain entier (GUARNER et MALAGELADA, 2003 ; SEARS, 2005). Ces bactéries colonisent l'intestin en nombre croissant le long de l'axe proximo-distal, atteignant sa plus grande densité dans le côlon (de 10^{11} à 10^{12} bactéries par gramme de contenu luminal) (GUARNER et MALAGELADA, 2003). L'incroyable complexité de cette flore demeure encore aujourd'hui très mal comprise. Bien qu'il soit possible de survivre sans flore intestinale (STEINHOFF, 2005), les bénéfices apportés par sa présence sont bien connus : stimulation du système immunitaire et instauration de la tolérance, protection contre les bris épithéliaux, régulation de l'absorption des nutriments et compétition avec les bactéries étrangères. L'homéostasie intestinale est contrôlée par d'innombrables facteurs. De plus, elle est constamment mise à l'épreuve par la présence de microorganismes, pathogènes ou non, présents dans la lumière intestinale. La régulation de la réponse inflammatoire intestinale est donc essentielle afin de permettre à l'épithélium d'assurer en permanence ses deux rôles : absorber les nutriments et protéger l'organisme contre le contenu du bol alimentaire.

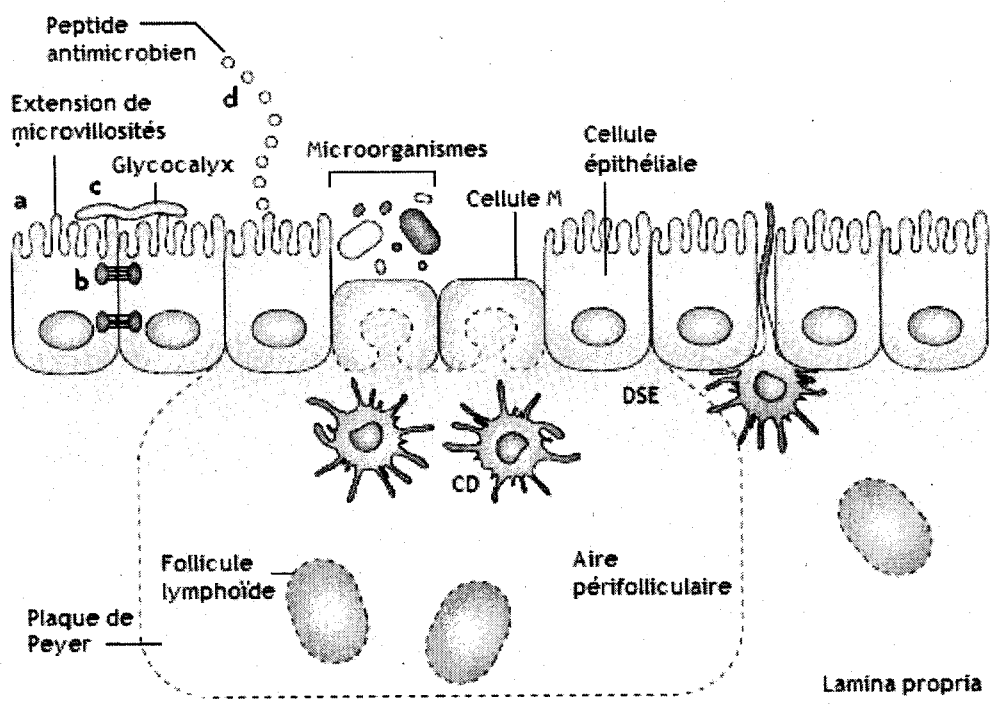
2.2 La réponse inflammatoire

L'inflammation est un processus important et nécessaire au bon maintien de l'intégrité des tissus. Plusieurs stimuli peuvent enclencher une réponse inflammatoire : un choc osmotique ou thermique, la détection de microorganismes ou encore une exposition aux rayons UV. Dans le cas de l'épithélium intestinal, la réponse inflammatoire est le plus souvent induite par la détection de certains microorganismes dans la lumière intestinale, un événement qui survient régulièrement malgré les nombreux dispositifs utilisés par l'épithélium pour contrer l'infection (Figure 1). Ces microorganismes sont tout d'abord détectés via les « pattern recognition receptors » (PRRs) regroupant les « toll-like receptors » (TLRs), la Dectine-1, les membres de la famille « nucleotide-binding oligomerization domain/containing (Nod)-like receptor » (NLR), Nod1 et Nod2, ainsi que les membres de la famille « retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like helicases » (RLHs) (PALM et MEDZHITOV, 2009). Ces récepteurs peuvent lier des patrons moléculaires

Figure 1 : La barrière épithéliale

Afin d'assurer son rôle de barrière, l'épithélium utilise différents moyens physiques et biologiques tels que la présence d'extensions de microvillosités riches en actine (a) et de jonctions serrées du côté apical (b), la synthèse et sécrétion de sucres composant le glycocalyx à la surface des cellules (c) et la production de différents peptides antimicrobiens (d). Les cellules M spécialisées disposées au-dessus des plaques de Peyer permettent une interaction contrôlée entre les antigènes présents dans la lumière intestinale et les tissus lymphoïdes retrouvés dans les plaques de Peyer, afin de maintenir une certaine activation de base du système immunitaire.

Adapté de ARTIS, 2008.



conservés et uniques aux microorganismes, comme des sucres ou des protéines des parois bactériennes, les lipopolysaccharides (LPS), la flagelline ou encore l'ARN double brin (ESSAKALLI *et al.*, 2009 ; TURVEY et HAWN, 2006 ; HARRIS *et al.*, 2006). La détection de tels ligands conduit à l'activation de différentes voies de signalisation comme la voie du « nuclear-factor-kappa B » (NF- κ B), la voie des « mitogen-activated protein kinases » (MAPK) et la voie des « interferon regulatory factors » (IRFs) (ESSAKALLI *et al.*, 2009). L'expression de différents gènes cibles, principalement des chimiokines (CCL5, CXCL10, CXCL2, CCL2), cytokines (IL-1, IL-6, IL-12, TNF α), corécepteurs (CD80, CD83) et autres molécules pro-inflammatoires (iNOS), est alors induite (ESSAKALLI *et al.*, 2009). Les cytokines et chimiokines sécrétées induisent le recrutement et l'activation de monocytes, macrophages et phagocytes au site d'inflammation. Au cours du processus de différenciation entérocytaire, les cellules épithéliales intestinales migrent de la crypte vers les villosités. Ce faisant, elles sont davantage exposées au contenu de la lumière intestinale. Pour éviter l'instauration d'une réponse inflammatoire persistante, un processus de tolérance est enclenchée en même temps que la différenciation et au cours de laquelle différents événements sont observés. Par exemple, les récepteurs TLR-2 et TLR-4 exprimés à la membrane du côté apical par les cellules indifférenciées de la crypte, sont relocalisés dans l'appareil de Golgi ou du côté basolatéral afin de limiter leur exposition au contenu luminal (HORNEF *et al.*, 2003). L'expression de Tollip, une protéine inhibitrice de la voie de signalisation des TLRs est également augmentée au cours de la différenciation entérocytaire (HARRIS *et al.*, 2006). Une coordination d'action entre le système immunitaire inné et adaptatif s'effectue tout au long du processus inflammatoire. L'arrêt de la réponse est induite en partie par l'absence de stimuli, mais surtout grâce à l'induction de signaux cellulaires spécifiques et à l'expression de médiateurs anti-inflammatoires lipidiques telles les résolvines et protectines, dérivant de l'oméga-3 et -6, ainsi que les lipoxines, dérivées de l'acide arachidonique. Ces molécules peuvent accomplir plusieurs actions anti-inflammatoires telles que la réduction du recrutement de leucocytes, de l'expression de cytokines et de la synthèse de dérivés réactifs de l'oxygène. (ARIEL et SERHAN, 2007 ; WEYLANDT *et al.*, 2007). Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la maladie de Crohn et la colite/ulcéreuse surviennent lorsque la réponse inflammatoire intestinale est activée de façon chronique. Ces maladies sont d'origines génétique, immunitaire et environnementale. Leur histopathologie demeure encore mal comprise.

2.3 La voie IL-1 β

L'IL-1 β est une cytokine produite par plusieurs types cellulaires en réponse à différents stimuli. Cette cytokine est impliquée dans la perception de la douleur, dans l'induction et l'orchestration de la réponse inflammatoire et joue également un rôle dans les réactions auto-immunitaires (REN et TORRES, 2009). L'IL-1 α et l'IL-1 β lient le récepteur de l'interleukine de type 1 (IL-1RI), ce qui provoque le recrutement de l'« IL-1 receptor accessory protein » (IL-1RAcP), un co-récepteur important pour la transduction de signal. Différentes protéines adaptatrices telles que MyD88 et Tollip sont ensuite recrutées à la membrane. Les kinases de la famille des IRAKs dont IRAK-1, IRAK-2, IRAK-M et IRAK-4 sont ensuite activées. IRAK-1 phosphorylée se lie à TRAF6 et ensemble, se détachent du complexe membranaire pour induire la phosphorylation et l'activation du complexe TAK1/TAB1/TAB2 au cytosol (BRIKOS *et al.*, 2007). Ce dernier mène ultimement à l'activation du facteur de transcription NF- κ B, ainsi que des MAPK p38, Jnk et p42/p44, engendrant la transcription ou la répression de plusieurs gènes cibles (BRIKOS *et al.*, 2007). Les différents acteurs de la réponse inflammatoire étudiés lors de mon projet de maîtrise sont détaillés dans les sections suivantes.

2.4 NF- κ B

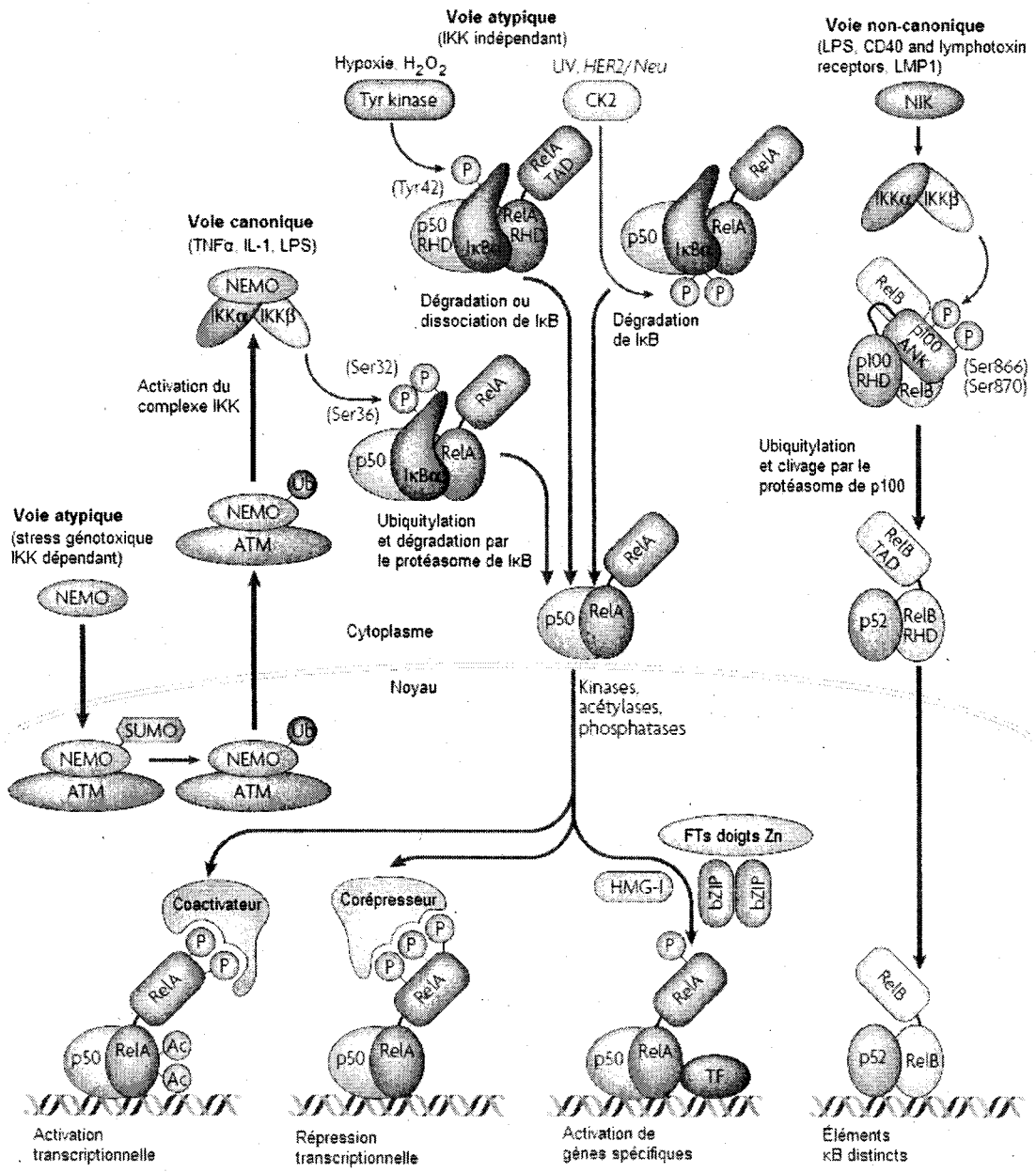
Le facteur de transcription NF- κ B a été découvert en 1986 comme étant une protéine capable de lier le site κ B, une séquence de 11 paires de bases retrouvée au promoteur des chaînes légères d'immunoglobulines des lymphocytes B (SINGH *et al.*, 1986 ; TERGAONKAR, 2006). Depuis ce temps, les recherches sur NF- κ B ont considérablement augmenté, sachant maintenant que ce facteur est primordial dans le contrôle de l'immunité innée et adaptative, dans le développement et la différenciation de plusieurs types cellulaires (lymphocytes T et B, cellules NK, etc...), dans la maturation des tissus lymphoïdes, dans la survie cellulaire et dans l'apoptose, le tout dépendant du type cellulaire, du contexte dans lequel il est exprimé et du mode de régulation qui lui est associé (VALLABHAPURAPU et KARIN, 2009 ; SHEN et TERGAONKAR, 2009). La famille NF- κ B compte cinq membres : RelA (aussi appelé p65), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50 et son précurseur p105) et NF- κ B2 (p52 et son précurseur p100). Tous les membres de la famille ont en commun la présence d'un « Rel homology domain » (RHD) en N-terminal, important pour l'homo- ou l'hétérodimérisation, pour la liaison à l'ADN et pour

l'association aux membres de la famille IκBs. RelA, c-Rel et RelB possèdent un domaine de transactivation (TAD) en C-terminal, comparativement à p50 et p52 (HAYDEN et GHOSH, 2008). En absence de stimulus, les dimères NF-κB sont liés aux protéines inhibitrices IκBs. IκBα, lorsque lié à l'hétérodimère RelA/p50, bloque le signal de localisation nucléaire (SLN) de RelA, mais pas celui de p50. Le complexe trimérique est alors soumis à un trafic constant entre le noyau et le cytosol, mais la majorité des protéines se retrouvent au cytosol, compte tenu de la présence d'un signal d'export nucléaire (NES) puissant sur IκBα (HUANG *et al.*, 2000 ; JOHNSON *et al.*, 1999). Différentes voies de signalisation de NF-κB ont été décrites (Figure 2). La voie canonique est la plus documentée et survient suite à une stimulation par la majorité des stimuli connus comme par exemple IL-1, TNF-α ou LPS. Cette voie passe par l'activation du complexe trimérique « IκB kinase » (IKK) formé des deux sérine-thréonine kinases IKKα et IKKβ, et de la protéine non-enzymatique IKKγ, aussi appelée « NF-κB essential modulator » (NEMO). IKKα et IKKβ activées phosphorylent les IκBs, ce qui entraîne leur ubiquitylation et leur dégradation par le protéasome, permettant ainsi la libération des dimères NF-κB et leur translocation au noyau. La voie canonique fait surtout intervenir les hétérodimères RelA/p50 et c-Rel/p50 et est principalement impliquée dans la réponse immunitaire innée et la suppression de l'apoptose (VALLABHAPURAPU et KARIN, 2009 ; SHEN et TERGAONKAR, 2009). La voie non-canonique est activée en réponse à certains membres de la famille du TNF tels que CD40L, « B cell-activating factor » (BAFF), « receptor activator of NF-κB ligand » (RANKL) et « TNF-related weak inducer of apoptosis » (TWEAK). Cette voie est caractérisée par le clivage du précurseur p100 et fait intervenir l'hétérodimère RelB/p52 (VALLABHAPURAPU et KARIN, 2009). Elle est principalement impliquée dans la réponse immunitaire et dans le développement des organes lymphoïdes secondaires (SHEN et TERGAONKAR, 2009). Des voies atypiques ont également été documentées. Un stress génotoxique induit la translocation de NEMO au noyau où il est sumoylé puis ubiquitylé, un processus dépendant de la kinase « ataxia telangiectasia mutated » (ATM). Le complexe NEMO/ATM retourne ensuite au noyau et active IKKβ (PERKINS, 2007). La voie atypique IKK-indépendante implique l'activation de la caséine kinase 2 (CK2) et des voies dépendantes de tyrosines kinases pouvant phosphoryler directement IκBα et libérer les complexes NF-κB (PERKINS, 2007). Différentes modifications post-traductionnelles, incluant la phosphorylation et l'acétylation, peuvent moduler la liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle de NF-κB

Figure 2 : Voies de signalisation de NF- κ B

La voie canonique fait intervenir le complexe protéique IKK, la phosphorylation et la dégradation d'I κ B puis la translocation du dimère NF- κ B au noyau. La voie non-canonique fait intervenir le complexe NIK, activant les sous-unités IKK α et IKK β qui conduisent au clivage de p100 puis à la formation du dimère NF- κ B RelB/p52. La voie atypique activée par des stress génotoxiques est caractérisée par la translocation d'IKK γ (NEMO) au noyau où il se lie à son partenaire ATM. IKK γ est alors sumoylé, ubiquitylé puis renvoyé au cytosol pour activer le complexe IKK. La voie atypique IKK-indépendante fait intervenir certaines tyrosine kinases (stress hypoxique) ou la caséine kinase 2 (CK2) (stress, UV, HER2/Neu) pouvant phosphoryler directement I κ B α et libérer le dimère NF- κ B.

Adapté de PERKINS, 2007.



(VALLABHAPURAPU et KARIN, 2009). Une activation déficiente de la voie de signalisation de NF- κ B peut conduire au cancer, au diabète et à l'athérosclérose (VALLABHAPURAPU et KARIN, 2009).

2.5 AP-1

« Activator protein-1 » (AP-1) constitue un terme général désignant un facteur de transcription dimérique constitué de deux sous-unités appartenant aux familles Jun (c-jun, junB, junD), Fos (c-fos, fra-1, fra-2) et « activating transcription factor » (ATF) (KARIN *et al.*, 1997 ; VESELY *et al.*, 2009). AP-1 est un facteur de transcription de type « basic leucine zipper » (bZIP) capable d'interagir avec d'autres familles de facteur de transcription et est régulé par plusieurs kinases en amont, faisant de lui un effecteur de plusieurs voies de signalisation impliqué dans une multitude de processus cellulaires dont la prolifération, la différenciation, la survie, l'apoptose, la réponse inflammatoire et la migration cellulaire (VESELY *et al.*, 2009 ; MORIYAMA *et al.*, 2008). AP-1 peut être induit en réponse à plusieurs stimuli différents dont des interleukines et des facteurs de croissance. Une induction à l'IL-1 β conduit à l'activation de la MAP kinase kinase 4 (MKK4), ce qui active la MAPK Jnk qui à son tour active AP-1 (MORIYAMA *et al.*, 2008). Le facteur AP-1 lie une séquence consensus au promoteur de ses gènes cibles pour les transactiver ou les réprimer, dépendamment de la nature des deux sous-unités assemblées et de l'environnement cellulaire (VESELY *et al.*, 2009).

2.6 C/EBPs

Les C/EBPs sont exprimés dans une variété de tissus où ils participent à plusieurs processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose (RAMJI et FOKA, 2002). Ils sont exprimés dans l'épithélium intestinal où ils régulent l'expression de gènes pro-inflammatoires comme l'haptoglobine (BOUDREAU *et al.*, 1998 ; PELLETIER *et al.*, 1998 ; GHEORGHIU *et al.*, 2001) Cette famille de facteurs de transcription compte en tout six membres, C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP ϵ , C/EBP γ et C/EBP ζ , nommés en fonction de la chronologie de leur découverte. Ils lient la séquence CCAAT présente au promoteur de leurs gènes cibles (RAMJI et FOKA, 2002). Certaines isoformes des C/EBPs sont exprimées sous diverses formes. C/EBP α existe sous les formes p30 et p42, C/EBP β , sous les formes LAP, LAP* et LIP, ce dernier étant un dominant négatif de C/EBP β . Ces dérivés sont générés par l'existence de codons

d'initiation distincts (RAMJI et FOKA, 2002). Pour leur part, les formes p32, p30, p27 et p14 de C/EBP ϵ sont produits par épissage alternatif (RAMJI et FOKA, 2002). La structure des C/EBPs est conservée à environ 90% entre les différents membres. Elle est constituée d'une région « basic leucine zipper » (bZIP). La région basique est importante pour la liaison à l'ADN tandis que la région leucine zipper est importante pour la dimérisation. Des domaines d'activation et de régulation sont également présents en portion N-terminale, conférant des caractéristiques transcriptionnelles propres à chaque isoforme. Les différents membres C/EBPs peuvent former des homo- ou hétérodimères entre eux. Ils peuvent aussi interagir avec d'autres familles de facteurs de transcription comme CREB/ATF et NF- κ B, modulant ainsi leur liaison à l'ADN et leur pouvoir transcriptionnel (SCHREM *et al.*, 2004). L'activité des C/EBPs est contrôlée par interactions protéiques et par modifications post-traductionnelles (RAMJI et FOKA, 2002). La phosphorylation des C/EBPs par différentes kinases telles que la « glycogène synthase kinase 3 » (GSK-3), les MAPK, la PKC, la PKA ou la kinase Ca²⁺/calmoduline dépendante, engendre une activation ou une répression de l'activité transcriptionnelle des C/EBPs (ROSS *et al.*, 1999 ; ROSS *et al.*, 2004 ; WEGNER *et al.*, 1992 ; NAKAJIMA *et al.*, 1993 ; TRAUTWEIN *et al.*, 1993 ; ZHU *et al.*, 2002).

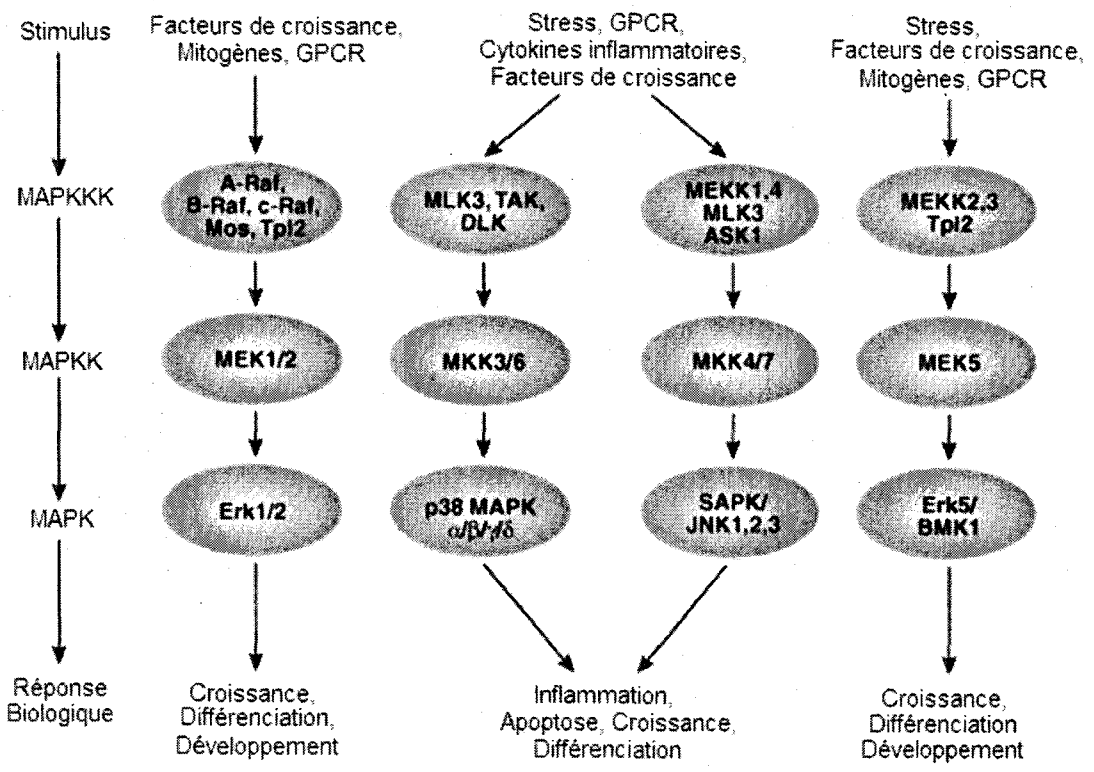
2.7 MAPK

Les MAPK (Erk1/2, p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$, SAPK/Junk1/2/3, Erk5) sont des sérine/thréonine kinases activées par phosphorylation par les « MAPK kinases » (MAPKK) qui elles sont activées par phosphorylation par les « MAPKK kinases » (MAPKKK) (Figure 3). La signalisation des MAPK est activée en réponse à d'innombrables stimuli : mitogènes, facteurs de croissances, cytokines, « G protein coupled receptor » (GPCR), stress osmotiques, thermiques, UV, etc., pour ensuite transmettre le signal par phosphorylation vers plusieurs substrats différents : Tau, STMN1, MNK1/2, Elk1, NFAT-2, NFAT-4, c-Jun, ATF2, p53, Sap1a, Gadd153, Max, Mef2c, Nur77, et plusieurs autres, dont GATA-4. Les MAPK p38 et Jnk sont activées en réponse à différents types de stimuli inflammatoires tels que l'IL-1 β . Pour sa part, p42/p44 est davantage connu pour son rôle dans la prolifération cellulaire (JOHNSON et LAPADAT, 2002) mais peut également être impliquée dans la réponse inflammatoire (IMBE *et al.*, 2008 ; VERHAEGHE *et al.*, 2007 ; IMBE *et al.*, 2005). Règle générale, l'activation de la voie p42/p44 coïncide avec un état pro-inflammatoire (CHAUDHARY *et al.*, 2009 ; CHEUNG *et al.*, 2008). Chez l'humain, une stimulation de

Figure 3 : Cascade de signalisation des MAPK

Les MAPKKKs sont activées par un stimulus en amont et phosphorylent puis activent les MAPKKs qui à leur tour phosphorylent puis activent les MAPK. Erk1/2 et Erk5 sont principalement impliqués dans la prolifération cellulaire, p38 et Jnk sont davantage impliquées dans la réponse aux différents types de stress et à la réponse inflammatoire.

