

MÉLISSA CÔTÉ

**IDENTIFICATION DES TYPES CELLULAIRES
EXPRIMANT DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LE
TRANSPORT ET LE MÉTABOLISME DES LIPIDES
DANS LE POU MON MURIN EN DÉVELOPPEMENT**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en physiologie-endocrinologie
pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc)

DÉPARTEMENT D'OBSTÉTRIQUE ET DE GYNÉCOLOGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2010

Résumé

Le processus de maturation pulmonaire implique entre autres la production d'un composé majoritairement lipidique : le surfactant. Cette étude réalisée du jour de gestation (JG) 15.5 au jour post-natal (PN) 10 a permis d'identifier dans le poumon murin les sites d'expression des apolipoprotéines (apo) A-I, A-II, C-II, H et de la lipoprotéine lipase (LPL), gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. On observe une co-localisation dans les cellules épithéliales des conduits respiratoires au JG 17.5 pour tous les messagers étudiés. Une co-localisation pour les protéines apoA-I, H et LPL est observée dans les capillaires. L'apoC-II est exprimée dans les cellules épithéliales distales tandis que l'apoA-II est retrouvée dans le mésenchyme. En période post-natale, l'expression de l'apoC-II et de la LPL se situe dans les conduits bronchiques et les macrophages. La localisation du site d'expression de ces gènes leur suggère un rôle dans la synthèse du surfactant.

Abstract

The main characteristic of pulmonary maturation is the production of surfactant, a lipidic mixture. This study, performed on mouse lung from gestational day (GD) 15.5 to post-natal day (PN) 10, enabled the identification of expression sites of genes involved in lipid metabolism and transport, such as apolipoprotein (apo) A-I, A-II, C-II, H and lipoprotein lipase (LPL). By *in situ* hybridization, a co-localization for all studied genes was observed at GD 17.5 in epithelial cells of respiratory zones. Immunohistochemistry showed a co-localization for apoA-I, H and LPL proteins in the capillary network. Also, apoC-II is found in epithelial cells of respiratory zones while apoA-II was found in mesenchymal cells. In the PN period, the expression sites for apoC-II and LPL are located in epithelial cells of conducting zones and in macrophage cells. The identified localization patterns suggest a role in surfactant synthesis for these genes that may also serve as pulmonary maturation markers.

Avant-Propos

Le présent mémoire est le fruit des sacrifices, des efforts, des conseils, et du soutien que de nombreuses personnes ont consentis en ma faveur. Je juge donc indispensable de témoigner ma gratitude à toutes ces personnes.

Tout d'abord, merci au Dr Yves Tremblay qui m'a donné l'opportunité de faire mes débuts en recherche et sans qui toute cette aventure n'aurait pas eu lieu! Merci d'avoir cru en mes compétences et mes capacités.

Merci également au Dr Pierre R. Provost pour ses judicieux conseils et pour m'avoir aidé à cheminer tout au long de mon projet.

Merci à tous mes collègues de travail pour la complicité et les fous rires partagés. Plus particulièrement, merci à Marc Simard qui partagé avec moi sa passion pour la recherche. Merci énormément pour tout le temps que tu m'as consacré, autant pour nos discussions scientifiques que personnelles. Un gros merci à Julie Plante pour tout le temps qu'on a passé ensemble, que ce soit au laboratoire, à nos fameux soupers sushis ou à nos soirées bien arrosées.

Merci à mes ami(e)s pour leur présence, leur soutien, pour avoir apaisé mes périodes de stress et d'avoir cru en mes compétences scientifiques... même après quatre ans.

Finalement, un gros merci à toute ma famille pour leur support, leur écoute et leurs conseils. Merci énormément pour la fierté témoignée à mon égard.

*Je dédicace ce mémoire à ma famille
Richard, Danielle, Ghislain et Alexandre*

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Avant-Propos.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Chapitre I.....	1
Introduction.....	1
1. Description du développement pulmonaire.....	2
1.1 Description de la phase embryonnaire.....	4
1.2 Description de la phase pseudoglandulaire.....	4
1.3 Description de la phase canaliculaire.....	5
1.4 Description de la phase sacculaire.....	5
1.5 Description de la phase alvéolaire/micro-vasculaire.....	6
2. Les régulateurs du développement pulmonaire.....	7
3. La maturation pulmonaire.....	8
3.1 Changement de la fonction de l'épithélium.....	8
3.2 Surfactant.....	9
3.3 Dimorphisme sexuel.....	10
4. Complications pulmonaires associées à la prématurité.....	12
4.1 Description du syndrome de détresse respiratoire.....	12
4.2 Les traitements et technique expérimentale.....	13
4.2.1 La corticothérapie anténatale.....	13
4.2.2 L'administration de surfactant exogène.....	14
4.2.3 La ventilation assistée.....	15
4.2.4 L'occlusion trachéale.....	15
5.1 La classification des lipoprotéines.....	17
5.1.1 Les chylomicrons.....	18
5.1.2 Lipoprotéines de très faible densité.....	18
5.1.3 Lipoprotéines de densité intermédiaire.....	19
5.1.4 Lipoprotéines de faible densité.....	19
5.1.5 Lipoprotéines de haute densité.....	19
5.2 Métabolisme des lipides.....	20
5.2.1 La voie des lipides exogènes.....	20
5.2.2 La voie des lipides endogènes.....	21