Adapté de la figure originale sur www.cellsignal.com.



l'épithélium bronchique par la flagelline induit l'activation de la voie p42/p44, ce qui provoque une sécrétion accrue d'IL-8 (SHINKAI *et al.*, 2007). Les MAPK sont souvent considérées comme un important point de contrôle de la signalisation intracellulaire représentant un « carrefour » de signalisation. Compte tenu de leurs nombreux substrats, les MAPK sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires dont la prolifération, la différenciation, l'apoptose, l'inflammation et le développement.

2.8 Akt

Akt, aussi appelé PKB, est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la survie cellulaire. Trois isoformes d'Akt ont été répertoriées. Les isoformes 1 et 2 sont exprimées de façon ubiquitaire et accomplissent la majeure partie des rôles anti- apoptotiques connus d'Akt. (TOKUNAGA *et al.*, 2008). Akt-3 quant à lui, joue un rôle dans la biogenèse mitochondriale (WRIGHT *et al.*, 2008). La « phosphoinositide 3-kinase » (PI3K) phosphoryle le PIP2, un lipide présent dans la membrane plasmique, et génère le PIP3. Les « phosphoinositide-dependent kinases » (PDK)-1 et-2 sont ensuite recrutées à la membrane puis phosphorylent et activent Akt. pAkt phosphoryle ensuite différents substrats dans le cytoplasme dont MDM2, p21, p27, GSK-3 β , Ask1, Raf1, TSC1/2, Bad, et autres. L'essentiel du rôle d'Akt est de prévenir l'apoptose et de promouvoir la survie cellulaire (ASSINDER *et al.*, 2009). Akt peut également intervenir dans l'inflammation (KIDD *et al.*, 2008 ; ZHANG *et al.*, 2007 ; SCHABBAUER *et al.*, 2004). Une activation de la voie PI3-K/Akt par l'insuline conduit à une diminution de la réponse inflammatoire LPS-dépendante chez la souris (KIDD *et al.*, 2008 ; SCHABBAUER *et al.*, 2004) et une augmentation de la voie Akt contribue à diminuer l'inflammation résultant d'une ischémie hypoxique au cerveau (YIN *et al.*, 2007).

3. Le facteur de transcription GATA-4

3.1 La famille des facteurs de transcription GATA

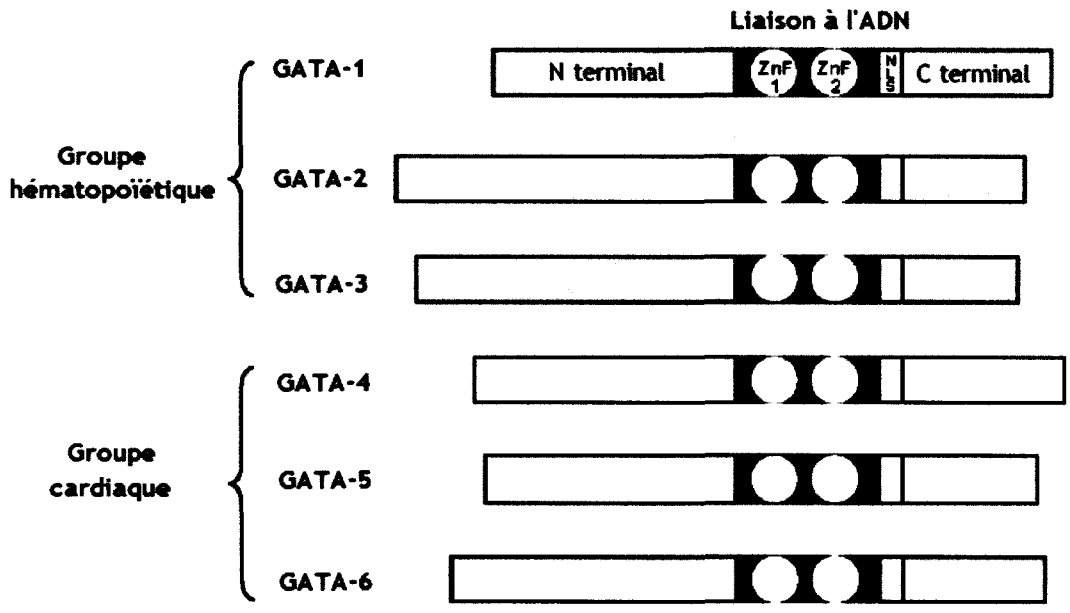
La famille GATA est composée de six membres. Tous possèdent deux doigts de zinc liant l'ADN sur le site consensus (A/T)GATA(A/G), mais aussi interagissant avec plusieurs cofacteurs protéiques pouvant réguler leur liaison à l'ADN et leur activité transcriptionnelle. Tous les membres GATA sont nucléaires en raison de leur site de

localisation nucléaire (SLN) situé en C-terminal. Les six membres GATA sont classés en deux sous-familles (Figure 4). GATA-1, -2 et -3 font partie de la sous-famille hématopoïétique. Ils sont exprimés dans les cellules souches hématopoïétiques et sont impliqués dans leur maturation et leur différenciation terminale. GATA-1 est exprimé dans les cellules érythroïdes, les mégacaryocytes, mastocytes et éosinophiles. Des mutations dans GATA-1 ont été associées à certaines pathologies, telles que la thrombocytopénie, le syndrome de Down et les leucémies aiguës (NICHOLS *et al.*, 2000 ; HARIGAE, 2006) GATA-2 est exprimé dans les cellules progénitrices et les cellules souches hématopoïétiques à des stades précoces (HARIGAE, 2006). GATA-2 est aussi impliqué dans la différenciation terminale des cellules gonadotropes et thyroïdotropes (VIGER *et al.*, 2008). Aucune mutation de GATA-2 n'a été associée à des pathologies, mais des niveaux réduits d'ARNm et de protéines ont été observés chez des patients atteints d'insuffisance médullaire (FUJIMAKI *et al.*, 2001). GATA-3 est exprimé dans les lymphocytes CD4⁺ et joue un rôle majeur dans leur différenciation et dans l'expression des sous-unités des récepteurs des cellules T (TCR) (BARNES, 2008). GATA-3 est aussi en partie responsable de l'induction de cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 par certaines cellules immunitaires, participant ainsi à la modulation de la réponse allergique et inflammatoire. L'IL-5 joue un rôle important dans la maturation des éosinophiles (BARNES, 2008). GATA-3 est muté dans certains cas d'hypoparathyroïdie (CHIU *et al.*, 2006) et des niveaux d'expression élevés de GATA-3 en association avec une élévation de l'ARNm d'IL-5 ont été observés dans les voies respiratoires de patients asthmatiques (NAKAMURA *et al.*, 1999). Les membres GATA-4, -5 et -6 sont exprimés dans différents tissus dérivés de l'endoderme et du mésoderme où ils y jouent des rôles primordiaux dans la régulation de l'expression de gènes tissu-spécifiques (MOLKENTIN, 2000). GATA-5 est exprimé au niveau du cœur où il peut lier et activer certains gènes cardiospécifiques (NEMER *et al.*, 1999). Dans le tractus gastro-intestinal, GATA-5 est détecté presque exclusivement dans les cellules différenciées de la villosité. GATA-5, tout comme GATA-4 et GATA-6, peut induire l'expression du gène « intestinal fatty acid-binding protein » (I-FABP), un marqueur de différenciation intestinale (VAN WERING *et al.*, 2002). Dans des cellules COS-7 transfectées, GATA-5 peut interagir physiquement avec HNF1 α et contrôler l'expression du gène de la lactase-phlorizin hydrolase (Lph) (VAN WERING *et al.*, 2002). L'ARNm de GATA-5 est significativement augmenté dans des cellules de cancer colorectal HT-29 traitées pendant deux heures au butyrate de

Figure 4 : Les membres de la famille GATA

Les membres GATA-1, -2 et -3 font partie du groupe hématopoïétique et les membres GATA-4, -5 et -6 font partie du groupe cardiaque. Chaque membre de la famille possède 2 doigts de zinc leur permettant de lier l'ADN, mais également différents cofacteurs protéiques. Tous les membres GATA sont nucléaires en raison de la présence d'un SLN en C-terminal.

Adapté de VIGER *et al.*, 2004.



sodium (NaBu) dans le but de stimuler leur différenciation (GAO *et al.*, 1998). Les auteurs de cette étude associent les messagers de GATA-4 et -5 à un état différencié et celui de GATA-6 à un état indifférencié puisque ce dernier est prédominant dans les cellules progénitrices situées dans les cryptes (GAO *et al.*, 1998). Finalement, GATA-6 est exprimé dans les testicules (KETOLA *et al.*, 2003) et dans les ovaires (LAITINEN *et al.*, 2000). GATA-6 et GATA-4 sont exprimés au niveau du myocarde où les deux remplissent des fonctions distinctes, alors que GATA-5 est exprimé au niveau de l'endocarde uniquement (CHARRON et NEMER, 1999). Dans le système gastro-intestinal humain, GATA-6 est exprimé tout le long de l'axe proximo-distal avec une présence davantage cryptale dans l'intestin distal (HAVERI *et al.*, 2008). L'ARNm de GATA-6 possède une demi-vie plus longue dans des cellules ovariennes atteintes du syndrome d'ovaire polycystique (PCOS theca) comparativement aux cellules contrôles sans syndrome (theca), mais aucune mutation n'y est associée (HO *et al.*, 2005). La perte de GATA-6 conduit à une augmentation de la prolifération et de la transformation des astrocytes de souris, ce qui lui confère une fonction de suppresseur de tumeur (KAMNASARAN *et al.*, 2007). Il existe une certaine redondance entre les différents membres de la famille GATA, mais aucun membre ne remplace totalement un autre. Par exemple, chez le poisson zèbre, GATA-4 et GATA-6 ont des rôles distincts lors du développement cardiaque et du développement hépatique secondaire, mais leurs rôles semblent être redondants lors de la morphogenèse hépatique initiale (HOLTZINGER et EVANS, 2005).

3.2 Expression de GATA-4

GATA-4 a été découvert chez la souris en 1993 (ARCECI *et al.*, 1993) et chez le xénope (KELLEY *et al.*, 1993). Ce facteur a été associé à la famille de facteurs de transcription GATA, dont seulement trois membres avaient été caractérisés à l'époque : GATA-1, -2 et -3. Cette association a été faite par homologie de séquence, notamment par la présence des deux doigts de zinc hautement conservés situés en milieu de séquence chez les membres GATA. GATA-4 a été dès lors considéré comme un des marqueurs les plus précoces de la cardiogenèse (KELLEY *et al.*, 1993). Chez le xénope, l'ARNm de GATA-4 est détecté très tôt pendant le développement au niveau des ventricules et des oreillettes, et plus tard dans les vaisseaux sanguins principaux (KELLEY *et al.*, 1993). Chez le xénope adulte, l'ARNm de GATA-4 est détecté au niveau du cœur, du système gastro-

intestinal entre autre dans l'épithélium gastrique, dans les gonades, ainsi que dans d'autres tissus dérivés de l'endoderme (KELLEY *et al.*, 1993). En 2005, une étude portant sur un modèle de poisson zèbre invalidé pour GATA-4 démontre un retard de formation pour l'intestin, le foie, le pancréas et la vessie (HOLTZINGER et EVANS, 2005). Chez la souris, l'ARNm de GATA-4 est détecté au cœur au jour embryonnaire E6,5. Des buvardages du type Northern ont permis de déceler la présence de l'ARNm de GATA-4 dans le cœur, l'épithélium intestinal, les gonades et l'endoderme primitif (ARCECI *et al.*, 1993). Chez la souris, tout comme chez l'humain, GATA-4 est exprimé au noyau des cellules épithéliales dans l'intestin proximal et est indétectable au niveau de l'iléon distal et du côlon (BOSSE *et al.*, 2006). GATA-4 est fortement exprimé dans les entérocytes différenciés de la villosité et de plus en plus d'études confirment un certain niveau d'expression dans la crypte intestinale. (BOSSE *et al.*, 2006 ; DIVINE *et al.*, 2004 ; VAN WERING *et al.*, 2004).

3.3 Fonctions de GATA-4

GATA-4 est davantage étudié pour son rôle crucial dans la cardiogenèse. Il participe au processus d'hypertrophie cardiaque (SAADANE *et al.*, 1999) ainsi qu'au contrôle de la survie et de l'apoptose des cardiomyocytes (SUZUKI *et al.*, 2004). GATA-4 module l'expression de plusieurs gènes cardiaques importants, tels que la chaîne lourde alpha de myosine (α -MHC) (MOLKENTIN *et al.*, 1994), le peptide natriurétique auriculaire (ANP) aussi appelé facteur natriurétique auriculaire (ANF) (KESSLER-ICEKSON *et al.*, 2002), le peptide cérébral natriurétique (BNP) (CHARRON et NEMER, 1999), la troponine cardiaque I (cTnI) (MURPHY *et al.*, 1997 ; DI LISI *et al.*, 1998) ainsi que la sous-unité alpha 1C du canal calcique voltage-dépendant de type L ($Ca_v1.2$) (WANG *et al.*, 2007). Une délétion de GATA-4 chez la souris entraîne une létalité embryonnaire entre les jours E7.5 et E10.5 causée par une absence de migration des deux primordia promyocardiques latéraux formant le tube cardiaque primitif et par une mauvaise formation du tractus gastro-intestinal antérieur primitif s'étendant du dernier tiers de l'œsophage jusqu'au duodénum (MOLKENTIN *et al.*, 1997 ; NARITA *et al.*, 1997). De plus, les embryons se développent partiellement à l'extérieur de la vésicule vitelline (MOLKENTIN *et al.*, 1997). Chez l'humain, plusieurs mutations de GATA-4 ont été associées à diverses formes de cardiopathies congénitales (CHD). Parmi celles-ci, la communication inter-auriculaire (ASD) est l'une des plus fréquentes et est causée par une

délétion de la base cytidine 1074 dans la séquence codante d'ARNm de GATA-4, causant un changement du cadre de lecture et entraînant l'apparition d'un codon stop en position 403, la protéine sauvage ayant 442 résidus aminés (OKUBO *et al.*, 2004). Dans des cellules souches embryonnaires P19, une invalidation de GATA-4 mène à l'arrêt du processus de différenciation au stade de cardioblastes puis à l'induction de l'apoptose (GRÉPIN *et al.*, 1997). Au contraire, une surexpression de GATA-4 dans les P19 conduit à une différenciation accrue et à une augmentation de près de dix fois du nombre de cardiomyocytes différenciés (GRÉPIN *et al.*, 1997). Dans l'épithélium intestinal, GATA-4 module certains gènes spécifiques comme I-FABP (GAO X. *et al.*, 1998) et la mucine 2 (MUC2) (VAN DER SLUIS *et al.*, 2004). GATA-4 module plusieurs gènes en agissant de concert avec d'autres facteurs de transcription retrouvés dans l'épithélium intestinal. GATA-4 interagit avec Cdx2 et HNF-1 α afin de moduler l'expression de la sucrase isomaltase (SI), une protéine de la bordure en brosse (BOUDREAU *et al.*, 2002). GATA-4 interagit également avec HNF-1 α pour réguler l'expression de la Lph (VAN WERING *et al.*, 2004) et de la « liver fatty acid-binding protein » (L-Fabp) (DIVINE J. K. *et al.*, 2004). Il a été démontré que GATA-4 pouvait interagir physiquement avec certaines protéines Smads de la voie du « transforming growth factor-beta » (TGF- β) pour transactiver les gènes intestinaux comme l'« intestinal alkaline phosphatase » (Iap) et I-Fabp (BELAGULI *et al.*, 2007). Chez la souris, une invalidation conditionnelle de GATA-4 dans l'intestin a permis de contourner la létalité cardiaque embryonnaire et ainsi de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans l'intestin proximal. Les jéjunums de ces souris mutantes subissent une transformation partielle vers un phénotype iléal caractérisé par une augmentation d'expression de certains marqueurs iléaux, tels que l'« apical sodium dependent bile acid transporter » (Asbt) et l'« ileal lipid binding protein » (Ilbp), ainsi qu'une atténuation de l'expression de marqueurs jéjunaux tels Lph et Fabp1 (BEULING *et al.*, 2008 ; BATTLE *et al.*, 2008). De plus, le processus de différenciation entérocytaire est lui aussi mené vers un phénotype iléal. Il est caractérisé par une augmentation du messager de Math1 et de la densité de cellules de Paneth ainsi qu'une diminution du nombre de cellules absorbantes (BEULING *et al.*, 2008 ; BOSSE *et al.*, 2006). GATA-4 joue donc un rôle important dans le maintien de l'identité jéjunale.

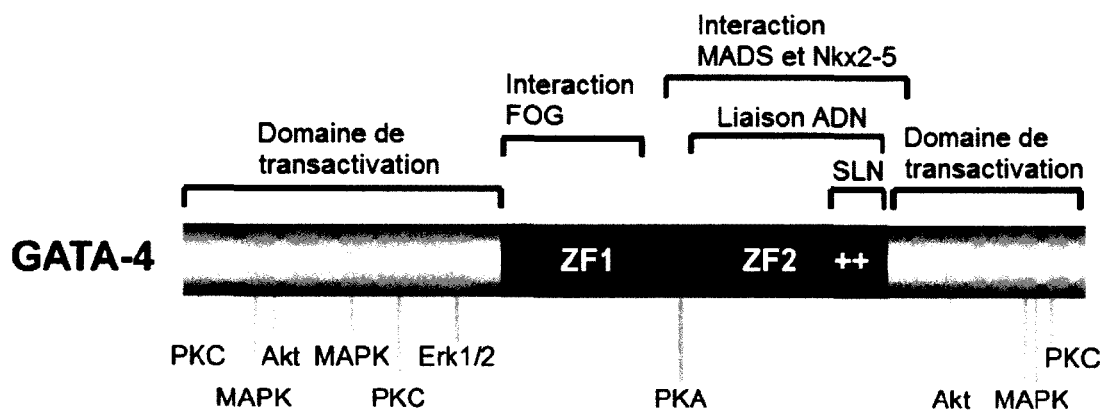
3.4 Structure de GATA-4

La structure de GATA-4 est similaire à celle des autres membres GATA (Figure 5). Elle est composée de deux doigts de zinc situés en milieu de séquence entre les résidus 216 et 294. Ils servent à la liaison à l'ADN ainsi qu'aux interactions protéiques avec différents cofacteurs pouvant moduler son activité transcriptionnelle (REAMON-BUETTNER et BORLAK, 2005). Compte tenu de la grande homologie de séquence entre les membres GATA, certaines prédictions sur les caractéristiques structurales et fonctionnelles de GATA-4 sont basées sur les études effectuées sur GATA-1. Il a été démontré que le doigt de zinc C-terminal de GATA-1 et la région basique adjacente étaient essentiels et suffisants pour lier l'ADN. Le doigt de zinc N-terminal peut interagir avec certaines séquences d'ADN adjacentes ou avec certains cofacteurs protéiques pour potentialiser la liaison à l'ADN. Néanmoins, une délétion du doigt de zinc N-terminal n'affecte pas significativement la liaison à l'ADN (WEISS *et al.*, 1997 ; TRAINOR *et al.*, 1996 ; VISVADER *et al.*, 1995 ; OMICHINSKI *et al.*, 1993 ; YANG et EVANS, 1992). Le doigt de zinc N-terminal de GATA-4 interagit avec les membres de la famille « friends of GATA » (FOG), FOG-1 et FOG-2. Ceux-ci sont des partenaires importants des membres GATA et peuvent agir comme co-activateurs ou corépresseurs (VIGER *et al.*, 2008). Des expériences *in vitro* ont démontré que FOG-1 et FOG-2 peuvent activer ou inhiber l'action de GATA-1 et de GATA-4 (SVENSSON *et al.*, 1999). FOG-1 peut lier le doigt de zinc N-terminal de GATA-1 et influencer son action sur la différenciation terminale des cellules érythroïdes et des mégacaryocytes (SVENSSON *et al.*, 1999 ; TSANG *et al.*, 1997). FOG-2 est une protéine qui possède huit motifs à doigts de zinc. Elle est exprimée dans le cœur, les testicules et les tissus nerveux (LU *et al.*, 1999 ; SVENSSON *et al.*, 1999). FOG-2 lie le doigt de zinc N-terminal de GATA-4 *in vitro* et *in vivo* et réprime l'expression de plusieurs gènes cardiospécifiques (LU *et al.*, 1999 ; SVENSSON *et al.*, 1999). La protéine mutante GATA-4 V217G est incapable de lier FOG-2. Chez la souris, cette mutation entraîne une létalité embryonnaire entre les jours E12.5 et E15.5 et génère un phénotype semblable à celui retrouvé chez les souris FOG^{-/-} (CRISPINO *et al.*, 2001). FOG-2 peut également lier GATA-5 et -6 et moduler leur activité transcriptionnelle (LU *et al.*, 1999 ; SVENSSON *et al.*, 1999 ; TEVOSIAN *et al.*, 1999). En plus d'être important à la liaison à l'ADN, le doigt de zinc C-terminal de GATA-4 est impliqué dans la liaison de nombreux cofacteurs protéiques dont p300 (TAKAYA *et al.*, 2008 ; DAI et MARKHAM, 2001), Nkx2.5 (GARG *et al.*, 2003 ; DUROCHER *et al.*, 1997 ;

Figure 5 : Structure de GATA-4

GATA-4 est composé de deux doigts de zinc en milieu de séquence (ZF1 et ZF2), un SLN en C-terminal, des domaines de transactivation en N-terminal et C-terminal, des sites d'interactions protéiques avec différents cofacteurs dont les FOGs, Nkx2-5 ainsi que certains facteurs comportant une boîte MADS. GATA-4 possède aussi une multitude de sites de phosphorylation par différentes kinases comme MAPK, Akt, Erk1/2, PKC et PKA, capables de phosphoryler GATA-4 et moduler son activité.

Adapté de TEMSAH et NEMER, 2005.



SEPULVEDA *et al.*, 1998 ; LEE *et al.*, 1998), NFATc4 (MOLKENTIN *et al.*, 1998), MEF-2, SRF (MORIN *et al.*, 2000), STAT-1 (WANG *et al.*, 2005), certains membres de la famille AP-1 (HERZIG *et al.*, 1997) ainsi que le facteur dHand (DAI *et al.*, 2002). GATA-4 possède un SLN en C-terminal entre les résidus 270 et 324 (PHILIPS *et al.*, 2007). La région comprise entre les acides aminés 294 et 336 est riche en acides aminés basiques. Elle est citée dans quelques articles (REAMON-BUETTNER et BORLAK, 2005 ; NEMER *et al.*, 2006 ; REAMON-BUETTNER *et al.*, 2007), mais n'a pas encore été caractérisée de manière approfondie. La mutation G296S située dans la région basique tout juste après le doigt de zinc en C-terminal est associée à plusieurs cas de cardiopathies congénitales (GARG *et al.*, 2003). Elle diminue la liaison de GATA-4 à l'ADN, son activité transcriptionnelle et son interaction avec le cofacteur cardiaque TBX5 (GARG *et al.*, 2003).

3.5 Régulation de l'activité de GATA-4

Tel que décrit ci-haut, GATA-4 peut lier plusieurs partenaires protéiques, ce qui constitue un mode de régulation important. De plus, certaines régions de GATA-4 sont modifiées post-traductionnellement. La sérine 105 de GATA-4 peut être phosphorylée par p42/p44, entraînant une augmentation de sa liaison à l'ADN, de son pouvoir transcriptionnel et de la réponse hypertrophique GATA-4-dépendante dans les cardiomyocytes (LIANG *et al.*, 2001). D'autres essais *in vitro* ont démontré que la MAPK p38 pouvait aussi phosphoryler GATA-4 en réponse à l'activation de la petite GTPase RhoA causée par divers stimuli cardio-hypertrophiques (CHARRON *et al.*, 2001). Cette phosphorylation survient entre autre sur la sérine 105 de GATA-4, mais aussi sur d'autres sites situés aussi bien en N-terminal qu'en C-terminal (CHARRON *et al.*, 2001). La phosphorylation PKA-dépendante de GATA-4 sur la sérine 261 de GATA-4 est induite en réponse à l'AMP cyclique (AMPC) dans les cellules de gonades de souris, ce qui a pour effet d'induire l'activité transcriptionnelle de GATA-4 sur différents promoteurs gonado-spécifiques (TREMBLAY et VIGER, 2003). L'utilisation d'un mutant S261A réduit considérablement l'activité transcriptionnelle AMPC-dépendante de GATA-4 sur ces promoteurs et inhibe sa liaison avec le cofacteur CREB, habituellement induite lors d'un traitement à l'AMPC (TREMBLAY et VIGER, 2003). Une étude *in vitro* réalisée sur des myoblastes de souris C2C12 transfectés avec GATA-4 de rat, montre que les sérines 419 et 420 de GATA-4 (sérines 420 et 421 chez la souris) sont phosphorylées par la PKC

(WANG *et al.*, 2005). Cette phosphorylation survient en réponse à l'angiotensine II qui, en activant le récepteur de type 1 de l'angiotensine (AT1R), permet l'activation de différentes voies de signalisation dont la voie Janus kinase (JAK)-STAT et la voie de la protéine kinase C (PKC). Celle-ci phosphoryle GATA-4 et potentialise son activité transcriptionnelle sur le promoteur du gène ANF (WANG *et al.*, 2005). Ces phosphorylations augmentent l'activité de GATA-4. Au contraire, une phosphorylation de GATA-4 par la « glycogène synthase kinase-3 beta » (GSK-3 β) est plutôt associée à une répression de son activité (MORISCO *et al.*, 2001). Finalement, GATA-4 peut être acétylé par le co-activateur p300 sur les lysines 311, 318, 320 et 322, ce qui potentialise son activité transcriptionnelle (TAKAYA *et al.*, 2008 ; DAI et MARKHAM, 2001).

3.6 GATA-4 et prolifération

GATA-4 est un activateur direct de la cycline D2 et de cdk4 et est primordial pour la prolifération des cardiomyocytes (ROJAS *et al.*, 2008). GATA-4 peut également moduler l'expression des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (KYRÖNLAHTI *et al.*, 2008 ; SUZUKI *et al.*, 2007). Dans des astrocytes de souris invalidés pour p53, une délétion de GATA-4 entraîne une transformation et une résistance aux traitements de chimiothérapie alors qu'une surexpression induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et une augmentation de l'apoptose (AGNIHOTRI *et al.*, 2009). Finalement, des observations menées au laboratoire démontrent qu'une surexpression de GATA-4 dans les cellules épithéliales intestinales IEC-6 induit certains changements phénotypiques. Les cellules IEC-6 GATA-4 prolifèrent plus rapidement. Elles acquièrent un métabolisme plus rapide et poursuivent leur processus de prolifération après l'atteinte de la confluence. Finalement, des observations par microscopie électronique démontrent un épaissement significatif des cellules en culture.

3.7 GATA-4 et la réponse inflammatoire intestinale

Une étude récente a démontré par immunohistochimie que l'expression de GATA-4 était augmentée dans des échantillons de tissus de patients atteints de maladies inflammatoires intestinales chroniques (HAVERI *et al.*, 2009). Si cette étude démontre une conséquence d'un état inflammatoire sur GATA-4, aucun article n'avait encore décrit la situation inverse, c'est-à-dire l'influence de GATA-4 sur l'inflammation. Une première publication en ce sens est venue de notre laboratoire en 2008. Nous avons rapporté que GATA-4

pouvait interagir physiquement avec C/EBP δ . De telles coopérations entre les membres GATA et C/EBPs avaient été préalablement rapportées (YAMAGUCHI *et al.*, 1999 ; TONG *et al.*, 2005). Nous avons également démontré que GATA-4, en cotransfection avec différents membres de la famille C/EBP dans les cellules HEK 293T, modulait à la hausse l'expression de la glycoprotéine α -acide (AGP) et à la baisse l'expression de thiostatin et de l'haptoglobine, des gènes pro-inflammatoires habituellement sous le contrôle des C/EBPs (TURGEON *et al.*, 2008). Une surexpression de GATA-4 dans les cellules IEC-6 conduit à une diminution d'expression de C/EBP β et C/EBP δ . Elle génère aussi une baisse de l'expression IL-1-dépendante de thiostatin. Cette baisse d'expression s'expliquerait par une moins grande présence des C/EBPs au promoteur de thiostatin (TURGEON *et al.*, 2008).

4. Mon hypothèse de recherche

J'ai émis l'hypothèse que GATA-4, en plus de la modulation C/EBP-dépendante de la réponse inflammatoire, pouvait affecter d'autres voies de signalisation importantes dans l'inflammation, et que certains domaines de GATA-4 pouvaient jouer des rôles indépendants dans le contrôle de l'inflammation. Pour vérifier cette hypothèse, deux objectifs principaux ont été formulés. Le premier consistait à déterminer si GATA-4 peut moduler la réponse inflammatoire induite par l'IL-1 β dans les IEC-6 par d'autres voies cellulaires que celles impliquant les C/EBPs. Le second objectif était de générer des mutants de GATA-4 afin de déterminer l'importance des différents domaines protéiques dans la modulation de la réponse inflammatoire. J'ai pu déterminer qu'une surexpression de GATA-4 dans les IEC-6 conduisait à l'inhibition de la phosphorylation de p42/p44 et d'Akt, à la modulation de la liaison à l'ADN des facteurs C/EBPs, AP-1 et NF- κ B ainsi qu'à la diminution de l'expression des gènes de réponse inflammatoire CCL5 et iNOS. La génération de mutants de GATA-4 m'a permis de mettre en évidence un rôle du doigt de zinc N-terminal (216-240) dans l'altération de la morphologie cellulaire, et de la région basique de GATA-4 (294-336) dans la modulation de la vitesse de prolifération des IEC-6. Ces résultats suggèrent que GATA-4 pourrait participer à l'instauration d'une tolérance immunitaire développée dans les entérocytes au cours de leur processus de différenciation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

Les cellules épithéliales intestinales de cryptes de rat IEC-6 proviennent du professeur A. Quaroni (Université Cornell, Ithaca, NY, USA). La lignée cellulaire IEC-6 surexprimant GATA-4 murin a été établie précédemment au laboratoire par infection rétrovirale à l'aide des constructions pBabepuro et pBabepuro-GATA-4 (TURGEON *et al.*, 2008). Les cellules rénales humaines embryonnaires transformées HEK 293T, proviennent du professeur A. Nepveu (Département d'oncologie, Université McGill, Montréal, QC, Canada). Les cellules ont été cultivées dans 8 mL de « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM) contenant 5% (IEC-6) ou 10% (HEK 293T) de sérum de veau fœtal (FBS) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 2 mM de L-glutamine (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) et 100 U/mL de pénicilline et streptomycine (Wisent, St-Bruno, QC, Canada). La culture s'effectue dans un incubateur réglé à 37°C et contenant 5% de CO₂. De la puromycine (2 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) est ajoutée comme agent sélectif au milieu DMEM 5% FBS lors de la culture des cellules IEC-6 pBabepuro et pBabepuro GATA-4 jusqu'au moment des inductions.

2. Étude des mécanismes de régulation de la réponse inflammatoire par GATA-4

2.1 Inductions

Les cellules IEC-6 pBabepuro et pBabepuro GATA-4 à environ 90% de confluence sont induites avec du FBS (5%) suivant une privation de 24 heures ou avec l'IL-1 β humain (10 ng/mL) (R & D systems, Minneapolis, MN, USA) pour induire l'inflammation. Différents temps d'induction ont été effectués selon les circonstances.

2.2 Extraction de protéines totales

Les extractions de protéines totales (ROY, 2007) ont été réalisées sur les cellules IEC-6 pBabepuro et pBabepuro GATA-4 cultivées dans des pétris de 100 mm et sur lesquelles les traitements à L'IL-1 β ont été effectués, et sur les cellules IEC-6 et HEK 293T

surexprimant les différents mutants de GATA-4. L'extraction est effectuée avec le tampon Triton (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA pH 8.0, 15 mM NaCl, 5% glycérol, 40 mM β -glycérophosphate, 50 mM NaF, 200 μ M Na-orthovanadate, 1 μ M PMSF et 1/1000 de chaque inhibiteur de protéases : aprotinine, leupeptine et pepstatine (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada).

2.3 Immunobuvardage de type Western

Les extraits protéiques totaux recueillis sont dosés selon la méthode de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) et un spectrophotomètre Bio-Rad SmartSpec (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Les immunobuvardages de type Western sont effectués tels que décrit dans le mémoire d'Andréane Cartier (CARTIER, 2008) à l'exception de quelques modifications. 25 μ g d'extrait protéique sont utilisés pour la réalisation des immunobuvardages pour la détection des MAPK et de Akt et 20 μ g d'extrait protéique pour la détection des mutants de GATA-4. Tous les blocages et incubations d'anticorps primaires et secondaires ont été réalisés dans une solution de « tris-buffered saline » 1X contenant 0,05% de Tween 20 (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) (TBST 1X) et 5% de lait en poudre. Tous les échantillons sont séparés sur des gels SDS-PAGE contenant 10% d'acrylamide. Après le transfert, les membranes de PVDF sont déposées sur un papier Whatman puis séchées à l'air ambiant. Elles sont ensuite réhydratées dans du méthanol 100% avant de procéder au blocage. Les conditions d'incubation des différents anticorps primaires et secondaires sont présentées dans le tableau 1.

2.4 Extraction de protéines nucléaires

Les extractions de protéines nucléaires (CARTIER, 2008) ont été réalisées sur les cellules IEC-6 pBabepuro et pBabepuro GATA-4 cultivées dans des pétris de 100 mm et sur lesquelles les traitements à l'IL-1 β ont été effectués, et sur les cellules IEC-6 surexprimant les différents mutants de GATA-4. Les extraits sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation ultérieure.

2.5 Préparation des sondes radioactives pour les gels de rétention

Des oligonucléotides simple brin, sens et anti-sens, contenant un site de liaison à l'ADN pour AP-1 (Catalogue Santa Cruz Biotechnologies 2007, p. 115) (5'- CGC TTG ATG

Tableau 1 : Détails d'utilisation des anticorps pour les immunobuvardages de type Western

Anticorps primaires	(Dilution/ Temps/ T °C)	Anticorps secondaires	(Dilution/ Temps/ T °C)
p42/p44 phospho (#9101) (Cell Signaling, Pickering, ON, Canada)	(1:1000/ 16h/ 4°C)	Anti-lapin (SantaCruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA)	(1:1000/ 1h/ 22°C)
p42/p44 total (#9102) (Cell Signaling, Pickering, ON, Canada)	(1:1000/ 16h/ 4°C)	Anti-lapin (SantaCruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA)	(1:1000/ 1h/ 22°C)
p38 phospho (#9211) (Cell Signaling, Pickering, ON, Canada)	(1:500/ 16h/ 4°C)	Anti-lapin (SantaCruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA)	(1:1000/ 1h/ 22°C)
Jnk phospho (#9251) (Cell Signaling, Pickering, ON, Canada)	(1:500/ 16h/ 4°C)	Anti-lapin (SantaCruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA)	(1:1000/ 1h/ 22°C)
Jnk total (#9258) (Cell Signaling, Pickering, ON, Canada)	(1:500/ 16h/ 4°C)	Anti-lapin (SantaCruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA)	(1:1000/ 1h/ 22°C)
Akt phospho (#9271) (Cell Signaling, Pickering, ON, Canada)	(1:1000/ 16h/ 4°C)	Anti-lapin (SantaCruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA)	(1:1000/ 1h/ 22°C)
Akt total (#9272) (Cell Signaling, Pickering, ON, Canada)	(1:1000/ 16h/ 4°C)	Anti-lapin (SantaCruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA)	(1:1000/ 1h/ 22°C)

ACT CAG CCG GAA -3') ou un site de liaison à l'ADN pour les « CAAT-enhancer binding proteins » (C/EBPs) au promoteur de l'haptoglobine de rat (BAUMANN *et al.*, 1990 ; PELLETIER *et al.*, 1998) (5'- CCA AGT ATG AAG CAA GAG CTC A -3') ou un site consensus de liaison à l'ADN pour le facteur NF- κB (Catalogue Santa Cruz Biotechnologies 2007, p. 162) (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C -3') ou le site B2 de liaison à l'ADN pour GATA-4 au promoteur de l'α-glycoprotéine acide (AGP) de rat (BOUDREAU *et al.*, 1998) (5'- CTG GTG AGA TTG TGC CAC AGC TCT G -3') ou un site consensus de liaison à l'ADN pour les différents membres de la famille GATA (Catalogue Santa Cruz Biotechnologies 2007, p. 186) (5'- CAC TTG ATA ACA GAA

AGT GAT AAC TCT -3') sont tout d'abord hybridés à une concentration finale de 1 µg/µL dans 100 µL d'eau stérile contenant 50 mM NaCl. Les tubes sont incubés dans de l'eau chauffée à 95°C que l'on laisse ensuite refroidir progressivement durant la nuit. Les oligonucléotides sens et anti-sens utilisés pour faire la sonde double brins possèdent en leurs extrémités 5' deux guanines supplémentaires générant des extrémités 5' saillantes après l'hybridation. Le fragment Kleenow de l'ADN polymérase I de *Escherichia coli* utilise le désoxycytidine triphosphate (dCTP) radiomarqué au ³²P en position alpha comme substrat pour remplir les extrémités 5' saillantes et ainsi générer des extrémités franches. Les sondes sont ensuite purifiées sur colonne de sephadex ProbeQuant G-50 (GE Healthcare, Baie D'Urfé, QC, Canada) puis diluées jusqu'à ce que 1 µL de sonde donne entre 20 et 50 comptes par seconde (CPS) au compteur Geiger-Müller. Les sondes sont conservées à -20°C.

2.6 Gel de rétention

Les extraits de protéines nucléaires recueillis sont dosés de la même façon que pour les extraits protéiques totaux. Les gels de rétention et les surétentions sont effectués tels que décrit dans le mémoire d'Andréane Cartier (CARTIER, 2008) à l'exception des modifications suivantes. 6 µg de protéines nucléaires sont utilisés pour les gels de rétention. Les périodes d'incubation de 30 minutes à température de la pièce après l'ajout de l'anticorps (dans le cas des surétentions) et de la sonde ont été réduits à 5 minutes. Lors de la réalisation des surétentions, 3 µL d'anticorps (ou 1 µL d'anticorps concentré, identifiés avec « * ») dirigés contre C/EBPα*, C/EBPβ*, C/EBPδ*, JunB*, cJun*, cFos*, les sous-unités p50* et p65* de NF-κB ou GATA-4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) sont également ajoutés aux échantillons. La séparation des extraits nucléaires s'effectue dans un gel non-dénaturant de polyacrylamide 5,33%. La migration des échantillons sur gel s'effectue à 150 V. Le séchage du gel se fait sur une période de 1 heure et 45 minutes.

2.7 Extraction des ARNs totaux

Des extractions d'ARN totaux (CARTIER, 2008) ont été réalisées en utilisant le réactif de TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) sur les cellules IEC-6 pBabepuro, pBabepuro GATA-4 cultivées dans des pétris de 100 mm et sur lesquelles les traitements à l'IL-1β ont été effectués.

2.8 RT-PCR semi quantitatif

Les extraits d'ARN totaux sont dosés par spectrophotométrie en appliquant la relation suivante : $(1.00 \text{ DO}^{260\text{nm}} = 40 \text{ } \mu\text{g d'ARN})$. La réaction de reverse transcriptase s'effectue dans un tube de 200 μL dans lequel on place 5 μg d'ARN, 0,5 μg d'oligonucléotides pdT-18 (synthétisé chez IDT Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) et 1 μL de dNTPs 40 mM (10 mM de chaque nucléotide) (GE Healthcare, Baie D'Urfé, QC, Canada), le tout dans un volume total de 12 μL . Les échantillons sont incubés pendant 5 minutes à 65°C après quoi sont ajoutés 4 μL de First Strand Buffer 5X (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada), 2 μL de DTT 0,1 M, 1 μL d'inhibiteur de RNase (RNaseOUT) (40 U/ μL) (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) et 0,5 μL de l'enzyme SuperScript II (200 U/ μL) (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada). La réaction de transcription inverse s'effectue pendant 50 minutes à 42°C suivi d'une incubation de 15 minutes à 70°C. Les échantillons d'ADN complémentaire (ADNc) sont conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation lors des réactions de polymérisation en chaîne (PCR). Ces dernières sont effectuées avec le « *Taq* PCR Master Mix » (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). La réaction s'effectue dans un volume total de 16,2 μL dans lequel on retrouve 7,5 μL de solution Master Mix, 5,7 μL d'eau stérile, 0,1 μg de chaque amorce (sens et anti-sens) et 1 μL d'ADNc. La nature des amorces utilisées (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada ; IDT Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) lors des réactions de PCR a été choisie à l'aide du programme en ligne Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Les séquences des amorces sont présentées dans le tableau 2. Le programme « Touch Down » utilisé pour la réaction de PCR est présenté dans le tableau 3. 5 μL de chaque produit de PCR sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1,4% contenant du bromure d'éthidium 300 ng/mL. Les photos sont prises pendant que le gel est exposé à une lampe à rayons ultraviolets (UV).

Tableau 2 : Séquence des amorces de PCR utilisées pour analyser l'expression de gènes de réponse inflammatoire

Cible	Sens	Séquence
CCL2	Sens	5' – CCA GAA ACC AGC CAA CTC TC – 3'
	Anti-sens	5' – AGG CAT CAC ATT CCA AAT CA – 3'
CXCL2	Sens	5' – CCT CCT GTG CTC AAG ACT CC – 3'
	Anti-sens	5' – GAG CTG GCC AAT GCA TAT CT – 3'
CXCL10	Sens	5' – GCT TAT TGA AAG CGG TGA GC – 3'
	Anti-sens	5' – ATT TGC CAT CTC ACC TGG AC – 3'
CCL5	Sens	5' – GTG CCC ACG TGA AGG AGT AT – 3'
	Anti-sens	5' – ATC CCC AGC TGG TTA GGA CT – 3'
iNOS	Sens	5' – GGG AGC CAG AGC AGT ACA AG – 3'
	Anti-sens	5' – GTG GGG TTG TTG CTG AAC TT – 3'
GAPDH	Sens	5' – GTG AAG GTC GGT GTG AAC GG – 3'
	Anti-sens	5' – CCA AAG TTG TCA TGG ATG AC – 3'

Tableau 3 : Programme utilisé lors des réactions de PCR pour l'observation de l'expression de gènes de réponse inflammatoire

Cycle	Dénaturation	Hybridation	Polymérisation
-	1 minute à 95°C	-	-
1 ^{er} cycle	1 minute à 95°C	1 minute à 62°C	1 minute à 72°C
Cycles 2 à 24	1 minute à 95°C	-0,3°C / cycle	1 minute à 72°C
24 ^e cycle	-	10 minutes à 72°C	-

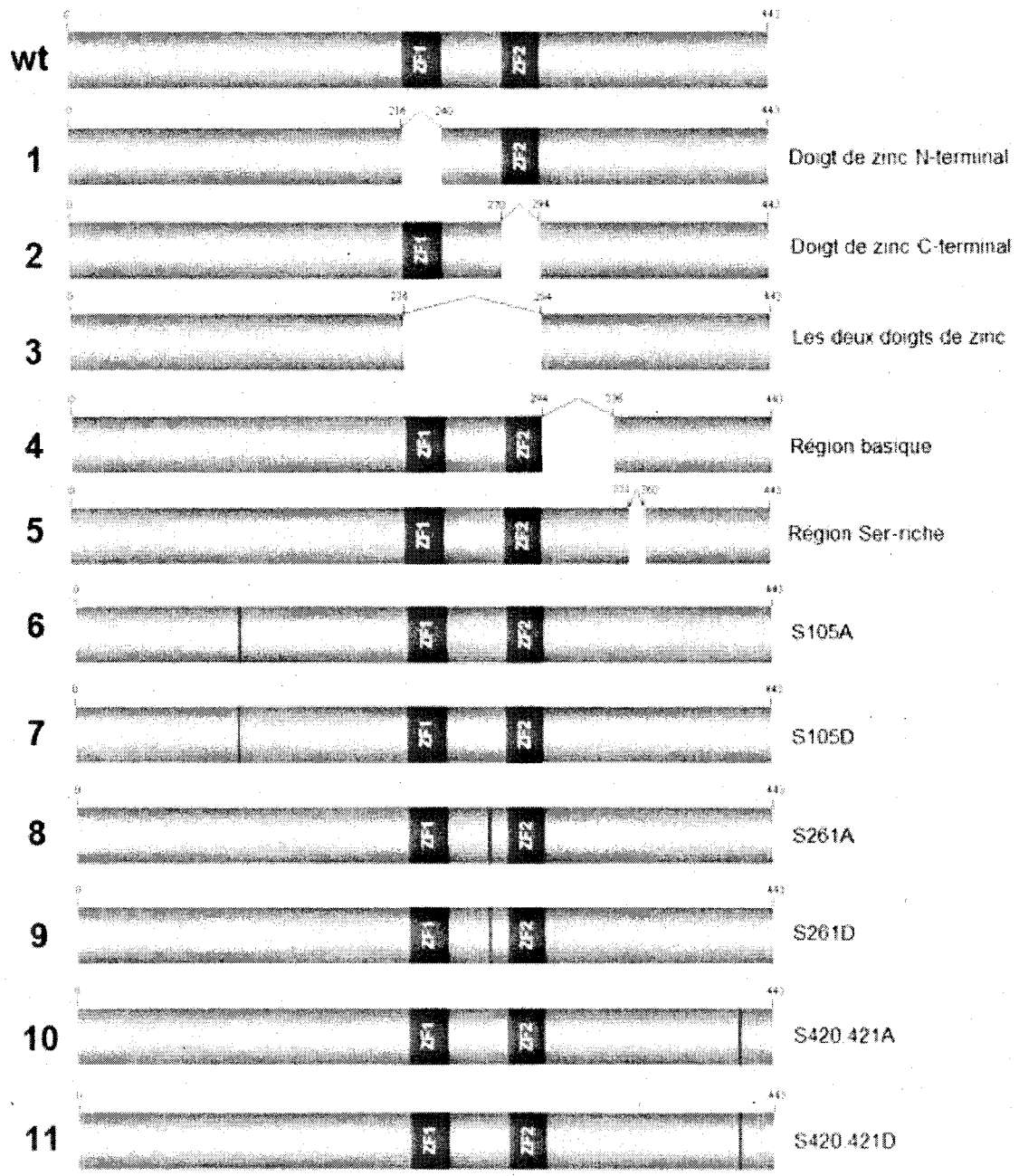
3. Génération et caractérisation des mutants de GATA-4

3.1 Mutagenèse dirigée

Les mutants de délétions nous permettent d'étudier l'importance de certaines régions de la protéine GATA-4 dans le processus inflammatoire. Les régions N-terminale et C-terminale, les deux doigts de zinc, ensemble ou séparément, la région basique ou encore une région riche en sérines ont été délétées. Les mutants spécifiques servent à étudier l'importance d'un site spécifique de la protéine capable d'être modifiée post-traductionnellement, par exemple par phosphorylation. Les sites S105, S261 et S420.421 sont des sites de phosphorylation pour Erk, PKA et PKC respectivement (LIANG Q *et al.*, 2001 ; TREMBLAY et VIGER, 2003 ; WANG *et al.*, 2005). Tous les mutants sont schématisés à la figure 6. Les mutants GATA-4 Δ 270-294, Δ 351-560, S105A, S105D,

Figure 6 : Schéma des mutants de GATA-4

Les mutants GATA-4 Δ 216-240 (1), Δ 216-294 (3) et Δ 294-336 (4) ont été réalisés selon la technique « d'overlap extension ». Les mutants Δ 270-294 (2), Δ 351-360 (5), S105A (6), S105D (7), S261A (8), S261D (9), S420.421A (10), S420.421D (11) ont été réalisés selon la technique Quick Change® de Stratagene.



S261A, S261D, S420.421A et S420.421D ont été réalisés en appliquant le protocole du « Quick Change® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit » (Stratagene, West Cedar Creek, TX, USA) (Figure 7). L'ADN matrice utilisé pour la mutagenèse est pBabepuro-GATA-4 pour les mutants Δ 270-294, Δ 351-360, S105A, S261D, S420.421A et S420.421D, et pCDNA3-GATA-4 pour les mutants S105D et S261A. L'ADN pCDNA3-GATA-4 provient du professeur F. Boudreau (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada). Les oligonucléotides utilisés pour la génération par PCR des copies simple brin mutantes sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Séquence des amorces utilisées pour la mutagenèse selon la méthode Quick Change de Stratagene

Mutant	Séquence
Δ 270-294	5' – GTC CGC TTC CCG CCG GGT AGG CCT CTC CGG CCT CTA CAT GAA GCT CCA TGG GGT TC – 3'
Δ 351-360	5' – GTG CCT CCA GCG GTA ACT CCA GCG AGA TGC GCC CCA TCA AGA CAG A – 3'
S105A	5' – CGC CGC CCG TGG CCC CGC GCT TC – 3'
S105D	5' – CCG CCG CCC GTG GAC CCG CGC TTC TC – 3'
S261A	5' – AGC GCC GCC TGG CCG CTT CCC GC – 3'
S261D	5' – CAG CGC CGC CTG GAC GCT TCC CGC CG – 3'
S420.421A	5' – TCA GAC ATC GCA GGC CGC CGC CAA GCA GGA CTC TTG – 3'
S420.421D	5' – CAC TCA GAC ATC GCA GGC CGA CGA CAA GCA GGA CTC TTG GAA C – 3'
K318.320.322R	5' – GAG GGG ATT CAA ACC AGA AGA CGG AGG CCC AGG AAC CTG AAT AAA TCT AAG – 3'

Dû à la présence de délétions de grande taille, les mutants GATA-4 Δ 216-240, Δ 216-294 et Δ 294-336 ont été générés grâce à la technique de PCR par « overlap extension » (MONGRAIN, 2007) (Figure 8). Les régions en amont et en aval de la section à être déléetée sont tout d'abord amplifiées séparément en utilisant deux paires d'amorces en conséquence (amorces rouges pour amplifier la région rouge, et amorces bleues pour amplifier la région bleue). Les séquences des amorces utilisées pour la mutagenèse par « overlap extension » sont illustrées dans le tableau 5. Pour cette première réaction de

Figure 7 : Mutagenèse selon la méthode Quick Change de Stratagene

L'ADN matrice est soumis à une amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide d'un oligonucléotide simple brin contenant la mutation d'intérêt. Le produit de la réaction PCR est ensuite digéré par l'enzyme *Dpn* I qui digère tout ADN méthylé provenant de bactéries. Le produit de digestion sert ensuite à la transformation bactérienne.

Adapté de la figure originale sur www.stratagene.com.

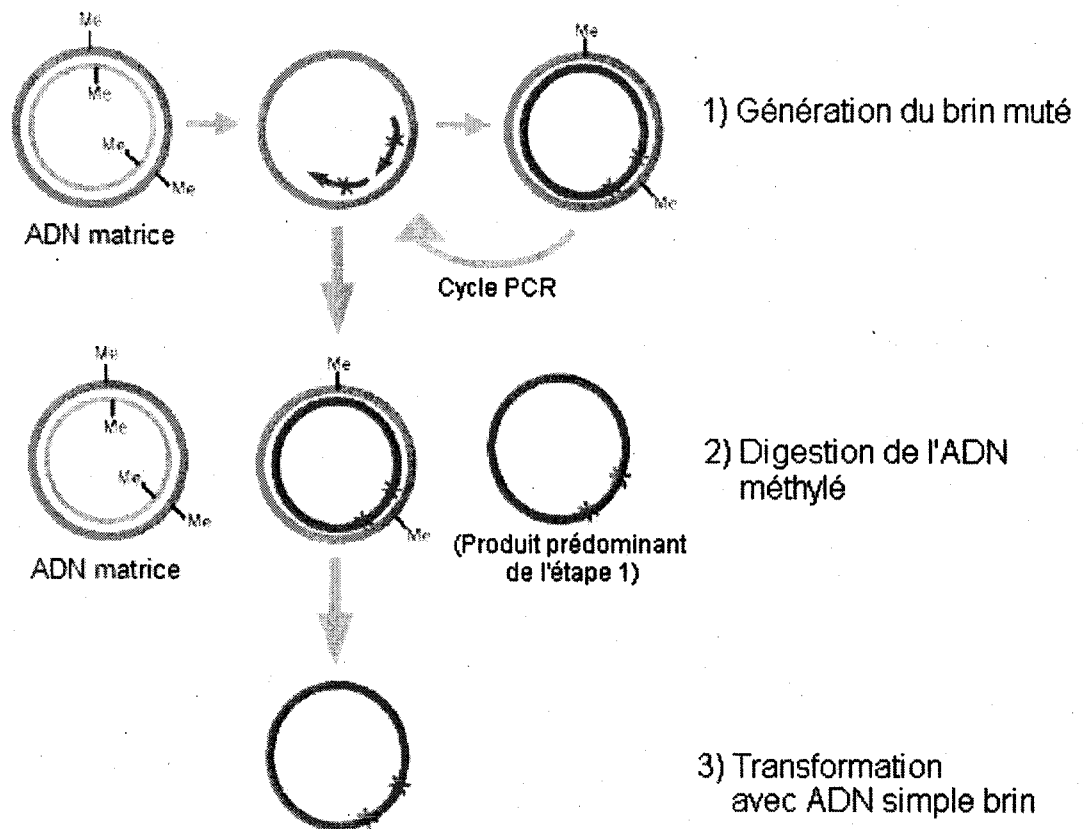
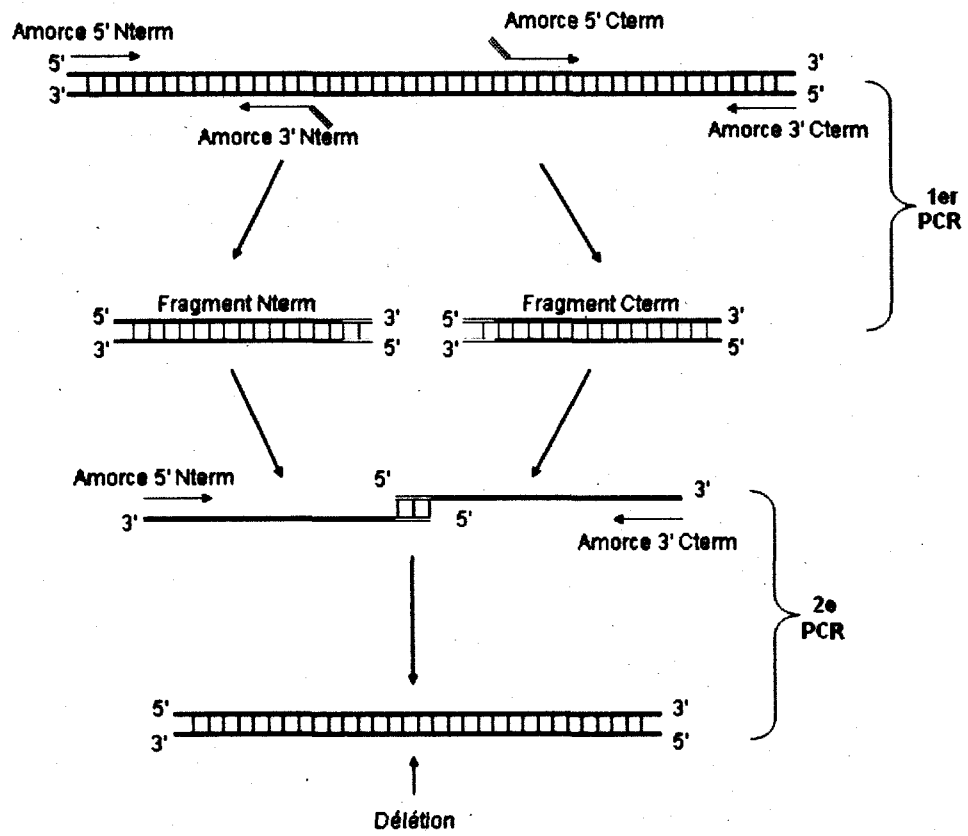


Figure 8 : Mutagenèse selon la méthode « overlap extension »

L'ADN matrice est soumis à deux amplifications séparées par réactions de PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques. Les deux fragments d'ADN (rouge et bleu) disposés de chaque côté de la délétion désirée (jaune) sont donc amplifiés. Ces derniers sont ensuite mélangés puis soumis à une seconde amplification par PCR au cours de laquelle ils sont recombinaisonnés.

Adapté de MONGRAIN, 2007.



PCR, 100 ng d'ADN matrice pBabepuro-GATA-4 sont placés dans un volume total de 50 μ L combiné avec 5 μ L de tampon PCR High Fidelity 10X, 1 μ L de dNTPs 40 mM (10 mM de chaque nucléotide), 100 ng d'amorces sens et anti-sens et 1 U de *Platinum® Taq* ADN Polymérase High Fidelity (Invitrogen, Burlington, ON, Canada).

Tableau 5 : Séquence des amorces de PCR utilisées pour la mutagenèse par « overlap extension »

Mutants	Référence sur la Figure 2	Séquence
Amorce 5' commune	Amorce 5' Nterm	5' – TCA CTA GGA TCC ACC ATG TAC CAA AGC CTG GCC ATG GT – 3'
Amorce 3' commune	Amorce 3' Cterm	5' – TCA CTA GAA TTC TTA CGC GGT GAT TAT GTC CCC ATG AC – 3'
GATA-4 Δ 216-240	Amorce 3' Nterm	5' – GAC TTC TCA GGA GGC AGA GAG GGC CTC TAT CAC AAG ATG AAC – 3'
	Amorce 5' Cterm	5' – GTT CAT CTT GTG ATA GAG GCC CTC TCT GCC TTC TGA GAA GTC – 3'
GATA-4 Δ 216-294	Amorce 3' Nterm	5' – ATG GAG CTT CAT GTA GAG GCC CTC TCT GCC TTC TGA GAA GTC – 3'
	Amorce 5' Cterm	5' – GAC TTC TCA GAA GGC AGA GAG GGC CTC TAC ATG AAG CTC CAT – 3'
GATA-4 Δ 294-336	Amorce 3' Nterm	5' – ACC ACT GGA GGG AGG GAG GGT GGC ATT ACA TAC AGG CTC ACC – 3'
	Amorce 5' Cterm	5' – GGT GAG CCT GTA TGT AAT GCC ACC CTC CCT CCC TCC AGT GGT – 3'

Les produits de PCR sont purifiés sur des colonnes filtres « Montage PCR® » (Millipore, Bedford, MA, USA). Pour la seconde réaction de PCR, 50 ng de chaque produit PCR purifié sont combinés dans un même tube et placés dans les mêmes conditions que lors de la première réaction de PCR. L'insert complet est purifié à nouveau sur colonne filtres « Montage PCR » et cloné dans pBabepuro dans le site *Bam HI - Eco RI* après digestion enzymatique. Le tableau 5 montre les séquences des amorces utilisées lors de la mutagenèse par « overlap extension ». Les ADN mutants générés sont transformés dans des bactéries *Escherichia coli* TOP-10F' puis sélectionnés sur pétris d'agar contenant de l'ampicilline à 100 μ g/mL. Ces mutants positifs sont ensuite cultivés, puis leur ADN plasmidique extrait à l'aide des trousse d'extraction d'ADN plasmidique « Midi Prep » et

« Mini Prep » (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). La qualité des ADN est vérifiée sur gel d'agarose et par séquençage (Génome Québec, Université McGill, QC, Canada). Les mutants pBabepuro-GATA-4 Δ 216-240, Δ 270-294, Δ 216-294, Δ 294-336, Δ 351-360, S105A, et S261D ainsi que les mutants pCDNA3-GATA-4 Δ S105D, Δ S261A Δ S420.421A et Δ S420.421D ont été obtenus et validés par séquençage.

3.2 Production de rétrovirus

La production de virus (CARTIER, 2007) s'est faite à l'aide de l'ADN codant pour les protéines du rétrovirus de la leucémie murine amphotropique (AMLV). Des virus ont été produits pour les mutants pBabepuro-GATA-4 Δ 216-240, Δ 270-294, Δ 216-294, Δ 294-336, Δ 351-360, S105A et S261D.

3.3 Infection rétrovirale

Les infections rétrovirales (CARTIER, 2007) ont été effectuées sur des cellules IEC-6. Seules les constructions mutantes de GATA-4 disponibles dans le vecteur pBabepuro ont été utilisées.

3.4 Microscopie en contraste de phase

Les lignées cellulaires IEC-6 pBabepuro, pBabepuro GATA-4 de type sauvage et GATA-4 mutants établies ont été observés par microscopie en contraste de phase à un grossissement de 40X à l'aide d'un microscope « Zeiss Axiovert 200M Fluorescence/Live cell Imaging Microscope » (Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada).

3.5 Essai de prolifération

Des tests de prolifération ont été réalisés sur les cellules IEC-6 infectées avec les différentes constructions pBabepuro, pBabepuro GATA-4 wt et GATA-4 mutants. Les décomptes cellulaires s'effectuent à l'aide du compteur de cellules Countess (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Les cellules sont incubées jusqu'à confluence dans des boîtes de pétris de 100 mm dans du milieu DMEM 5% FBS, 2 μ g/mL de puromycine. Elles sont trypsinisées dans 1 mL puis transférées dans un volume total de 10 mL de milieu DMEM 5% FBS. 20 μ L de cellules sont placées dans un tube de 1,5 mL préidentifié auquel on ajoute 20 μ L de bleu de trypan (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Les cellules et le colorant sont homogénéisés par « up and down ». 10 μ L de cellules colorées sont alors

ajoutés dans chacune des chambres de l'hématimètre fourni avec l'appareil (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Le bleu de trypan ne doit pas être ajouté plus de trois minutes avant le décompte. Les valeurs fournies lors de ce premier décompte cellulaire servent à démarrer la courbe de prolifération avec un nombre fixe de cellules pour chaque lignée à l'étude. La prolifération s'effectue en duplicata dans des plaques de six puits dans lesquelles 60 000 cellules ont été initialement placées puis incubées dans 2 mL de milieu DMEM 5% FBS, 2 µg/mL de puromycine. Le moment venu de compter les cellules, le milieu est retiré, les cellules sont lavées avec 1 mL de PBS 1X. Elles sont ensuite trypsinisées (500 µL de trypsine) puis incubées 2 minutes à 37°C. 20 µL de cellules trypsinisées sont placées dans des tubes de 1,5 mL préidentifiés auxquels on ajoute 20 µL de bleu de trypan. Les comptages pendant la courbe de prolifération s'effectuent de la même manière que lors du premier comptage.

3.6 Calcul du temps de doublement

Les valeurs de décompte cellulaire sont placées sous forme de graphique à l'aide du logiciel Microsoft Excel où x est le temps (en heure) et y est le nombre de cellules. La courbe exponentielle de prolifération est caractérisée grâce à l'ajout d'une courbe de tendance (type exponentielle). Les temps non représentatifs de la période de prolifération cellulaire exponentielle ne sont pas ajoutés dans le graphique pour le calcul de la courbe de tendance. La formule de la courbe de tendance est calculée par le programme et est ajoutée au graphique sous la forme : $y = ae^{bx}$ où y est le nombre de cellules, a un nombre quelconque, e la constante népérienne (2,718 281), b un nombre quelconque, et x le temps (en heure). Le temps de doublement (T_D) représente le temps requis pour que le nombre de cellules « y » double. Pour ce faire, il faut considérer deux points sur la courbe de tendance : $y_1 = ae^{bx_1}$ et $y_2 = ae^{bx_2}$.

$T_D = x_2 - x_1$ lorsque $y_2 = 2y_1$. Dès lors :

$$T_D = \frac{\ln\left(\frac{2y_1}{a}\right) - \ln\left(\frac{y_1}{a}\right)}{b}$$

L'équation se simplifie pour donner :

$$T_D = \frac{\ln 2}{b} = \frac{0.693}{b}$$

3.7 Essai luciférase

Les essais luciférases ont été réalisés sur des extraits de protéines totales de cellules HEK 293T transfectées avec des vecteurs d'expression de C/EBP δ avec ou sans GATA-4, S105A et S261D, et avec le gène rapporteur AGP-luciférase, selon la méthode rapportée précédemment (TURGEON, 2006).

RÉSULTATS

1. Modulation de la réponse inflammatoire intestinale par GATA-4

1.1 GATA-4 module de façon sélective l'activité des MAPK et d'Akt

1.1.1 GATA-4 n'affecte pas l'activité de Jnk et de p38

Pour vérifier si la surexpression de GATA-4 dans les IEC-6 peut moduler l'activité de Jnk et de p38 en contexte inflammatoire, des extraits protéiques totaux de cellules IEC-6 surexprimant ou non GATA-4, et traitées ou non avec du FBS ou de l'IL-1 β ont été analysées par immunobuvardage de type Western en utilisant des anticorps spécifiques contre les formes phosphorylées des MAPK Jnk et p38 (Figure 9). La phosphorylation de Jnk est augmentée suite à une stimulation de dix minutes au FBS ou à l'IL-1 β et diminue après deux heures. Une surexpression de GATA-4 ne semble pas moduler significativement cette phosphorylation. L'activité de p38 augmente suite à un traitement de dix minutes à l'IL-1 β puis redescend partiellement à deux heures et quatre heures. Une surexpression de GATA-4 n'affecte pas cette induction.

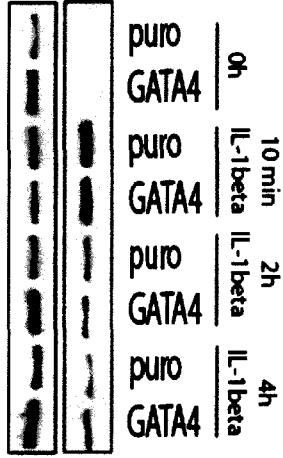
1.1.2 GATA-4 inhibe l'activité de p42/p44 et d'Akt

Pour vérifier si la surexpression de GATA-4 dans les IEC-6 peut moduler l'activité de p42/p44 et d'Akt en contexte inflammatoire, des extraits protéiques totaux de cellules IEC-6 surexprimant ou non GATA-4, et traitées ou non au FBS ou à l'IL-1 β , ont été analysées par immunobuvardage de type Western en utilisant des anticorps spécifiques contre les formes phosphorylées de p42/p44 et d'Akt (Figure 10). La phosphorylation de p42/p44 est augmentée suite à une stimulation de dix minutes au FBS ou à l'IL-1 β . Cette phosphorylation retourne à des niveaux basaux deux heures suivant le traitement au FBS, mais pas suivant un traitement à l'IL-1 β . La surexpression de GATA-4 réduit la phosphorylation de p42/p44 dans les deux conditions. Des niveaux de base de phosphorylation d'Akt sont détectables dans les IEC-6. Les niveaux de phosphorylation d'Akt sont faiblement augmentés suivant une induction de dix minutes au FBS ou à l'IL-1 β . La surexpression de GATA-4 diminue les niveaux basaux et induits de phosphorylation d'Akt.

Figure 9 : GATA-4 n'affecte pas l'activité de Jnk et de p38 dans les IEC-6 en condition inflammatoire

Immunobuvardage de type Western d'extraits de cellules IEC-6 contrôle ou surexprimant GATA-4, traitées avec sérum ou IL-1 β avec des anticorps contre Jnk total ou Jnk phosphorylé (A) (n = 2), et contre p38 phosphorylé, et sin3A comme contrôle des niveaux de protéines (B) (n = 3).

B



p38 phospho
mSin3A

A

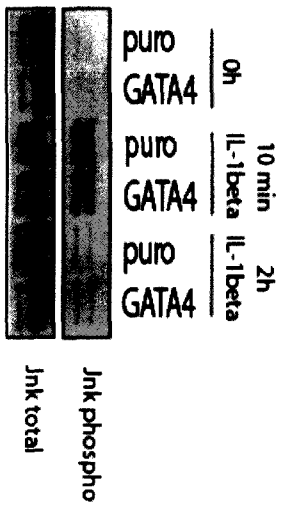
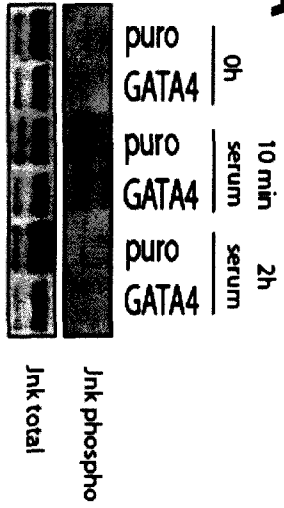
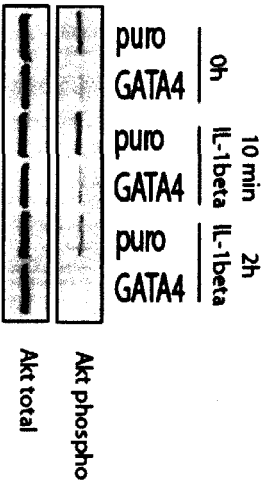
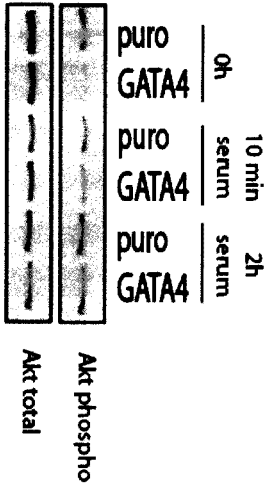


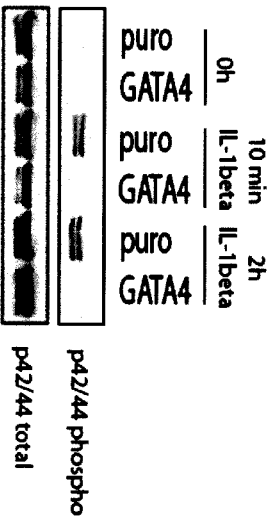
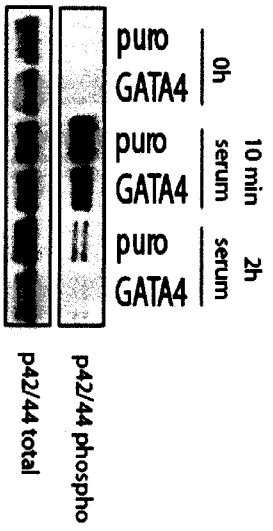
Figure 10 : GATA-4 inhibe l'activité de p42/p44 et d'Akt dans les IEC-6 en condition inflammatoire

Immunobuvardage de type Western d'extraits de cellules IEC-6 contrôle ou surexprimant GATA-4, traitées avec sérum ou IL-1 β avec des anticorps contre p42/p44 total ou p42/p44 phosphorylé (A) (n = 2), et contre Akt total et Akt phosphorylé (B) (n = 1).

B



A



1.2 GATA-4 induit des changements dans la liaison à l'ADN et dans la nature des complexes protéiques des facteurs C/EBPs, AP-1 et NF- κ B

1.2.1 GATA-4 induit la formation de complexes C/EBPs de hauts poids moléculaires et diminue les isoformes C/EBP β et C/EBP δ à l'ADN

Pour mieux comprendre comment GATA-4 influence l'interaction des C/EBPs avec l'ADN dans les IEC-6 dans un contexte inflammatoire, des extraits protéiques nucléaires provenant de cellules IEC-6 surexprimant ou non GATA-4, et traitées ou non à l'IL-1 β , ont été analysées par gel de rétention en utilisant une sonde radiomarquée représentant une séquence d'ADN consensus présente au promoteur de l'haptoglobine et liant les C/EBPs (Figure 11). Dans les cellules contrôle, une stimulation de quatre heures à l'IL-1 β induit une augmentation de la liaison des complexes C/EBPs à l'ADN et l'augmentation de la liaison des isoformes C/EBP β et C/EBP δ est montrée par surétention. Une surexpression de GATA-4 entraîne la formation de complexes protéiques de hauts poids moléculaires et diminue l'expression des isoformes C/EBP β et C/EBP δ . Une surexpression de GATA-4 dans les IEC-6 induit une diminution de l'expression de C/EBP β et de C/EBP δ (TURGEON *et al.*, 2008). La présence des complexes C/EBPs de hauts poids moléculaires pourrait s'expliquer par une plus grande présence d'isoformes C/EBP α par rapport aux isoformes C/EBP β et C/EBP δ dans les complexes liés à l'ADN, tel que rapporté au laboratoire précédemment (non montré).

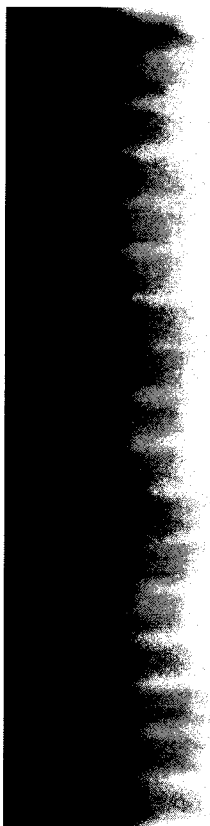
1.2.2 GATA-4 augmente la liaison à l'ADN de base des facteurs AP-1 et induit la formation de complexes protéiques de hauts poids moléculaires

Pour mieux comprendre comment GATA-4 influence l'interaction des facteurs AP-1 avec l'ADN dans les IEC-6 en contexte inflammatoire, des extraits de protéines nucléaires de cellules IEC-6 surexprimant ou non GATA-4, et traitées ou non à l'IL-1 β , ont été analysés par gel de rétention en utilisant une sonde représentant un site consensus capable de lier les membres de la famille AP-1 (Figure 12). Une stimulation de quatre heures à l'IL-1 β induit une augmentation de la liaison des complexes AP-1 à l'ADN. Une surexpression de GATA-4 induit une liaison accrue des facteurs AP-1 à l'ADN et favorise la formation de complexes protéiques de hauts poids moléculaires. La présence accrue de l'isoforme cJun à l'ADN causée par la surexpression de GATA-4 a été observée par surétention. Les isoformes cFos et junB n'ont pu être mis en évidence par surétention.

Figure 11 : GATA-4 induit la formation de complexes C/EBPs de hauts poids moléculaires et diminue le recrutement des isoformes C/EBP β et C/EBP δ à l'ADN dans les IEC-6 en condition inflammatoire

Une sonde radiomarquée contenant un site de liaison des C/EBPs du promoteur de l'haptoglobine a été mélangée à des extraits nucléaires de cellules IEC-6 contrôle ou surexprimant GATA-4, stimulées ou non avec de l'IL-1 β . Des anticorps contre C/EBP α , C/EBP β ou C/EBP δ ont été ajoutés dans les expériences de surétention. (n = 1).

Non-spécifique



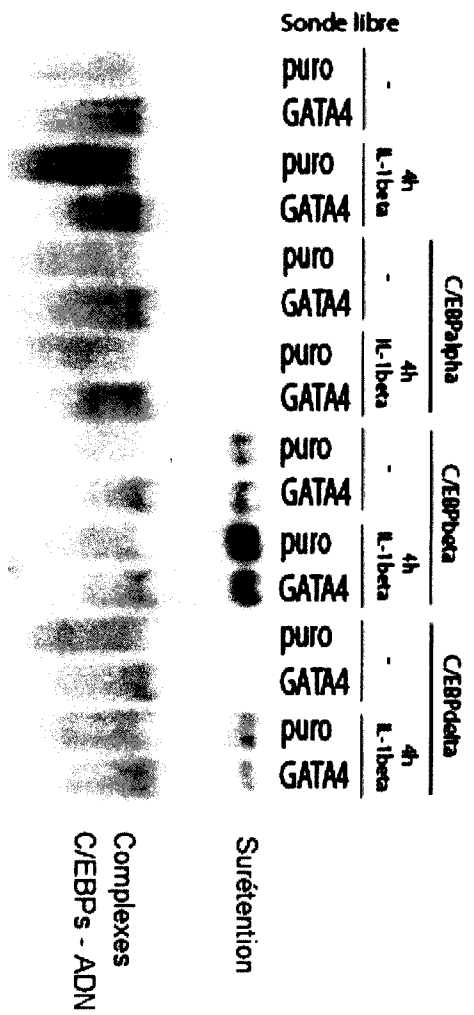
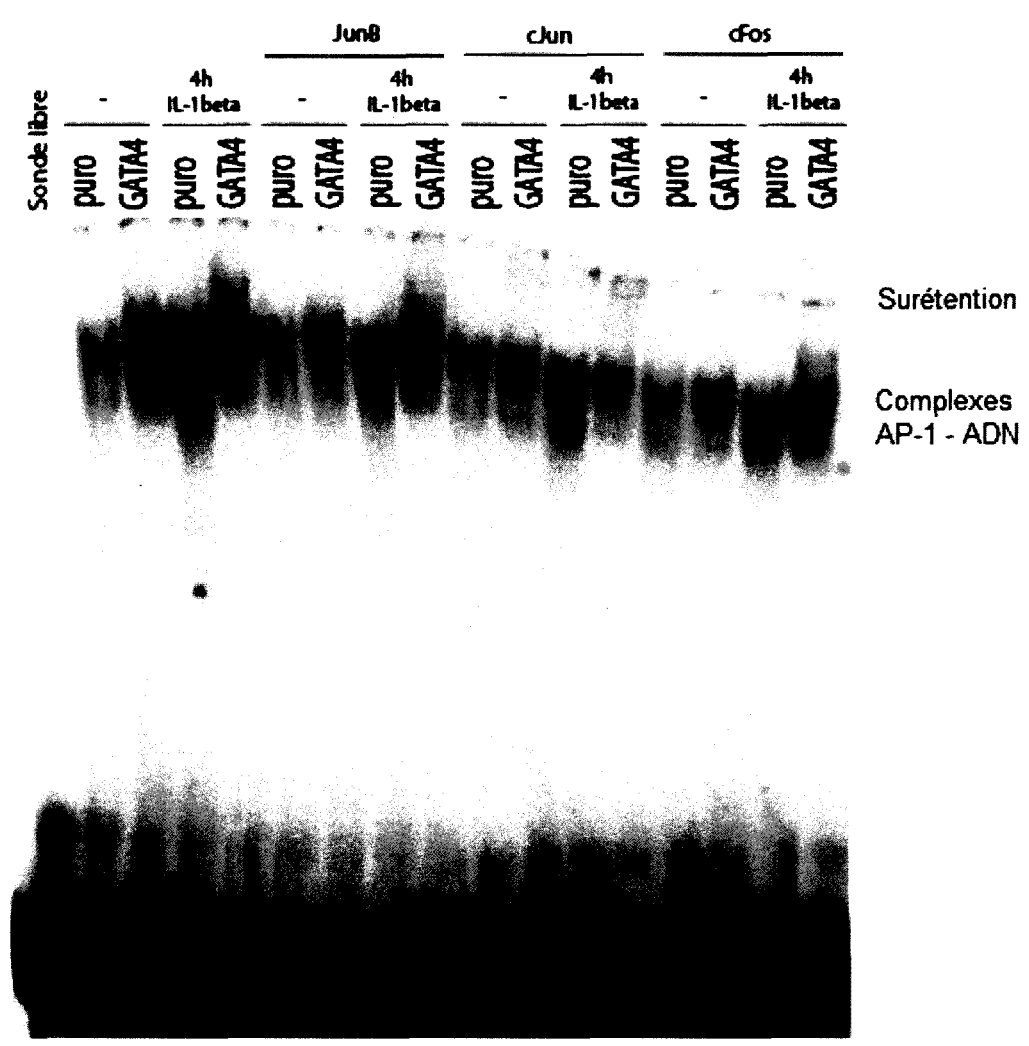


Figure 12 : GATA-4 induit une augmentation de la liaison de base des facteurs AP-1 à l'ADN et induit la formation de complexes de hauts poids moléculaires dans les IEC-6 en condition inflammatoire

Une sonde radiomarquée contenant un site de liaison de AP-1 a été mélangée à des extraits nucléaires de cellules IEC-6 contrôle ou surexprimant GATA-4, stimulées ou non avec de l'IL-1 β . Des anticorps contre junB, cJun et cFos ont été ajoutés dans les expériences de surétention (n = 2).



1.2.3 GATA-4 augmente la liaison à l'ADN de NF- κ B en induisant p50 et p65 ainsi qu'un troisième facteur capable d'interagir avec p65 pour former des complexes de hauts poids moléculaires

Pour mieux comprendre comment GATA-4 influence l'interaction de NF- κ B avec l'ADN dans les IEC-6 en contexte inflammatoire, des extraits de protéines nucléaires de cellules IEC-6 surexprimant ou non GATA-4, et traitées ou non à l'IL-1 β , ont été analysés par gel de rétention en utilisant une sonde représentant un site consensus capable de lier NF- κ B (Figure 13). La présence de facteurs NF- κ B à l'ADN n'est pas détectable en condition non-inflammatoire. Une stimulation de trente minutes à l'IL-1 β induit le recrutement des complexes NF- κ B à l'ADN. Dans les cellules IEC-6 contrôle, les dimères principaux retrouvés à l'ADN suite à un traitement à l'IL-1 β sont p50/p65 et p50/p50. La surexpression de GATA-4 augmente la liaison à l'ADN de NF- κ B. L'induction de la liaison à l'ADN des isoformes p50 et p65 est observable par surétention. La surexpression de GATA-4 entraîne également des changements dans la composition des complexes. Ceux-ci sont presque complètement retardés suite à l'ajout d'anticorps dirigés contre p65, et partiellement retardés suite à l'ajout d'anticorps dirigés contre p50, suggérant que la quasi-totalité des complexes NF- κ B présents dans les cellules surexprimant GATA-4 contiennent du p65, mais une fraction de ceux-ci seulement contiennent du p50. Cette observation suggère qu'un troisième facteur, membre de la famille NF- κ B ou pas, pourrait remplacer partiellement p50 et complexer avec p65 pour former des complexes protéiques de hauts poids moléculaires. L'ajout d'anticorps GATA-4 n'entraîne aucun retard de migration des complexes, suggérant que GATA-4 n'est pas ce troisième facteur.

1.3 GATA-4 module l'expression des ARNm de CCL5 et d'iNOS

Dans le but de déterminer si la surexpression de GATA-4 peut engendrer des modulations dans l'expression de gènes pro-inflammatoires, des extraits d'ARNm totaux de cellules IEC-6 surexprimant ou non GATA-4 et traitées ou non avec de l'IL-1 β , ont été analysés par RT-PCR semi-quantitatif (Figure 14). Une stimulation de deux heures à l'IL-1 β induit l'expression des ARNm de CCL2, CXCL2, CXCL10, CCL5 et iNOS. Une surexpression de GATA-4 engendre une baisse des niveaux induits d'ARNm de CCL5 et d'iNOS, mais pas de CCL2, CXCL2 et CXCL10.

Figure 13 : GATA-4 augmente la liaison à l'ADN de NF- κ B en induisant p50 et p65 ainsi qu'un troisième facteur capable d'interagir avec p65 pour former des complexes de hauts poids moléculaires dans les IEC-6 en condition inflammatoire

Une sonde radiomarquée contenant un site de liaison de NF- κ B a été mélangée à des extraits nucléaires de cellules IEC-6 contrôle ou surexprimant GATA-4, stimulées ou non avec de l'IL-1 β . Des anticorps contre p65, p50 et GATA-4 comme contrôle, ont été ajoutés dans les expériences de surétention. Les deux complexes NF- κ B sont indiqués (n = 1).

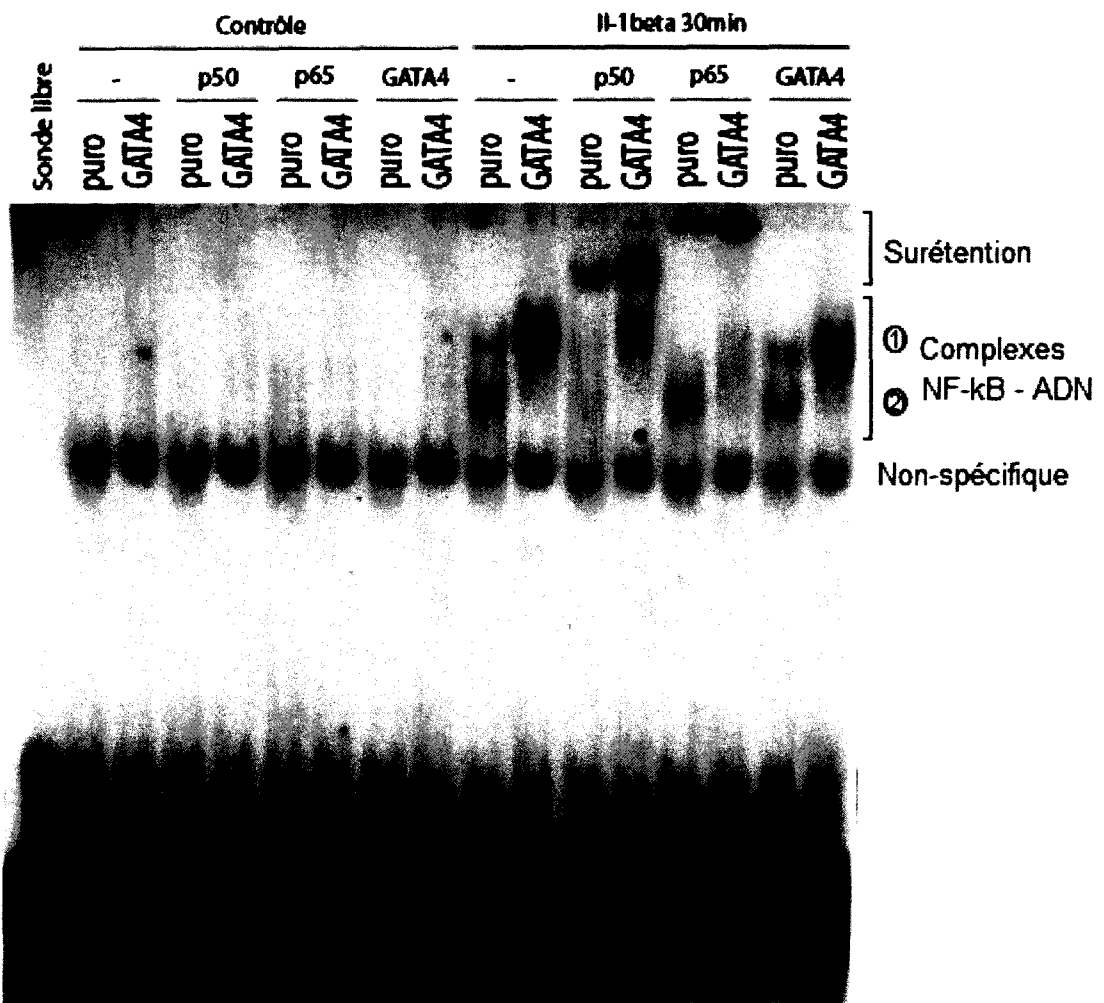
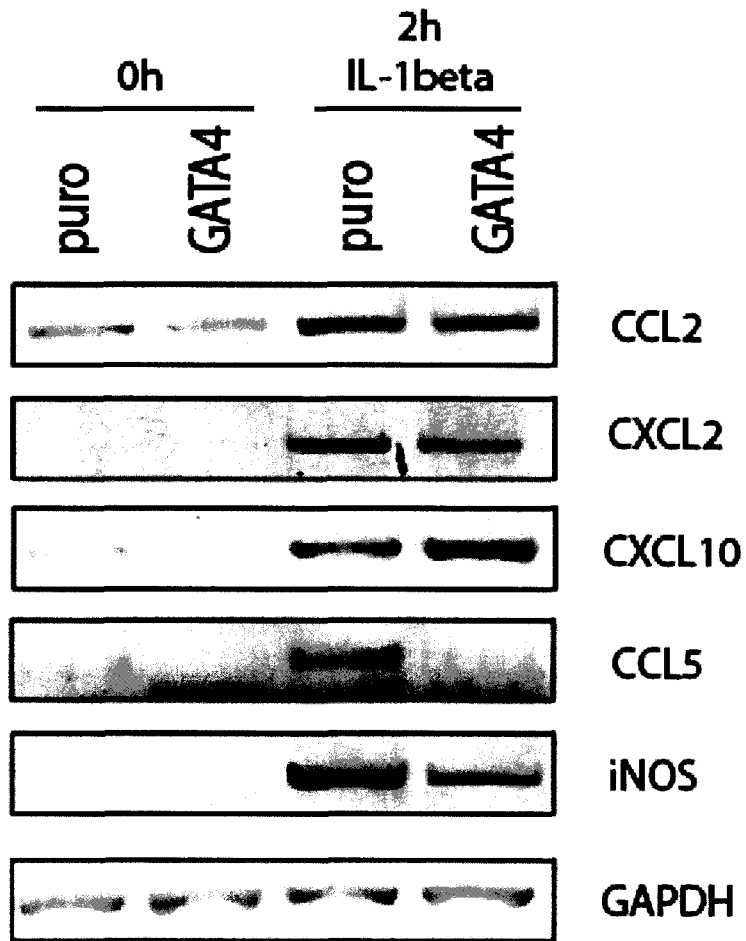


Figure 14 : GATA-4 module l'expression des ARNm de CCL5 et d'iNOS

Une reverse transcription a été effectuée sur des ARNs totaux provenant de cellules IEC-6 contrôle ou surexprimant GATA-4. L'ADNc a été utilisé pour des réactions de polymérisation en chaîne avec des oligonucléotides spécifiques aux gènes CCL2 (n = 4), CXCL2 (n = 3), CXCL10 (n = 4), CCL5 (n = 4), iNOS (n = 2) et GAPDH comme contrôle de quantité d'ARN.



2. Développement et validation des mutants de GATA-4

Dans le but de mieux caractériser les mécanismes par lesquels GATA-4 module la réponse inflammatoire intestinale, plusieurs mutants de GATA-4 ont été générés et caractérisés. Au cours de mon passage au laboratoire, j'ai pu effectuer une partie de la caractérisation. D'autres études seront nécessaires dans le futur afin de compléter leur caractérisation et de pouvoir étudier leur implication dans la réponse inflammatoire intestinale.

2.1 Surexpression des mutants de GATA-4

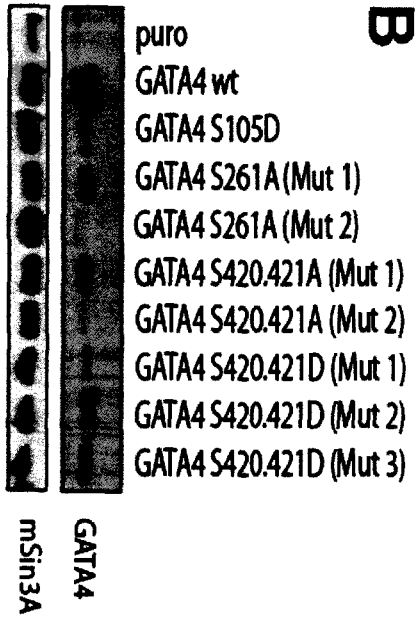
Les mutants de GATA-4 développés ont été produits par réactions de PCR tel que décrit dans la section « matériel et méthodes ». Les constructions validées sur gel d'agarose et par séquençage ont été surexprimées par transfection transitoire dans des HEK 293T et/ou par infections stables dans des cellules IEC-6. Des extraits protéiques nucléaires ont été analysés par immunobuvardage de type Western afin de valider la surexpression des mutants de GATA-4 (Figure 15). Les mutants GATA-4 délétés pour les deux doigts de zinc séparément ($\Delta 216-240$ et $\Delta 270-294$), le mutant délété pour la région basique ($\Delta 294-336$), le mutant délété pour la région riche en sérines ($\Delta 351-360$), ainsi que les mutants S261D et S105A sont exprimés suivant une infection rétrovirale dans les IEC-6. L'expression du mutant GATA-4 délété pour les deux doigts de zinc ($\Delta 216-294$) n'est pas détectée (Figure 15A). Les mutants spécifiques S105D, S261A, S420.421A et S420.421D ont été transfectés dans les HEK 293T et leur expression a été confirmée par immunobuvardage de type Western. Le mutant GATA-4 S105D est faiblement exprimé. Les mutants S261A, S420.421A et S420.421D sont quant à eux exprimés plus fortement (Figure 15B). Le clonage de ces mutants dans le vecteur d'expression pBabepuro sera nécessaire afin de pouvoir effectuer des infections stables dans des IEC-6 et ainsi poursuivre le processus de caractérisation.

2.2 Liaison à l'ADN des mutants de GATA-4

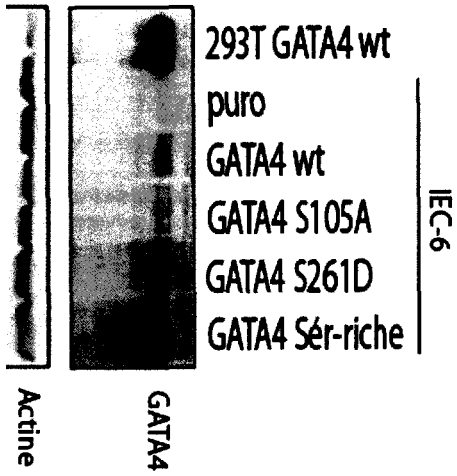
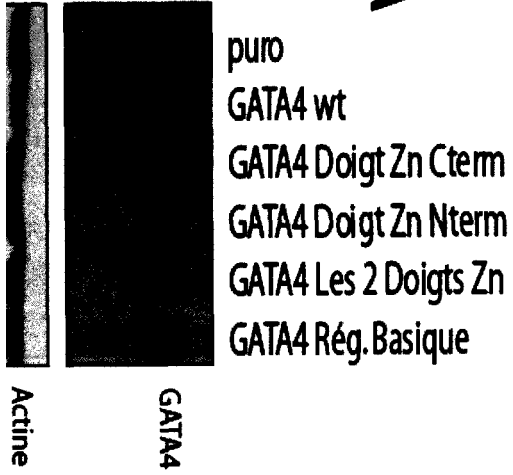
Afin d'étudier la liaison à l'ADN des mutants de GATA-4 délétés pour les deux doigts de zinc ensemble ($\Delta 216-294$) ou séparément ($\Delta 216-240$ et $\Delta 270-294$), pour la région basique ($\Delta 294-336$) et pour la région riche en sérines ($\Delta 351-360$), des extraits de protéines nucléaires de cellules IEC-6 surexprimant ces mutants ont été analysés par gel de rétention

Figure 15 : Surexpression des mutants de GATA-4

A. Immunobuvardage de type Western d'extraits de cellules IEC-6 contrôle ou surexprimant GATA-4 de type sauvage, ou le mutant délété pour le doigt de zinc C-terminal ($\Delta 270-294$), le doigt de zinc N-terminal ($\Delta 216-240$), les deux doigts de zinc ($\Delta 216-294$), la région basique ($\Delta 294-336$), la région riche en sérines ($\Delta 351-360$), ou les mutants spécifiques S105A et S261D, effectués avec des anticorps contre GATA-4 et l'actine comme contrôle des niveaux de protéines. B. Immunobuvardage de type Western d'extraits de cellules HEK 293T contrôle ou surexprimant GATA-4 de type sauvage, ou les mutants spécifiques S105D, S261A, S420.421A et S420.421D, avec des anticorps contre GATA-4 et mSin3A comme contrôle des niveaux de protéines.



A



en utilisant une sonde radiomarquée représentant le site B2 du promoteur de l'AGP capable de lier GATA-4 (Figure 16). Le résultat montre que les mutants des doigts de zinc $\Delta 216-240$ et $\Delta 270-294$, de la région riche en sérines ($\Delta 351-360$) et de la région basique ($\Delta 294-336$) lient l'ADN, tel que déterminé par l'augmentation relative du complexe retenu par l'anticorps en comparaison des extraits contrôle.

2.3 Aspect microscopique des mutants de GATA-4

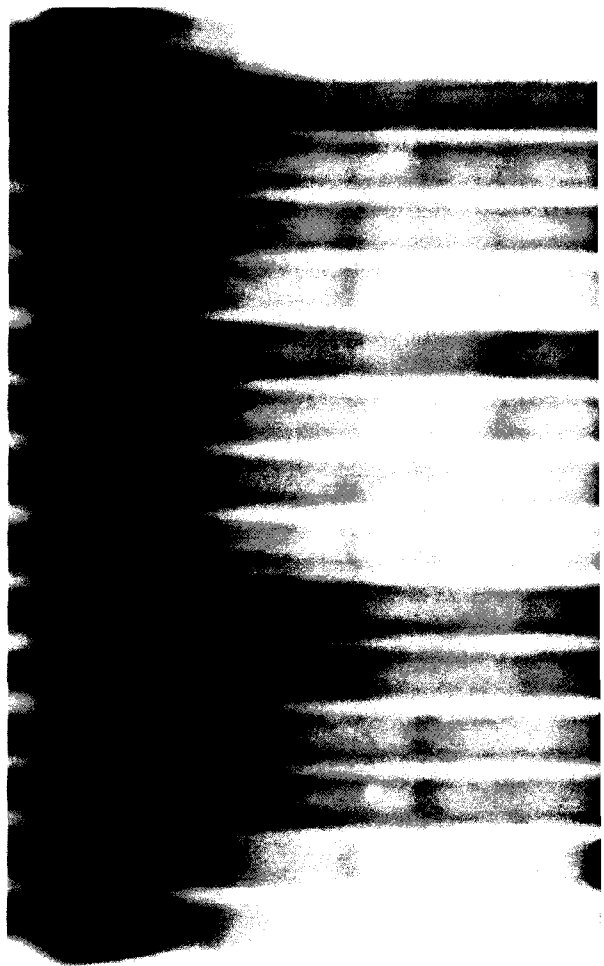
Afin de déterminer si la surexpression des différents mutants de GATA-4 pouvait conduire à l'apparition de phénotypes différents que celui associé à la surexpression de GATA-4 de type sauvage, les lignées IEC-6 surexprimant de façon stable les mutants délétés pour les deux doigts de zinc séparément ($\Delta 216-240$ et $\Delta 270-294$) et pour la région basique ($\Delta 294-336$) ont été observées par microscopie en contraste de phase. Le mutant délété pour les deux doigts de zinc ensemble ($\Delta 216-294$) a été observé comme contrôle négatif, puisque le mutant n'est pas exprimé (Figure 17). Les cellules surexprimant GATA-4 atteignent une densité de saturation plus élevée (non montré). Contrairement aux cellules IEC-6 contrôle, elles sont plus réfringentes, semblent plus épaisses et sont délimitées de façon plus nette. L'adhésion des cellules entre elles est aussi augmentée suite à l'expression de GATA-4. De façon intéressante, l'aspect des cellules exprimant le mutant de GATA-4 délété pour la région basique ($\Delta 294-336$) est semblable à celui des cellules IEC-6 contrôle et des cellules $\Delta 216-294$ (contrôle négatif). Les cellules IEC-6 surexprimant le mutant GATA-4 délété pour le doigt de zinc en N-terminal ($\Delta 216-240$) sont plus réfringentes, mais ont un aspect plus étiré qui ressemble à des cellules fibroblastiques, contrairement aux cellules exprimant le mutant avec le doigt de zinc C-terminal délété ($\Delta 270-294$), qui ressemblent aux cellules GATA-4.

2.4 Temps de doublement des mutants de GATA-4

Lors de la culture des mutants de GATA-4, il était possible de remarquer des différences dans les vitesses de prolifération. Pour quantifier ces différences, des essais de prolifération ont été effectués sur les mutants de GATA-4 délétés pour les deux doigts de zinc séparément ($\Delta 216-240$ et $\Delta 270-294$), pour la région basique ($\Delta 294-336$) et pour les mutants spécifiques S105A et S261D. Le temps de doublement de ces mutants a été calculé tel que décrit dans la section « matériel et méthodes » et sont présentés dans le tableau 6. Les résultats montrent que la vitesse de prolifération est accrue en présence de

Figure 16 : Liaison à l'ADN des mutants de GATA-4

Une sonde radiomarquée contenant un site de liaison B2 du promoteur de l'AGP liant GATA-4 a été mélangée à des extraits nucléaires de cellules IEC-6 contrôle ou surexprimant GATA-4 de type sauvage ou les différents mutants de délétion de GATA-4. Des anticorps contre GATA-4 ont été ajoutés dans les expériences de surétention (n = 1).



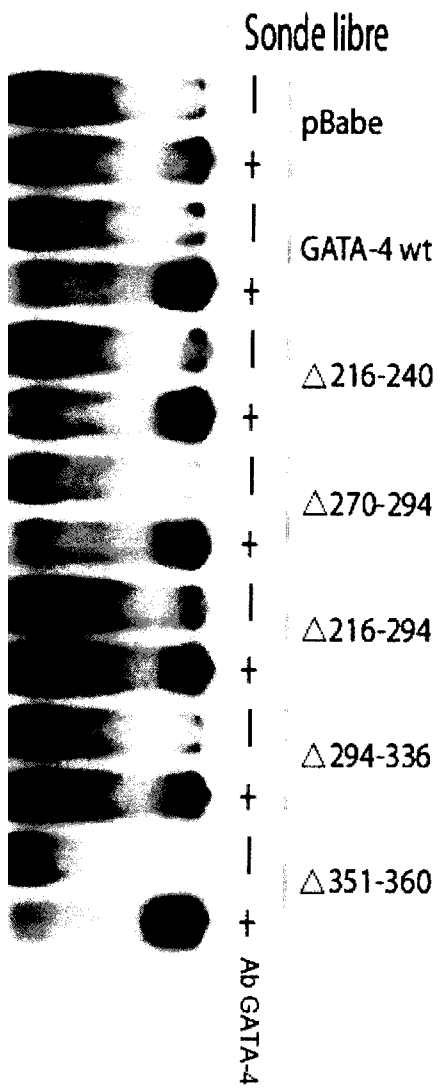
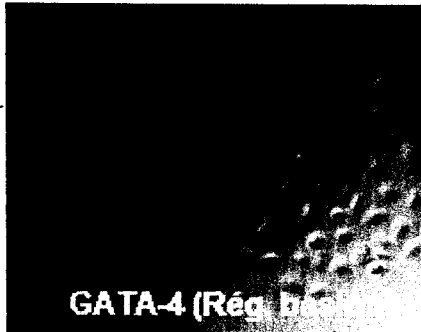
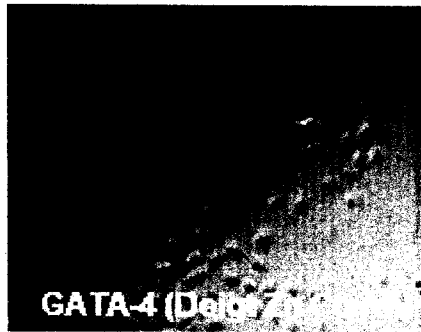
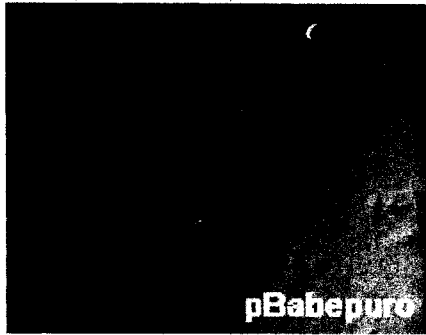


Figure 17 : Aspect microscopique des mutants de GATA-4

Les cellules IEC-6 contrôle, ou surexprimant GATA-4 de type sauvage ou certains mutants de délétion, ont été observées par microscopie à contraste de phase (grossissement 40 X).



GATA-4 et des mutants des doigts de zinc pris séparément. Par contre, le temps de doublement des cellules exprimant le mutant $\Delta 294-336$ (région basique) est augmenté, et intermédiaire entre celui des cellules GATA-4 et celui des cellules contrôle. Finalement le temps de doublement des cellules exprimant les mutants S105A et S261D est légèrement plus rapide que celui des cellules exprimant GATA-4 de type sauvage. Il est à noter que cette approche de mesure du temps de doublement donne des durées plus longues que celles obtenues par comptage manuel, mais les différences entre mutants sont respectées (non montré).

Tableau 6 : Temps de doublement des mutants de GATA-4

Délétion	Mutant	Temps de doublement (h)
pBabepuro	-	41,2
GATA-4 wt	Type sauvage	31,1
GATA-4 $\Delta 216-240$	Doigt Zn N-terminal	30,2
GATA-4 $\Delta 270-294$	Doigt Zn C-terminal	32,4
GATA-4 $\Delta 294-336$	Région basique	37,0
GATA-4 S105A	Site Erk	28,4
GATA-4 S261D	Site PKA	26,9

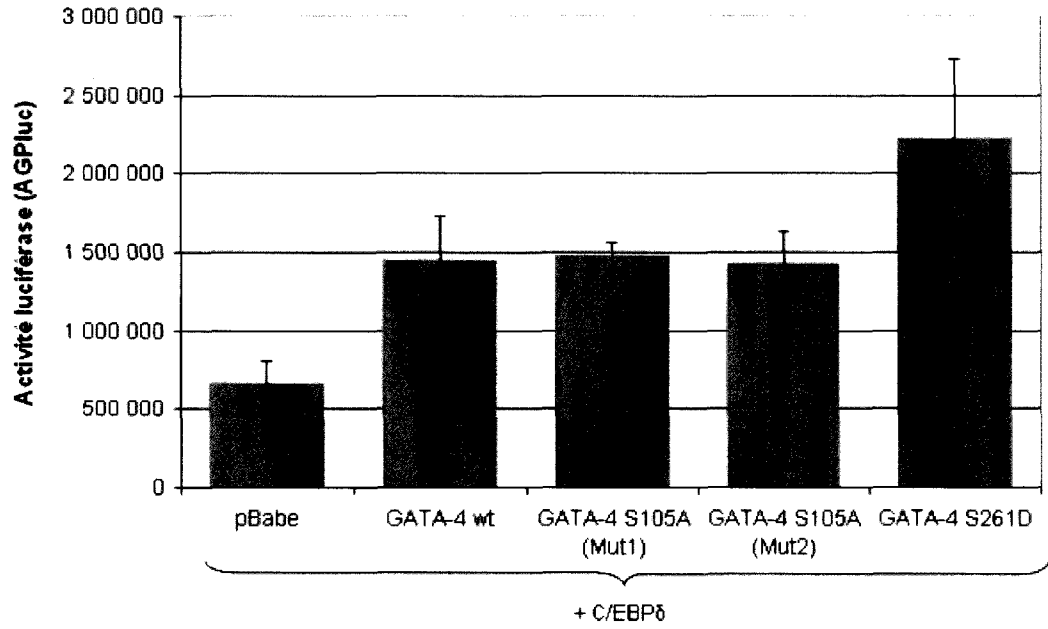
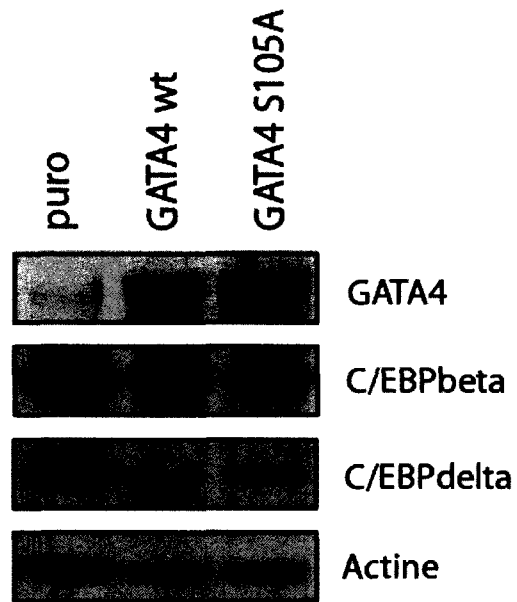
2.5 Activité transcriptionnelle de GATA-4 S105A et S261D

L'activité des mutants S105D et S261A a été mesurée par essai luciférase en utilisant des extraits totaux de cellules HEK293T dans lesquelles ont été cotransfectés les mutants GATA-4 S105A ou S261D avec l'isoforme C/EBP δ , connu pour activer synergistiquement avec GATA-4 l'expression d'AGP. (Figure 18). Tel que montré sur la figure 18A, une cotransfection du mutant S105A de GATA-4 avec C/EBP δ n'entraîne aucune modification significative de l'expression d'AGP comparativement à GATA-4 de type sauvage (environ 3 fois). Toutefois, une cotransfection du mutant S261D de GATA-4 avec C/EBP δ entraîne une augmentation de la transactivation du promoteur AGP (environ 4 fois), suggérant un rôle possible de la phosphorylation sur la sérine 261 de GATA-4 par la PKA dans le contrôle de l'expression C/EBP- et GATA-4-dépendante de l'ARNm

d'AGP. Ce résultat devra être confirmé en utilisant un contrôle de transfection comme SV40 renilla. D'autre part, considérant l'impact négatif d'une surexpression de GATA-4 sur l'expression des C/EBPs (TURGEON *et al.*, 2008), nous avons vérifié si le mutant S105A pouvait aussi moduler l'expression des C/EBPs. Tel que démontré dans la figure 18B, la surexpression de GATA-4 ou de GATA-4 S105A dans les IEC-6 entraîne une diminution de l'expression de C/EBP β et de C/EBP δ .

Figure 18 : Activité des mutants de GATA-4

(A) Des extraits de cellules HEK 293T transfectées avec des vecteurs d'expression de C/EBP δ avec ou sans GATA-4, S105A et S261D, et avec le gène rapporteur AGP-luciférase, ont été utilisés afin de mesurer l'activité transcriptionnelle par essai luciférase (n = 1). (B) Immunobuvardage de type Western d'extraits de protéines nucléaires de cellules IEC-6 contrôle ou surexprimant GATA-4 de type sauvage ou le mutant S105A, avec des anticorps contre GATA-4, C/EBP β , C/EBP δ et actine comme contrôle de la quantité de protéines (n = 1).

A**B**

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1. GATA-4 module la réponse inflammatoire intestinale chez le rat

Les premiers indices nous permettant de suspecter un rôle de GATA-4 dans la réponse inflammatoire intestinale nous proviennent d'analyses d'essais de micropuces à ADN montrant qu'une surexpression de GATA-4 dans les IEC-6 module l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Sachant que les C/EBPs jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire intestinale (BOUDREAU *et al.*, 1998 ; PELLETIER *et al.*, 1998 ; GHEORGHIU *et al.*, 2001), et qu'ils peuvent interagir avec certains membres de la famille GATA (YAMAGUCHI *et al.*, 1999 ; TONG *et al.*, 2005), les premières investigations effectuées dans notre laboratoire sur l'implication de GATA-4 dans la réponse inflammatoire étaient de déterminer si les C/EBPs pouvaient y être impliqués. Notre laboratoire a montré d'une part que GATA-4 peut interagir physiquement avec les C/EBPs dont C/EBP δ et moduler la réponse inflammatoire C/EBP-dépendante en affectant leur expression protéique et en modulant l'expression de gènes de réponse inflammatoires C/EBP-dépendants comme l'AGP, le thiostatin et l'haptoglobine (TURGEON *et al.*, 2008). Le premier objectif de mon projet de maîtrise consistait à déterminer si GATA-4 pouvait moduler la réponse inflammatoire induite par l'IL-1 β dans les IEC-6 par d'autres voies cellulaires.

1.1 GATA-4 affecte de façon sélective la phosphorylation des MAPK et d'Akt

L'effet d'une surexpression de GATA-4 sur la phosphorylation des MAPK et d'Akt a été mesuré, considérant l'importance de ces voies de signalisation dans plusieurs processus cellulaires, incluant la réponse au stress et la réponse inflammatoire. Mes résultats démontrent qu'une surexpression de GATA-4 dans les IEC-6 conduit à une diminution de la phosphorylation IL-1-dépendante de p42/p44 et d'Akt, mais pas de celle de Jnk et de p38. Ces résultats suggèrent que GATA-4, en modulant la réponse inflammatoire, n'affecte pas p38 ou Jnk, les principales MAPK impliquées dans la réponse au stress (WHITMARSH et DEVIS, 1996 ; KYRIAKIS et AVRUCH, 1996 ; IP et DAVIS, 1998), mais aurait plutôt un rôle répresseur sur p42/p44 et Akt, des protéines connues davantage pour leur rôles dans la prolifération et la survie cellulaire (JOHNSON et LAPADAT,

2002 ; TOKUNAGA *et al.*, 2008) mais pouvant également être impliquées dans la réponse inflammatoire (IMBE *et al.*, 2008 ; VERHAEGHE *et al.*, 2007 ; IMBE *et al.*, 2005 ; (KIDD *et al.*, 2008 ; ZHANG *et al.*, 2007 ; SCHABBAUER *et al.*, 2004). Un des rôles possibles de GATA-4 pourrait donc être d'inhiber la réponse inflammatoire dans les cellules épithéliales intestinales face à certains types de stimuli en inhibant la voie p42/p44. Pour sa part, la voie de signalisation PI3-K/Akt est associée à un état anti-inflammatoire. Il est donc possible de croire qu'une surexpression de GATA-4 augmente la réponse inflammatoire en inhibant la voie Akt. Il est aussi important de rappeler qu'une surexpression de GATA-4 dans les IEC-6 mène à un phénotype hyperprolifératif. Ce faisant, si les voies p42/p44 et Akt, deux voies importantes pour la prolifération et la survie cellulaire, sont affectées négativement par GATA-4, d'autres voies et mécanismes pro-prolifératifs et/ou anti-apoptotiques devraient également être induits pour justifier le phénotype hyperprolifératif des cellules IEC-6 surexprimant GATA-4. En provoquant une diminution de la phosphorylation de p42/p44 et d'Akt, GATA-4 semble inhiber deux voies de signalisation ayant des effets sur la réponse inflammatoire. Même si nous pouvons supposer que GATA-4 pourrait accomplir certaines tâches contradictoires lors de la réponse inflammatoire, d'autres investigations sont nécessaires pour le confirmer. Il serait entre autre important de valider l'inhibition ou l'activation de ces voies par des mécanismes complémentaires tels que l'observation de l'expression de gènes cibles ainsi que l'activation d'autres protéines de la voie de signalisation Erk ou Akt. De plus, comme il est fréquemment rapporté dans la littérature, GATA-4 accomplit plusieurs de ses actions en se liant à différents cofacteurs capables de moduler son activité. Il est donc possible que certains de ces facteurs puissent intervenir dans la modulation GATA-4 dépendante de la réponse inflammatoire et qu'au final, même si on observe une baisse de phosphorylation pour p42/p44 et Akt, ces deux voies n'engendrent pas les mêmes réponses que celles répertoriées dans la littérature. Finalement, des résultats préliminaires suggèrent que la phosphorylation de p42/p44 induite par le sérum ou l'IL-1 β est plus importante lorsque les cellules sont sous-confluentes (non montrés). Sachant que GATA-4 stimule la croissance cellulaire, il est possible de croire que l'inhibition de la phosphorylation de p42/p44 et d'Akt observé dans les cellules surexprimant GATA-4 soit due à un effet indirect causée par une augmentation GATA-4-dépendante des contacts cellules-cellules.

1.2 GATA-4 affecte C/EBP et AP-1

Les membres des familles C/EBPs et AP-1 sont d'importants modulateurs positifs de la réponse inflammatoire (POLI, 1998 ; MORIYAMA, 2008) et peuvent interagir physiquement avec GATA-4 (TREMBLAY *et al.*, 2002 ; LAVOIE *et al.*, 2004 ; HERZIG *et al.*, 1997). L'interaction entre GATA-4 et C/EBP δ s'effectue via leurs domaines C-terminaux respectifs (TURGEON *et al.*, 2008). L'interaction entre GATA-4 et AP-1 a été vérifiée au niveau du cœur où ils peuvent s'associer et lier le promoteur du gène du récepteur de l'angiotensine II de type 1a (AT1aR) (HERZIG *et al.*, 1997). Mes résultats ont montré qu'en surexprimant GATA-4 dans les IEC-6 traitées à l'IL-1 β , les facteurs AP-1 et C/EBPs sont davantage recrutés à l'ADN. Aussi, l'analyse des surétentions suggère qu'une surexpression de GATA-4 induit la liaison à l'ADN de cJun, alors que celle des isoformes C/EBP β et C/EBP δ est diminuée. Ces résultats suggèrent d'une part qu'en affectant la réponse inflammatoire, GATA-4 influence d'autres facteurs de transcription et que cette modulation se fait en partie via la modulation de la liaison à l'ADN de ces facteurs. La diminution de la liaison à l'ADN des isoformes C/EBP β et C/EBP δ est probablement causée par une baisse d'expression protéique de ces facteurs tel que rapporté précédemment (TURGEON *et al.*, 2008). Le fait de générer des facteurs de hauts poids moléculaires autant chez AP-1 que chez les C/EBPs suggère que dans les deux cas, la surexpression de GATA-4 engendre des changements dans la nature des complexes. Peut-être que GATA-4 lui-même, étant connu pour interagir physiquement avec AP-1 et C/EBP, pourrait être responsable de ce retard de migration en se liant aux complexes C/EBPs et AP-1, bien que nous n'ayons pas d'évidence à ce sujet. Il est également possible qu'en diminuant l'expression des isoformes C/EBP β et C/EBP δ , une plus grande proportion des complexes soit composée de C/EBP α , une isoforme C/EBP plus lourde.

1.3 GATA-4 affecte NF- κ B

NF- κ B est l'un des facteurs de transcription les plus associés au système immunitaire et à la réponse inflammatoire (NEURATH *et al.*, 1998). Mes résultats suggèrent que la surexpression de GATA-4 dans les IEC-6 traitées à l'IL-1 β affecte la nature des complexes NF- κ B. La liaison à l'ADN des sous-unités p50 et p65 est augmentée. Aucune étude n'a encore mis en évidence une relation directe entre GATA-4 et NF- κ B. Il fut démontré *in vivo* que la crocétine, un caroténoïde retrouvé dans les fleurs de safran et qui

possède certaines propriétés anti-oxydatives, pouvait réprimer l'hypertrophie et l'inflammation associée aux espèces réactives de l'oxygène et que dans ce contexte, GATA-4 et NF- κ B étaient simultanément réprimés. Toutefois, même si ces deux évènements sont coordonnés, aucun lien causal entre eux n'a été proposé. (CAI *et al.*, 2009) L'augmentation GATA-4-dépendante de la liaison à l'ADN des sous-unités p50 et p65 peut être générée de façon directe, par interactions protéiques entre ces deux facteurs ou par effet transcriptionnel, ou indirecte, via l'implication d'autres facteurs. De manière intéressante, un site (A/T)GATA(A/G) est présent sur le promoteur du gène *NFKB1* codant pour p105, le précurseur de p50. Toutefois, ce site n'a jamais été documenté dans la littérature (TEN *et al.*, 1992). Ce promoteur contient néanmoins un site AP-1, ce qui pourrait aussi suggérer qu'une surexpression de GATA-4 puisse moduler à la hausse l'expression de p105/p50 via une augmentation de l'activité d'AP-1 (TEN *et al.*, 1992). Il serait néanmoins important de vérifier si GATA-4 peut directement transactiver le gène *NFKB1*. Finalement, mes résultats démontrent que la quasi-totalité des complexes NF- κ B formés dans les cellules IEC-6 surexprimant GATA-4 sont composés de p65, mais une fraction de ceux-ci seulement est composée de p50, suggérant qu'un troisième facteur remplace partiellement p50 et forme des complexes avec p65. La réalisation d'une surétention par l'ajout d'un anticorps spécifique contre GATA-4 suggère toutefois que GATA-4 n'est pas ce troisième facteur. D'autres études, comme des essais de précipitation à la GST seraient probablement utiles afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'interaction protéique entre GATA-4 et les membres NF- κ B. Si tel est le cas, il est alors possible de supposer que GATA-4, par effet transcriptionnel, induit l'expression d'un facteur capable de former des complexes avec certaines sous-unités NF- κ B. Ensemble, ces résultats mettent en évidence des changements dans la nature des complexes NF- κ B attribuables à une surexpression de GATA-4. Toutefois, il est impossible à l'heure actuelle de bien saisir les mécanismes par lesquels GATA-4 module NF- κ B.

1.4 GATA-4 affecte l'expression des gènes pro-inflammatoires *CCL5* et *iNOS*

La mesure de l'expression de différents gènes pro-inflammatoires a été effectuée afin de déterminer si une surexpression de GATA-4 conduit également à des effets transcriptionnels en aval. Parmi les différents gènes étudiés, nous avons observé que *CCL5* et *iNOS* étaient réprimés par une surexpression de GATA-4. *CCL5* est une chimiokine capable de recruter les cellules T, dendritiques, éosinophiles, NK, basophiles

et les mastocytes aux sites d'inflammation (LEVY, 2009). Son promoteur possède des sites « interferon-stimulated responsive element » (ISRE), « cyclic AMP-responsive element » (CRE), « nuclear factor-interleukin 6 » (NF-IL-6) et deux sites NF- κ B (KUDO *et al.*, 2005). C/EBP, AP-1 et NF- κ B peuvent s'y lier et induire son expression (POCOCK *et al.*, 2003). Pour sa part, iNOS est une enzyme d'expression inductible en réponse à divers stimuli inflammatoires qui synthétise l'oxyde nitrique, un agent aux multiples rôles, dont celui de médiateur en condition inflammatoire (KEKLIKOGLU *et al.*, 2008 ; DAGHIGH *et al.*, 2002). Le promoteur d'iNOS possède des sites de liaison pour NF- κ B, AP-1, C/EBP, CREB et STAT (AKTAN, 2004). Ces résultats nous permettent de supposer que même si GATA-4 semble affecter de façon positive la liaison à l'ADN des facteurs de transcription C/EBP, AP-1 et NF- κ B, GATA-4 induit une répression de la réponse inflammatoire démontrée par la répression de deux gènes CCL5 et iNOS pouvant être transactivés par C/EBP, AP-1 et NF- κ B. Nous pouvons supposer que l'inhibition de ces deux gènes est en partie causée par l'effet de GATA-4 sur les C/EBPs, qui en sont d'importants régulateurs. Il serait intéressant d'analyser l'expression d'autres cibles qui ne soient pas contrôlées par les C/EBPs avant d'envisager l'importance des autres voies modulées par GATA-4 dans le contrôle de l'expression de gènes de réponse inflammatoire.

1.5 Conclusions

En surexprimant GATA-4 dans les IEC-6, nous avons pu remarquer que la phosphorylation de p42/p44 et d'Akt était inhibée. L'activation de la voie p42/p44 conduit habituellement à un état pro-inflammatoire alors que celle d'Akt, à un état anti-inflammatoire. Si dans le modèle cellulaire utilisé pour mon projet, p42/p44 et Akt agissent de façon similaire à ce qui rapporté, alors GATA-4, en inhibant ces deux voies, engendrerait des effets contraires sur l'inflammation, l'induisant d'une part via l'inhibition d'Akt, et l'inhibant d'autre part, en inhibant la voie p42/p44. Il serait important de valider ces résultats et surtout de déterminer si ces baisses de phosphorylation de p42/p44 et d'Akt coïncident avec une inhibition de ces voies de signalisation. D'autre part, la surexpression de GATA-4 induirait la liaison à l'ADN des facteurs C/EBP, AP-1 et NF- κ B tout en provoquant des changements vers des complexes de plus hauts poids moléculaires. Je crois que même si on observe une augmentation de la liaison à l'ADN de ces facteurs, la réponse inflammatoire est inhibée comme le suggère

l'inhibition de l'expression de CCL5 et iNOS. D'autres gènes, comme celui de l'IL-8 peuvent être transactivés par C/EBP, AP-1, NF-κB, ou par des sous-groupes de ces régulateurs (HOFFMANN *et al.*, 2002). Il serait intéressant de déterminer si GATA-4 affecte négativement leur expression.

2. Production et caractérisation des mutants de GATA-4

Le deuxième objectif de mon projet de maîtrise consistait à générer des mutants de GATA-4 afin de déterminer l'importance des différents domaines protéiques et sites spécifiques de GATA-4 dans la modulation de la réponse inflammatoire. Certains mutants de GATA-4 ont déjà été présentés dans la littérature. Par exemple, il a été montré que GATA-4 peut partiellement remplacer GATA-3 dans le développement des cellules T dans le thymus, mais transactive moins efficacement certaines cytokines telles que l'IL-13 (PAI *et al.*, 2008). La substitution de la proline 321 de GATA-4 par son équivalent méthionine chez GATA-3 augmente considérablement l'expression de l'IL-13 (PAI *et al.*, 2008). Les mutants K311A, K318A, K320A et K322A de GATA-4, comparativement au type sauvage, sont incapables de lier p300, ce qui induit une diminution de l'expression d'ANF et ET-1 (TAKAYA *et al.* 2008). Les souris mutantes GATA-4^{ki/ki} possèdent une protéine GATA-4 avec une mutation V217G. Cette mutation empêche l'interaction entre GATA-4 et FOG-2 et est létale au stade embryonnaire (CRISPINO *et al.*, 2001). Pour ma part, j'ai pu générer dans le vecteur pBabepuro les mutants spécifiques S105A et S261D ainsi que les mutants de délétion pour le doigt de zinc N-terminal (Δ216-240) et C-terminal Δ270-294, la région basique (Δ294-336) et la région riche en sérines (Δ351-360) avec lesquels j'ai pu obtenir quelques résultats de caractérisation. Dans le vecteur pCDNA3, j'ai pu générer les mutants spécifiques S105D, S261A, S420.421A et S420.421D, pour lesquels un clonage dans pBabepuro suivi d'infections stables dans les IEC-6 seront nécessaires afin de poursuivre la caractérisation.

2.1 Expression protéique des mutants de GATA-4

L'expression des mutants S105A, S261D, Δ216-240, Δ270-294, Δ294-336 et Δ351-360 dans le vecteur pBabepuro a été observée dans les IEC-6. L'expression des mutants S105D, S261A, S420.421A et S420.421D, obtenus dans le vecteur pCDNA3 a été

observée dans les HEK 293T. L'expression des mutants varie considérablement, et le mutant $\Delta 216-294$ n'a pu être observé et a donc été considéré comme contrôle négatif dans les expériences subséquentes. Cette variabilité s'explique probablement par des efficacités d'infection différentes d'un mutant à l'autre, ou par une instabilité structurale pouvant être provoquée suite à une délétion.

2.2 Aspect microscopique et prolifération des mutants de GATA-4

Des études antérieures sur l'aspect microscopique des cellules IEC-6 surexprimant GATA-4 de type sauvage ont été réalisées au laboratoire. Ces cellules sont plus bombées, elles sont plus épaisses et possèdent des délimitations nettes. En plus d'aller dans le même sens que ces résultats antérieurs, mes résultats montrent que la surexpression du mutant de GATA-4 délété pour le doigt de zinc N-terminal conduit de façon reproductible à un phénotype fibroblastique unique alors qu'une délétion du doigt de zinc C-terminal n'entraîne aucun changement significatif. Ces résultats suggèrent que le doigt de zinc N-terminal de GATA-4 pourrait être important dans le maintien du phénotype des cellules IEC-6 surexprimant GATA-4. Il serait intéressant de vérifier si en surexprimant le mutant de GATA-4 délété pour le doigt de zinc N-terminal ($\Delta 216-240$) l'organisation des cytosquelettes d'actine est altérée, ce qui justifierait l'apparition du phénotype fibroblastique particulier à ces cellules. Il est aussi possible qu'en ne possédant pas le doigt de zinc N-terminal de GATA-4, les cellules IEC-6 entament un processus de transition épithélium-mésenchyme. Il serait intéressant de procéder à des tests de motilité et d'adhésion, ainsi qu'à la vérification de l'expression de certains marqueurs tels que la E-cadhérine, pour valider cette hypothèse. Aussi, il est connu au laboratoire qu'une surexpression de GATA-4 de type sauvage dans les IEC-6 conduit à une augmentation de la vitesse de prolifération. Mes résultats confirment cette tendance et suggèrent que comparativement aux cellules IEC-6 surexprimant GATA-4 de type sauvage, les cellules surexprimant le mutant délété pour la région basique ($\Delta 294-336$) prolifère moins rapidement et que les cellules surexprimant les mutants spécifiques S105A et S261D prolifèrent plus rapidement. Les autres mutations n'affectent pas significativement la prolifération des cellules. Dans les cardiomyocytes, GATA-4 est un effecteur en aval des voies « mammalian target of rapamycin » (mTOR)/PI3-K/AKT et RhoA (ZEIDAN *et al.*, 2009 ; CHARRON *et al.*, 2001). Toutefois, ces études ne s'intéressent pas à des effets de GATA-4 en amont de ces voies et aucune étude du genre n'a été réalisée dans

l'épithélium intestinal. Néanmoins, GATA-4 étant associé à l'hypertrophie cardiaque, il est possible de supposer qu'en le surexprimant dans les IEC-6, GATA-4 induit une plus grande expression de ses gènes cibles, mimant l'effet d'une suractivation des voies mTOR/PI3-K/AKT et RhoA, ce qui pourrait conduire à un grossissement des cellules et à une prolifération accrue. Les contacts cellules-cellules semblent eux aussi augmentés par la surexpression de GATA-4. Toutefois, ceux-ci ne semblent pas en mesure de freiner la prolifération cellulaire. En effet, des expérimentations effectuées au laboratoire ont permis de constater que les cellules GATA-4 continuent de proliférer après l'atteinte de la confluence. Celles-ci demeurent sous forme d'une monocouche de cellules épithéliales et l'excédent de cellules semblent être exfoliées dans le milieu de culture. Une étude axée sur le phénomène permettrait d'établir le lien entre la surexpression de GATA-4 et l'apparente contradiction qui relie la présence accrue de contacts cellulaires d'une part, et l'augmentation de la prolifération d'autre part. Les résultats obtenus au laboratoire sur l'augmentation de la prolifération sont clairs, tandis que des études plus poussées sur les contacts cellules-cellules dans les cellules GATA-4 seraient nécessaires.

2.3 Liaison à l'ADN et activité des mutants de GATA-4

Pour vérifier si les différents mutants de GATA-4 exprimés dans les IEC-6 étaient fonctionnels, des essais de liaison à l'ADN par gel de rétention ont été effectués. Mes résultats ont confirmé que les mutants générés étaient capables de lier l'ADN. Une cotransfection de GATA-4 et C/EBP δ induit l'expression du gène AGP (TURGEON *et al.*, 2008). Mes résultats ont montré que le mutant GATA-4 S261D (mimant une phosphorylation constitutive de GATA-4 sur la sérine 261) induisait une augmentation de la transactivation du gène AGP, suggérant qu'une phosphorylation de GATA-4 sur sérine 261 par la PKA peut favoriser l'activité transcriptionnelle de GATA-4 sur le gène AGP. Finalement, la surexpression de GATA-4 de type sauvage dans les IEC-6 conduit à une diminution de l'expression des isoformes C/EBP β et C/EBP δ (TURGEON *et al.*, 2008). Mes résultats montrent qu'une surexpression du mutant GATA-4 S105A (empêchant la phosphorylation de GATA-4 sur la sérine 105) conduit également à une diminution de l'expression de C/EBP β et C/EBP δ , suggérant que la phosphorylation de GATA-4 par p42/p44 sur la sérine 105 n'est pas requise pour provoquer la diminution d'expression des C/EBPs induite par la surexpression de GATA-4.

2.4 Conclusions

La génération des mutants de GATA-4 a permis de soulever certaines questions, mais celles-ci ne sont pas en lien direct avec la modulation de la réponse inflammatoire. D'une part, j'ai soulevé la possibilité qu'une délétion du doigt de zinc N-terminal de GATA-4 puisse provoquer des changements importants du phénotype microscopique des cellules IEC-6 et qu'une délétion de la région basique, ou encore les mutations S105A et S261D pouvaient affecter la prolifération cellulaire, renforçant l'hypothèse que GATA-4 pourrait jouer plusieurs rôles dans l'épithélium intestinal. Toutefois, il sera intéressant, une fois les mutants bien caractérisés, d'étudier les différences engendrées par la surexpression de ces mutants sur la modulation de voies de signalisation telles que les MAPK ou Akt, sur certains facteurs de transcription tels que AP-1, C/EBP et NF- κ B, et également sur l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que certaines cytokines et chimiokines. Des essais supplémentaires seront effectués pour générer le mutant délété pour les deux doigts de zinc (Δ 216-294). Ce mutant sera déterminant pour mieux comprendre le rôle des doigts de zinc comparativement aux autres domaines de GATA-4.

3. Conclusion générale

Mon projet de recherche était divisé en deux objectifs. Le premier objectif était de déterminer comment GATA-4 affecte la réponse inflammatoire intestinale et le second était de générer des mutants pour évaluer la contribution des différents domaines de GATA-4 dans la modulation de la réponse inflammatoire. Les premières études effectuées au laboratoire en ce sens ont révélé que GATA-4 pouvait interagir avec C/EBP δ et moduler l'expression de gènes pro-inflammatoires C/EBP-dépendants. Mes résultats ont permis de déterminer que GATA-4 inhibait les voies p42/p44 et Akt, que GATA-4 augmentait la liaison à l'ADN des facteurs de transcription AP-1, C/EBP et NF- κ B, et diminuait l'expression de CCL5 et iNOS, deux gènes sous le contrôle de AP-1, C/EBP et NF- κ B, sont réprimés. La génération de mutants de GATA-4 a pu mettre en évidence un rôle du premier doigt de zinc de GATA-4 dans la modification de la morphologie des IEC-6, ainsi qu'un rôle de la région basique et des sites de phosphorylation S105 et S261 dans la vitesse de prolifération de ces cellules.

Dans l'épithélium intestinal, l'expression protéique de GATA-4 augmente pendant le processus de différenciation entérocytaire. Aussi, en se différenciant, les cellules épithéliales intestinales migrent vers les villosités, s'exposant davantage au contenu de la lumière intestinale. Pour cela, ces cellules acquièrent une tolérance face à l'inflammation en inhibant par exemple, l'expression de certains récepteurs de surface tels que TLR-2 et TLR-4 et en induisant l'expression de protéines inhibitrices telles que Tollip. Il est possible que dans ce contexte, GATA-4 participe à l'instauration de cette tolérance et ce de diverses façons, que ce soit par l'inhibition de voies de signalisation comme p42/p44, par la modification de la nature des complexes de facteurs de transcription reliés à l'inflammation comme C/EBP, AP-1 et NF- κ B ou encore via l'augmentation de l'expression d'un ou de plusieurs corépresseurs capables de lier ces facteurs et inhiber leur fonctions. Il est possible que l'augmentation de l'adhésion cellule-cellule puisse être en partie responsable de la modulation GATA-4-dépendante de la réponse inflammatoire intestinale. Ceci pourrait constituer une avenue de recherche excitante.

REMERCIEMENTS

Mon passage dans le laboratoire du professeur Claude Asselin a été probablement un des moments des plus enrichissant de ma vie. J'y ai accompli deux stages pendant mon baccalauréat ainsi que ma maîtrise. Son enseignement a été d'une valeur inestimable. Grâce à lui, je comprends mieux la notion d'études supérieures, une notion qui englobe l'intégration et la maîtrise de la connaissance, mais aussi beaucoup de développement personnel, d'acquisition d'outils pour l'avenir, de gestion du stress, ainsi que de la reconnaissance de ses forces et faiblesses, tout en saisissant mieux leur portée. Pour tout cela, je tiens à lui faire part de mes plus sincères remerciements et je tiens à ce qu'il sache que je me sens grandi en quittant son laboratoire.

Ensuite, je tiens à adresser un merci spécial au professeur François Boudreau, avec qui j'ai pu échanger sur plusieurs sujets différents dans le cadre de mon projet de recherche. Son enseignement et ses conseils, gratuits, sincères et pleins de bonne volonté m'ont apporté beaucoup. Je tiens également à remercier tous les autres professeurs du département d'anatomie et de biologie cellulaire qui ensemble forment une élite scientifique hors pair dont je me souviendrai toute ma vie.

Ma maîtrise n'aurait jamais été ce qu'elle a été sans la présence de tous les étudiants, assistants de recherches et stagiaires qui ont travaillé avec moi. Merci à Naomie Turgeon, pour son incroyable patience et pour ses grandes connaissances de la science et des techniques de laboratoire. Merci à Evelyne Roy, avec qui j'ai développé une amitié profonde et qui m'a permis de rire à en pleurer à quelques reprises, ainsi que pour toutes les notions qu'elle m'a transmises pendant mon stage d'été 2006. Merci à Andréane Cartier pour ses conseils et pour nos discussions sur toute sorte de sujets scientifiques et moins scientifiques. Merci à Geneviève Doyon, qui a supervisé mon premier stage de baccalauréat, à Mylène Blais, pour sa présence et ses conseils lors de mon premier stage, à Jean-François Delabre, pour ses connaissances scientifiques, mais aussi pour son excellent coup droit de tennis. Merci à Sébastien Mongrain et Ghassan Bkaily Junior, sans qui les divertissements à l'extérieur des heures d'études auraient été forts moins palpitants. Merci aux stagiaires qui sont passées au laboratoire : Maude St-Onge, Suzanne Gascon, Julie Moore-Gagné, Caroline Valiquette et tout particulièrement Catherine Deschênes que j'ai

eu le plaisir de superviser. Merci à Chantale Provost, étudiante au doctorat chez le professeur Ghassan Bkaily, sans qui je n'aurais probablement jamais pris la décision de poursuivre mes études au doctorat.

Enfin, je tiens à remercier ma famille ainsi que mes amis qui tout au long de ma maîtrise, ont connu et supporté mes hauts comme mes bas. Ils ont su me reconforter et me féliciter peu importe le moment.

Merci à tous de croire en moi.

RÉFÉRENCES

- Agnihotri S., Wolf A., Picard D., Hawkins C. et Guha A. (2009) *GATA4 is a regulator of astrocyte cell proliferation and apoptosis in the human and murine central nervous system.* **Oncogene.** 28(34):3033-46.
- Aktan F. (2004) *iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation.* **Life Sci.** 75(6):639-53.
- Al-azze E. D., Fegert P., Blin N. et Gött P. (2000) *Transcription factor GATA-6 activates expression of gastroprotective trefoil genes TFF1 and TFF2.* **Biochim Biophys Acta.** 1490(3):324-32.
- Arceci R. J., King A. A., Simon M. C., Orkin S. H. et Wilson D. B. (1993) *Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart.* **Mol Cell Biol.** 13(4):2235-46.
- Ariel A. et Serhan C. N. (2007) *Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation.* **Trends Immunol.** 28(4):176-83.
- Artis D. (2008) *Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut.* **Nat Rev Immunol.** 8(6):411-20.
- Barnes P. J. (2008) *Role of GATA-3 in allergic diseases.* **Curr Mol Med.** 8(5):330-4.
- Battle M. A., Bondow B. J., Iverson M. A., Adams S. J., Jandacek R. J., Tso P. et Duncan SA. (2008) *GATA4 is essential for jejunal function in mice.* **Gastroenterology.** 135(5):1676-86.
- Baumann H., Morella K. K., Jahreis G. P. et Marinkovic S. (1990) *Distinct regulation of the interleukin-1 and interleukin-6 response elements of the rat haptoglobin gene in rat and human hepatoma cells.* **Mol Cell Biol.** 10(11): 5967-76.

Belaguli N. S., Zhang M., Rigi M., Aftab M. et Berger D. H. (2007) *Cooperation between GATA4 and TGF-beta signaling regulates intestinal epithelial gene expression.* **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 292(6):G1520-33.

Bell F. R. et Mostaghni K. (1975) *Duodenal control of gastric emptying in the milk-fed calf.* **J Physiol.** 245(2): 387-407.

Beuling E., Bosse T., aan de Kerk D. J., Piaseckyj C. M., Fujiwara Y., Katz S. G., Orkin S. H., Grand R. J. et Krasinski S. D. (2008) *GATA4 mediates gene repression in the mature mouse small intestine through interactions with friend of GATA (FOG) cofactors.* **Dev Biol.** 322(1):179-89.

Bosse T., Piaseckyj C. M., Burghard E., Fialkovich J. J., Rajagopal S., Pu W. T. et Krasinski S. D. (2006) *Gata4 is essential for the maintenance of jejunal-ileal identities in the adult mouse small intestine.* **Mol Cell Biol.** 26(23):9060-70.

Boudreau F., Rings E. H., van Wering H. M., Kim R. K., Swain G. P., Krasinski S. D., Moffett J., Grand R. J., Suh E. R. et Traber P. G. (2002) *Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene.* **J Biol Chem.** 277(35):31909-17.

Boudreau F., Zhu Y. et Traber P. G. (2001) *Sucrase-isomaltase gene transcription requires the hepatocyte nuclear factor-1 (HNF-1) regulatory element and is regulated by the ratio of HNF-1 alpha to HNF-1 beta.* **J Biol Chem.** 276(34):32122-8.

Boudreau F., Yu S.J. et Asselin C. (1998) *CCAAT/enhancer binding proteins beta and delta regulate alpha1-acid glycoprotein gene expression in rat intestinal epithelial cells.* **DNA Cell Biol.** 17(8):669-77.

Brikos C., Wait R., Begum S., O'Neill L. A. et Saklatvala J. (2007) *Mass spectrometric analysis of the endogenous type I interleukin-1 (IL-1) receptor signaling complex formed*

after IL-1 binding identifies IL-1RAcP, MyD88, and IRAK-4 as the stable components. **Mol Cell Proteomics.** 6(9):1551-9.

Cai J., Yi F. F., Bian Z. Y., Shen D. F., Yang L., Yan L., Tang Q. Z., Yang X. C. et Li H. (2009) *Crocetin protects against cardiac hypertrophy by blocking MEK-ERK1/2 signalling pathway.* **J Cell Mol Med.** 13(5):909-25.

Cartier A. (2008) Mémoire : *Identification des domaines de Cdx2/3 impliqués dans la régulation de son activité transcriptionnelle par la phosphorylation.* Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada.

Charron F., Tsimiklis G., Arcand M., Robitaille L., Liang Q., Molkenkin J. D., Meloche S. et Nemer M. (2001) *Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA.* **Genes Dev.** 15(20):2702-19.

Charron F. et Nemer M. (1999) *GATA transcription factors and cardiac development.* **Semin Cell Dev Biol.** 10(1):85-91.

Chaudhary S. C., Alam M. S., Siddiqui M. S et Athar M. (2009) *Perillyl alcohol attenuates Ras-ERK signaling to inhibit murine skin inflammation and tumorigenesis.* **Chem Biol Interact.** 179(2-3):145-53.

Cheung P. F., Wong C. K., Ip W. K. et, Lam C. W. (2008) *FAK-mediated activation of ERK for eosinophil migration: a novel mechanism for infection-induced allergic inflammation.* **Int Immunol.** 20(3):353-63.

Chiu W. Y., Chen H. W., Chao H. W., Yann L. T. et Tsai K. S. (2006) *Identification of three novel mutations in the GATA3 gene responsible for familial hypoparathyroidism and deafness in the Chinese population.* **J Clin Endocrinol Metab.** 91(11):4587-92.

Crispino J. D. et al. (2001) *Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors.* **Genes Dev.** 15(7):839-44.

Daghigh F., Borghaei R. C., Thornton R. D. et Bee J. H. (2002) *Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines*. **J Periodontol.** 73(4):392-400.

Dai Y. S., Cserjesi P., Markham B. E. et Molkenin J. D. (2002) *The transcription factors GATA4 and dHAND physically interact to synergistically activate cardiac gene expression through a p300-dependent mechanism*. **J Biol Chem.** 277(27):24390-8.

Dai Y. S. et Markham B. E. (2001) *p300 Functions as a coactivator of transcription factor GATA-4*. **J Biol Chem.** 276(40):37178-85.

Di Lisi R., Millino C., Calabria E., Altruda F., Schiaffino S. et Ausoni S. (1998) *Combinatorial cis-acting elements control tissue-specific activation of the cardiac troponin I gene in vitro and in vivo*. **J Biol Chem.** 273(39):25371-80.

Divine J. K., Staloch L. J., Haveri H., Jacobsen C. M., Wilson D. B., Heikinheimo M. et Simon T. C. (2004) *GATA-4, GATA-5, and GATA-6 activate the rat liver fatty acid binding protein gene in concert with HNF-1alpha*. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 287(5):G1086-99.

Durocher D., Charron F., Warren R., Schwartz R. J. wr Nemer M. (1997) *The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors*. **EMBO J.** 16(18):5687-96.

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

Essakalli M., Atouf O., Bennani N., Benseffaj N., Ouadghiri S. et Brick C. (2009) *Toll-like récepteurs*. **Pathol Biol. (Paris).** 57(5):430-8. [Français]

Fujimaki S., Harigae H., Sugawara T., Takasawa N., Sasaki T. et Kaku M. (2001) *Decreased expression of transcription factor GATA-2 in haematopoietic stem cells in patients with aplastic anaemia.* **Br J Haematol.** 113(1):52-7.

Gao X., Sedgwick T., Shi Y. B. et Evans T. (1998) *Distinct functions are implicated for the GATA-4, -5, and -6 transcription factors in the regulation of intestine epithelial cell differentiation.* **Mol Cell Biol.** 18(5):2901-11.

Garg V., Kathiriyai I. S., Barnes R., Schluterman M. K., King I. N., Butler C. A., Rothrock C. R., Eapen R. S., Hirayama-Yamada K., Joo K., Matsuoka R., Cohen J. C. et Srivastava D. (2003) *GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5.* **Nature.** 424(6947):443-7.

Gendron F. P., Mongrain S., Laprise P., McMahon S., Dubois C. M., Blais M., Asselin C. et Rivard N. (2006) *The CDX2 transcription factor regulates furin expression during intestinal epithelial cell differentiation.* **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 290(2):G310-8.

Gheorghiu I., Deschênes C., Blais M., Boudreau F., Rivard N. et Asselin C. (2001) *Role of specific CCAAT/enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells.* **J Biol Chem.** 276(47):44331-7.

Grépin C., Nemer G. et Nemer M. (1997) *Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor.* **Development.** 124(12):2387-95.

Guarner F. et Malagelada J. R. (2003) *Gut flora in health and disease.* **Lancet.** 361(9356):512-9.

Harigae H. (2006) *GATA transcription factors and hematological diseases.* **Tohoku J Exp Med.** 210(1):1-9.

Harris G., KuoLee R. et Chen W. (2006) *Role of Toll-like receptors in health and diseases of gastrointestinal tract.* **World J Gastroenterol.** 12(14):2149-60.

- Haveri H., Ashorn M., Iltanen S., Wilson D. B., Andersson L. C. et Heikinheimo M. (2009) *Enhanced expression of transcription factor GATA-4 in inflammatory bowel disease and its possible regulation by TGF-beta1*. **J Clin Immunol.** 29(4):444-53.
- Haveri H., Westerholm-Ormio M., Lindfors K., Mäki M., Savilahti E., Andersson L. C. et Heikinheimo M. (2008) *Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in normal and neoplastic human gastrointestinal mucosa*. **BMC Gastroenterol.** 8:9.
- Hayden M. S. et Ghosh S. (2008) *Shared principles in NF-kappaB signaling*. **Cell.** 132(3):344-62.
- Heath J. P. (1996) *Epithelial cell migration in the intestine*. **Cell Biol Int.** 20(2):139-46.
- Herzig T. C., Jobe S. M., Aoki H., Molkentin J. D., Cowley A. W. Jr, Izumo S. et Markham B. E. (1997) *Angiotensin II type Ia receptor gene expression in the heart: AP-1 and GATA-4 participate in the response to pressure overload*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 94(14):7543-8.
- Ho C. K., Wood J. R., Stewart D. R., Ewens K., Ankener W., Wickenheisser J., Nelson-Degrave V., Zhang Z., Legro R. S., Dunaif A., McAllister J. M., Spielman R. et Strauss JF 3rd. (2005) *Increased transcription and increased messenger ribonucleic acid (mRNA) stability contribute to increased GATA6 mRNA abundance in polycystic ovary syndrome theca cells*. **J Clin Endocrinol Metab.** 90(12):6596-602.
- Hoffmann E., Dittrich-Breiholz O., Holtmann H. et Kracht M. (2002) *Multiple control of interleukin-8 gene expression*. **J Leukoc Biol.** 72(5):847-55.
- Holtzinger A. et Evans T. (2005) *Gata4 regulates the formation of multiple organs*. **Development.** 132(17):4005-14.
- Hornef M. W., Normark B. H., Vandewalle A. et Normark S. (2003) *Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells*. **J Exp Med.** 198(8):1225-35.

Houde M., Laprise P., Jean D., Blais M., Asselin C. et Rivard N. (2001) *Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2*. **J Biol Chem**. 276(24):21885-94.

Huang T. T., Kudo N., Yoshida M. et Miyamoto S. (2000) *A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/I κ B complexes*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 97(3):1014-9.

Imbe H., Kimura A., Okamoto K., Donishi T., Aikawa F., Senba E. et Tamai Y. (2008) *Activation of ERK in the rostral ventromedial medulla is involved in hyperalgesia during peripheral inflammation*. **Brain Res**. 2;1187:103-10.

Imbe H., Okamoto K., Okamura T., Kumabe S., Nakatsuka M., Aikawa F., Iwai-Liao Y. et Senba E. (2005) *Effects of peripheral inflammation on activation of ERK in the rostral ventromedial medulla*. **Brain Res**. 1063(2):151-8.

Ip H.S., Wilson D. B., Heikinheimo M., Tang Z., Ting C. N., Simon M. C., Leiden J. M. et Parmacek M. S. (1994) *The GATA-4 transcription factor transactivates the cardiac muscle-specific troponin C promoter-enhancer in nonmuscle cells*. **Mol Cell Biol**. 14(11):7517-26.

Ip Y. T., Davis R. J. (1998) *Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development*. **Curr Opin Cell Biol**. 10(2):205-19.

Jacobsen C. M., Narita N., Bielinska M., Syder A. J., Gordon J. I. et Wilson D. B. (2002). *Genetic mosaic analysis reveals that GATA-4 is required for proper differentiation of mouse gastric epithelium*. **Dev Biol**. 1;241(1):34-46.

Jensen J., Pedersen E. E., Galante P., Hald J., Heller R. S., Ishibashi M., Kageyama R., Guillemot F., Serup P. et Madsen O. D. (2000) *Control of endodermal endocrine development by Hes-1*. **Nat Genet**. 24(1):36-44.

Johnson C., Van Antwerp D. et Hope T. J. (1999). *An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of I κ B α* . **EMBO J.** 18:6682–93.

Johnson G. L. et Lapadat R. (2002) *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. **Science.** 298(5600):1911-2.

Kamnasaran D., Qian B., Hawkins C., Stanford W. L. et Guha A. (2007) *GATA6 is an astrocytoma tumor suppressor gene identified by gene trapping of mouse glioma model*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 104(19):8053-8.

Karin M., Liu Z. et Zandi E. (1997) *AP-1 function and regulation*. **Curr Opin Cell Biol.** 9(2):240-6.

Kawamura T., Ono K., Morimoto T., Wada H., Hirai M., Hidaka K., Morisaki T., Heike T., Nakahata T., Kita T. et Hasegawa K. (2005) *Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes*. **J Biol Chem.** 280(20):19682-8.

Keklikoglu N., Koray M., Kocaelli H. et Akinci S. (2008) *iNOS expression in oral and gastrointestinal tract mucosa*. **Dig Dis Sci.** 53(6):1437-42.

Kessler-Icekson G., Barhum Y., Schaper J., Schaper W., Kaganovsky E. et Brand T. (2002) *ANP expression in the hypertensive heart*. **Exp Clin Cardiol.** 7(2-3):80-4.

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):817-27.

Ketola I., Toppari J., Vaskivuo T., Herva R., Tapanainen J. S. et Heikinheimo M. (2003) *Transcription factor GATA-6, cell proliferation, apoptosis, and apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax in human fetal testis*. **J Clin Endocrinol Metab.** 88(4):1858-65.

Kidd L. B., Schabbauser G. A., Luyendyk J. P., Holscher T. D., Tilley R. E., Tencati M. et Mackman N. (2008) *Insulin activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase*

B (Akt) pathway reduces lipopolysaccharide-induced inflammation in mice. **J Pharmacol Exp Ther.** 326(1):348-53.

Kudo T., Lu H., Wu J. Y., Graham D. Y., Casola A. et Yamaoka Y. (2005) *Regulation of RANTES promoter activation in gastric epithelial cells infected with Helicobacter pylori.* **Infect Immun.** 73(11):7602-12.

Kuo C. T., Morrisey E. E., Anandappa R., Sigrist K., Lu M. M., Parmacek M. S., Soudais C. et Leiden J. M. (1997) *GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation.* **Genes Dev.** 11(8):1048-60.

Kyriakis J. M. et Avruch J. (1996) *Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines.* **Bioessays.** 18(7):567-77.

Kyrölahti A., Rämö M., Tamminen M., Unkila-Kallio L., Butzow R., Leminen A., Nemer M., Rahman N., Huhtaniemi I., Heikinheimo M. et Anttonen M. (2008) *GATA-4 regulates Bcl-2 expression in ovarian granulosa cell tumors.* **Endocrinology.** 149(11):5635-42.

Laitinen M. P., Anttonen M., Ketola I., Wilson D. B., Ritvos O., Butzow R. et Heikinheimo M. (2000) *Transcription factors GATA-4 and GATA-6 and a GATA family cofactor, FOG-2, are expressed in human ovary and sex cord-derived ovarian tumors.* **J Clin Endocrinol Metab.** 85(9):3476-83.

LaVoie H. A., Singh D., Hui Y. Y. (2004) *Concerted regulation of the porcine steroidogenic acute regulatory protein gene promoter activity by follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I in granulosa cells involves GATA-4 and CCAAT/enhancer binding protein beta.* **Endocrinology.** 145(7):3122-34.

Lee Y., Shioi T., Kasahara H., Jobe S. M., Wiese R. J., Markham B. E. et Izumo S. (1998) *The cardiac tissue-restricted homeobox protein Csx/Nkx2.5 physically associates with the zinc finger protein GATA4 and cooperatively activates atrial natriuretic factor gene expression.* **Mol Cell Biol.** 18(6):3120-9.

Levy J. A. (2009) *The unexpected pleiotropic activities of RANTES*. **J Immunol.** 182(7):3945-6.

Liang Q., Wiese R. J., Bueno O. F., Dai Y. S., Markham B. E. et Molkenin J. D. (2001) *The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes*. **Mol Cell Biol.** 21(21):7460-9.

Lu J. R., McKinsey T. A., Xu H., Wang D. Z., Richardson J.A. et Olson E. N. (1999) *FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors*. **Mol Cell Biol.** 19(6):4495-502.

Maeda A., Moriguchi T., Hamada M., Kusakabe M., Fujioka Y., Nakano T., Yoh K., Lim K. C., Engel J. D. et Takahashi S. (2009) *Transcription factor GATA-3 is essential for lens development*. **Dev Dyn.** 238(9):2280-2291.

Molkenin J. D. (2000) *The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression*. **J Biol Chem.** 275(50):38949-52.

Molkenin J. D., Lu J. R., Antos C. L., Markham B., Richardson J., Robbins J., Grant S. R. et Olson E. N. (1998) *A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy*. **Cell.** 93(2):215-28.

Molkenin J. D., Lin Q., Duncan S. A. et Olson E. N. (1997) *Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis*. **Genes Dev.** 11(8):1061-72.

Molkenin J. D., Kalvakolanu D. V. et Markham B. E. (1994) *Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene*. **Mol Cell Biol.** 14(7):4947-57.

Mongrain S. (2007) Mémoire : *Caractérisation du mécanisme de régulation de Cdx2 par la MAP kinase p38 et de l'implication de Cdx2 dans la différenciation des cellules épithéliales intestinales*. Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada.

Morin S., Charron F., Robitaille L. et Nemer M. (2000) *GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters*. **EMBO J.** 19(9):2046-55.

Morisco C., Seta K., Hardt S. E., Lee Y., Vatner S. F. et Sadoshima J. (2001) *Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes*. **J Biol Chem.** 276(30):28586-97.

Moriyama I., Ishihara S., Rumi M. A., Aziz M. D., Mishima Y., Oshima N., Kadota C., Kadowaki Y., Amano Y. et Kinoshita Y. (2008) *Decoy oligodeoxynucleotide targeting activator protein-1 (AP-1) attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis*. **Lab Invest.** 88(6):652-63.

Murphy A. M., Thompson W. R., Peng L. F. et Jones L 2nd. (1997) *Regulation of the rat cardiac troponin I gene by the transcription factor GATA-4*. **Biochem J.** 322 (Pt 2):393-401.

Nakajima T., Kinoshita S., Sasagawa T., Sasaki K., Naruto M., Kishimoto T. et Akira S. (1993) *Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 90(6): 2207-11.

Nakamura Y., Ghaffar O., Olivenstein R., Taha R. A., Soussi-Gounni A., Zhang D. H., Ray A. et Hamid Q. (1999) *Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma*. **J Allergy Clin Immunol.** 103(2 Pt 1):215-22.

Narita N., Bielinska M. et Wilson D. B. (1997) *Wild-type endoderm abrogates the ventral developmental defects associated with GATA-4 deficiency in the mouse*. **Dev Biol.** 189(2):270-4.

Nemer G., Qureshi S. T., Malo D. et Nemer M. (1999) *Functional analysis and chromosomal mapping of Gata5, a gene encoding a zinc finger DNA-binding protein.* **Mamm Genome.** 10(10):993-9.

Nemer G. et al. (2006) *A novel mutation in the GATA4 gene in patients with Tetralogy of Fallot.* **Hum Mutat.** 27(3):293-4.

Neurath M. F., Becker C. et Barbulescu K. (1998) *Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut.* **Gut.** 43(6):856-60.

Nichols K. E., Crispino J. D., Poncz M., White J. G., Orkin S. H., Maris J. M. et Weiss M. J. (2000) *Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1.* **Nat Genet.** 24(3):266-70.

Okubo A., Miyoshi O., Baba K., Takagi M., Tsukamoto K., Kinoshita A., Yoshiura K., Kishino T., Ohta T., Niikawa N. et Matsumoto N. (2004) *A novel GATA4 mutation completely segregated with atrial septal defect in a large Japanese family.* **J Med Genet.** 41(7):e97.

Omichinski J. G., Trainor C., Evans T., Gronenborn A. M., Clore G. M. et Felsenfeld G. (1993) *A small single-"finger" peptide from the erythroid transcription factor GATA-1 binds specifically to DNA as a zinc or iron complex.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 90(5):1676-80.

Pai S. Y., Kang B. Y., Sabadini A. M., Parisini E., Truitt M. L. et Ho I. C. (2008) *Distinct structural requirements of GATA-3 for the regulation of thymocyte and Th2 cell differentiation.* **J Immunol.** 180(2):1050-9.

Palm N. W. et Medzhitov R. (2009) *Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity.* **Immunol Rev.** 227(1):221-33.

Pelletier N., Boudreau F., Yu S. J., Zannoni S., Boulanger V. et Asselin C. (1998) *Activation of haptoglobin gene expression by cAMP involves CCAAT/enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells.* **FEBS Lett.** 439(3): 275-80.

Perkins N. D. (2007) *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function.* **Nat Rev Mol Cell Biol.** 8(1):49-62.

Philips A. S., Kwok J. C. et Chong B. H. (2007) *Analysis of the signals and mechanisms mediating nuclear trafficking of GATA-4. Loss of DNA binding is associated with localization in intranuclear speckles.* **J Biol Chem.** 282(34):24915-27.

Pocock J., Gómez-Guerrero C., Harendza S., Ayoub M., Hernández-Vargas P., Zahner G., Stahl R. A. et Thaiss F. (2003) *Differential activation of NF-kappa B, AP-1, and C/EBP in endotoxin-tolerant rats: mechanisms for in vivo regulation of glomerular RANTES/CCL5 expression.* **J Immunol.** 170(12):6280-91.

Poli V. (1998) *The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions.* **J Biol Chem.** 273(45):29279-82.

Ramji D. P. et Foka P. (2002) *CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation.* **Biochem. J.** 365(Pt 3): 561-75.

Reamon-Buettner S. M. et Borlak J. (2005) *GATA4 zinc finger mutations as a molecular rationale for septation defects of the human heart.* **J Med Genet.** 42(5):e32.

Reamon-Buettner S. M., Cho S. H. et Borlak J. (2007) *Mutations in the 3'-untranslated region of GATA4 as molecular hotspots for congenital heart disease (CHD).* **BMC Med Genet.** 25;8:38.

Ren K. et Torres R. (2009) *Role of interleukin-1beta during pain and inflammation.* **Brain Res Rev.** 60(1):57-64.

Rojas A., Kong S. W., Agarwal P., Gilliss B., Pu W. T., 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*. **Mol Cell Biol.** 28(17):5420-31.

Ross S. E., Radomska H. S., Wu B., Zhang P., Winnay J. N., Bajnok L., Wright W. S., Schaufele F., Tenen D. G. et MacDougald O. A. (2004) *Phosphorylation of C/EBPalpha inhibits granulopoiesis*. **Mol. Cell. Biol.** 24(2): 675-86.

Ross S. E., Erickson R. L., Hemati N. et MacDougald O. A. (1999) *Glycogen synthase kinase 3 is an insulin-regulated C/EBPalpha kinase*. **Mol. Cell. Biol.** 19(12): 8433-41.

Roy E. (2007) Mémoire : *Modulation de la réponse inflammatoire intestinale par la kinase DNA-PK*. Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada.

Saadane N., Alpert L. et Chalifour L. E. (1999) *Expression of immediate early genes, GATA-4, and Nkx-2.5 in adrenergic-induced cardiac hypertrophy and during regression in adult mice*. **Br J Pharmacol.** 42(6):1045-53.

Schabbauer G., Tencati M., Pedersen B, Pawlinski R. et Mackman N. (2004) *PI3K-Akt pathway suppresses coagulation and inflammation in endotoxemic mice*. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 24(10):1963-9.

Sears A. (2005) *A dynamic partnership: celebrating our gut flora*. **Anaerobe.** 11(5):247-51.

Sepulveda J. L., Belaguli N., Nigam V., Chen C. Y., Nemer M. et Schwartz R. J. (1998) *GATA-4 and Nkx-2.5 coactivate Nkx-2 DNA binding targets: role for regulating early cardiac gene expression*. **Mol Cell Biol.** 18(6):3405-15.

Shen H. M. et Tergaonkar V. (2009) *NFkappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy*. **Apoptosis.** 14(4):348-63.

Singh H., Sen R., Baltimore D. et Sharp P. A. (1986) *A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes.* **Nature.** 319(6049):154-8.

Shinkai M., López-Boado Y. S. et Rubin B. K. (2007) *Clarithromycin has an immunomodulatory effect on ERK-mediated inflammation induced by Pseudomonas aeruginosa flagellin.* **J Antimicrob Chemother.** 59(6):1096-101.

Steinhoff U. (2005) *Who controls the crowd? New findings and old questions about the intestinal microflora.* **Immunol Lett.** 99(1):12-6.

Suzuki K., Fukui H., Kayahara T., Sawada M., Seno H., Hiai H., Kageyama R., Okano H. et Chiba T. (2005) *Hes1-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine.* **Biochem Biophys Res Commun.** 328(1):348-52.

Suzuki Y. J., Nagase H., Wong C. M., Kumar S. V., Jain V., Park A. M. et Day R. M. (2007) *Regulation of Bcl-xL expression in lung vascular smooth muscle.* **Am J Respir Cell Mol Biol.** 36(6):678-87.

Suzuki Y. J., Nagase H., Day R. M. et Das D.K. (2004) *GATA-4 regulation of myocardial survival in the preconditioned heart.* **J Mol Cell Cardiol.** 37(6):1195-203.

Svensson E. C., Tufts R. L., Polk C. E. et Leiden J. M. (1999) *Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 96(3):956-61.

Takaya T., Kawamura T., Morimoto T., Ono K., Kita T., Shimatsu A. et Hasegawa K. (2008) *Identification of p300-targeted acetylated residues in GATA4 during hypertrophic responses in cardiac myocytes.* **J Biol Chem.** 283(15):9828-35.

Temsah R. et Nemer M. (2005) *GATA factors and transcriptional regulation of cardiac natriuretic peptide genes.* **Regul Pept.** 128(3):177-85.

Ten R. M., Paya C. V., Israël N., Le Bail O., Mattei M. G., Virelizier J. L., Kourilsky P. et Israël A. (1992) *The characterization of the promoter of the gene encoding the p50 subunit of NF-kappa B indicates that it participates in its own regulation.* **EMBO J.** 11(1):195-203.

Tevosian S. G., Deconinck A. E., Cantor A. B., Rieff H. I., Fujiwara Y., Corfas G. et Orkin S. H. (1999) *FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 96(3):950-5.

Tokunaga E., Oki E., Egashira A., Sadanaga N., Morita M., Kakeji Y. et Maehara Y. (2008) *Deregulation of the Akt pathway in human cancer.* **Curr Cancer Drug Targets.** 8(1):27-36.

Tong Q., Tsai J., Tan G., Dalgin G. et Hotamisligil G. S. (2005) *Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation.* **Mol Cell Biol.** 25(2):706-15.

Trainor C. D., Omichinski J. G., Vandergon T. L., Gronenborn A. M., Clore G. M., Felsenfeld G. (1996) *A palindromic regulatory site within vertebrate GATA-1 promoters requires both zinc fingers of the GATA-1 DNA-binding domain for high-affinity interaction.* **Mol Cell Biol.** 16(5):2238-47.

Tremblay J. J. et Viger R. S. (2003) *Transcription factor GATA-4 is activated by phosphorylation of serine 261 via the cAMP/protein kinase a signaling pathway in gonadal cells.* **J Biol Chem.** 278(24):22128-35.

Tremblay J. J., Hamel F. et Viger R. S. (2002) *Protein kinase A-dependent cooperation between GATA and CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors regulates steroidogenic acute regulatory protein promoter activity.* **Endocrinology.** 143(10):3935-45.

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):109-19.

Turgeon N., Rousseau D., Roy E. et Asselin C. (2008) *GATA-4 modulates C/EBP-dependent transcriptional activation of acute phase protein genes. Biochem Biophys Res Commun.* 370(2):371-5.

Turgeon N. (2006) Mémoire : *Rôle des histones désacétylases dans la régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription C/EBP δ .* Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada.

Turvey S. E. et Hawn T. R. (2006) *Towards subtlety: understanding the role of Toll-like receptor signaling in susceptibility to human infections. Clin Immunol.* 120(1):1-9.

Vallabhapurapu S. et Karin M. (2009) *Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. Annu Rev Immunol.* 27:693-733.

van der Flier L. G. et Clevers H. (2009) *Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. Annu Rev Physiol.* 71:241-60.

van der Sluis M., Melis M. H., Jonckheere N., Ducourouble M. P., Büller H. A., Renes I., Einerhand A. W. et Van Seuning I. (2004) *The murine Muc2 mucin gene is transcriptionally regulated by the zinc-finger GATA-4 transcription factor in intestinal cells. Biochem Biophys Res Commun.* 325(3):952-60.

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

van Wering H. M., Huibregtse I. L., van der Zwan S. M., de Bie M. S., Dowling L. N., Boudreau F., Rings E. H., Grand R. J. et Krasinski S. D. (2002) *Physical interaction*

between *GATA-5* and *hepatocyte nuclear factor-1alpha* results in synergistic activation of the human lactase-phlorizin hydrolase promoter. **J Biol Chem.** 277(31):27659-67.

Verhaeghe C., Remouchamps C., Hennuy B., Vanderplasschen A., Chariot A., Tabruyn S. P., Oury C. et Bours V. (2007) *Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways.* **Biochem Pharmacol.** 73(12):1982-94.

Vesely P. W., Staber P. B., Hoefler G. et Kenner L. (2009) *Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins.* **Mutat Res.** 682(1):7-12.

Viger R. S., Guittot S. M., Anttonen M., Wilson D. B. et Heikinheimo M. (2008) *Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease.* **Mol Endocrinol.** 22(4):781-98.

Visvader J. E., Crossley M., Hill J., Orkin S. H. et Adams J. M. (1995) *The C-terminal zinc finger of GATA-1 or GATA-2 is sufficient to induce megakaryocytic differentiation of an early myeloid cell line.* **Mol Cell Biol.** 15(2):634-41.

Wang J., Paradis P., Aries A., Komati H., Lefebvre C., Wang H. et Nemer M. (2005) *Convergence of protein kinase C and JAK-STAT signaling on transcription factor GATA-4.* **Mol Cell Biol.** 25(22):9829-44.

Wang Y., Morishima M., Zheng M., Uchino T., Mannen K., Takahashi A., Nakaya Y., Komuro I. et Ono K. (2007) *Transcription factors Csx/Nkx2.5 and GATA4 distinctly regulate expression of Ca²⁺ channels in neonatal rat heart.* **J Mol Cell Cardiol.** 42(6):1045-53.

Wegner M., Cao Z. et Rosenfeld M. G. (1992) *Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP beta.* **Science.** 256(5055): 370-3.

Weiss M. J., Yu C., Orkin S./H. (1997) *Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line.* **Mol Cell Biol.** 17(3):1642-51.

Weylandt K. H., Kang J. X., Wiedenmann B. et Baumgart D. C. (2007) *Lipoxins and resolvins in inflammatory bowel disease*. **Inflamm Bowel Dis**. 13(6):797-9.

Whitmarsh A. J. et Davis R. J. (1996) *Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways*. **J Mol Med**. 74(10):589-607.

Wright G. L., Maroulakou I. G., Eldridge J., Liby T. L., Sridharan V., Tsiichlis P. N. et Muise-Helmericks R. C. (2008) *VEGF stimulation of mitochondrial biogenesis: requirement of AKT3 kinase*. **FASEB J**. 22(9):3264-75.

Yamaguchi Y., Nishio H., Kishi K., Ackerman S. J. et Suda T. (1999) *C/EBPbeta and GATA-1 synergistically regulate activity of the eosinophil granule major basic protein promoter: implication for C/EBPbeta activity in eosinophil gene expression*. **Blood**. 94(4):1429-39.

Yang H. Y. et Evans T. (1992) *Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains*. **Mol Cell Biol**. 12(10):4562-70.

Yang Q., Bermingham N. A., Finegold M. J. et Zoghbi H. Y. (2001) *Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine*. **Science**. 294(5549):2155-8.

Zeidan A., Hunter C., Javadov S. et Karmazyn M. (2009) *RhoA links PI3K/Akt/mTOR signaling to p38 MAPK/GATA-4 activation in leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy*. **FASEB J**. 23:577.7.

Zhang W. J., Wei H., Hagen T. et Frei B. (2007) *Alpha-lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 104(10):4077-82.