5.2.3 Le transport inverse du cholestérol.....	23
5.3 Les lipides du poumon fœtal.....	25
5.3.1 Apolipoprotéine A-I.....	25
5.3.2 Apolipoprotéine A-II.....	26
5.3.3 Apolipoprotéine C-II.....	26
5.3.4 Apolipoprotéine H.....	27
5.3.5 Lipoprotéine lipase.....	27
6. Description des études antérieures de notre laboratoire ayant menées à l'étude de la localisation du messenger et de la protéine des apolipoprotéines A-I, A-II, C-II, H et de la lipoprotéine lipase.....	29
6.1 Expression de gènes présentant un dimorphisme sexuel pendant une période de développement chevauchant la maturation des PTII dans les poumons fœtaux murins (titre français de ⁶⁷)......	29
6.2 Expression des apolipoprotéines A-I, A-II, C-II et H dans les poumons en développement et la différence sexuelle pour les lipides du surfactant (titre français de l'article ⁶⁶)......	30
7. Mon projet de maîtrise.....	31
7.1 Hypothèse de travail.....	31
7.2 Objectifs.....	31
7.3 Description de mon projet.....	32
7.4 Justification de l'utilisation du modèle murin.....	32
Chapitre II.....	33
Articles.....	33
1. Clarification des rôles respectifs des co-auteurs.....	34
1.1. Avant-propos.....	34
2. Résumé.....	35
3. Abstract.....	36
4. Introduction.....	37
5. Materials and methods.....	38
5.1 Mouse tissue preparation.....	38
5.2 RNA probes and in situ hybridization.....	38
5.3 Immunohistochemistry.....	39
5.4 Quantitative Real-Time PCR and Statistical Analysis.....	40
6. Results.....	40
6.1 mRNA and protein localization of LPL and apoC-II during the pseudoglandular and the canalicular stages.....	40
6.2 ApoC-II and LPL mRNA levels during the saccular stage and the first segment of the alveolar stage.....	42

6.3 mRNA and protein localization of LPL and apoC-II during the saccular and the beginning of the alveolar stages of lung development	43
7. Discussion	44
8. Acknowledgements	48
9. References	49
10. Figure legends	52
11. Tables and figures	55
Chapitre III	64
Étude de caractérisation des apolipoprotéines A-I, A-II et H dans le poumon fœtal murin	64
Chapitre IV	72
Discussion et conclusion	72
1. Résumé des principaux résultats de l'étude	73
1.1. Changement de localisation pour l'apoA-I	74
1.2. Changement de localisation pour l'apoA-II	74
1.3. Changement de localisation pour l'apoH	75
2. Rôles des androgènes et des glucocorticoïdes dans l'expression des apolipoprotéines A-I, A-II, C-II, H et de la lipoprotéine lipase dans le développement pulmonaire	76
3. Conclusions	78
3.1. Rappel des principaux résultats de l'étude	78
3.2. Implications des résultats obtenus	78
Chapitre V	80
Bibliographie	80
Annexe	89
Résultats complémentaires	89
1. Validation de la technique d'hybridation <i>in situ</i> à la DIG par l'hybridation <i>in situ</i> au ³⁵ S	90
2. Vérification de la spécificité des sondes par hybridation <i>in situ</i> sur des tissus murins contrôles	91

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques de chaque stade du développement pulmonaire...3

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentant les composantes de la portion conductrice et de la portion respiratoire du système pulmonaire.	22
Figure 2 : Coupes histologiques de poumons aux différents stades de développement.	6
Figure 3 : Schéma représentant la voie des lipides exogènes.	2121
Figure 4 : Schéma représentant la voie des lipides endogènes.	2222
Figure 5 : Schéma représentant la voie de transport inverse du cholestérol.	2424
Figure 6 : Distribution du messenger et de la protéine de l'apoA-I dans le poumon fœtal murin.	6767
Figure 7 : Distribution du messenger et de la protéine de l'apoA-II dans le poumon fœtal murin.	6969
Figure 8 : Distribution du messenger et de la protéine de l'apoH dans le poumon fœtal murin.	7171
Figure 9 : Hybridation <i>in situ</i> au ³⁵ S et hybridation <i>in situ</i> à la DIG pour α-SMA sur des coupes adjacentes d'un poumon fœtal murin au JG 15.5.	9191
Figure 10 : Distribution des messagers de l'apolipoprotéine A-I, A-II, C-II, H et la lipoprotéine lipase sur des coupes de foie, de rein et de l'intestin grêle de souris adulte.	9494

Liste des abréviations

17 β HSD2 : 17beta-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2

17 β HSD5 : 17beta-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 5

a.a. : acides aminés

ABCA-1 : «ATP-binding cassette transporter» membre 1 de la famille des transporteurs de cassettes liant l'ATP

ACTHr: «adenocorticotropin hormone receptor» récepteur de l'hormone adénocorticotropine

ADN: acide désoxyribonucléique

apo : apolipoprotéine

ARN: acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

B : bronche

BDP : bronchodysplasie pulmonaire

C : capillaire

CB : conduits bronchiques

CBI : conduit biliaire

CE: cellules endothéliales

CETP: «cholesterylester transfer protein» protéine de transfert du cholestérol estérifié

Cl : ions chlorures

CM : chylomicrons

CR : conduits respiratoires

CRH : «corticotropin releasing hormone» l'hormone corticotropine

CRHbp: «corticotropin releasing hormone binding protein» protéine de liaison de la corticotropine

CRHr1: «corticotropin releasing hormone receptor 1» récepteur 1 de la corticotropine

CRHr2 β : «corticotropin releasing hormone receptor 2 beta» récepteur 2 beta de la corticotropine

CV : core de villi

D : épithélium distal
DHT : dihydrotestostérone
DIG: «digoxigenin»
DPPC: dipalmitoylphosphatidylcholine
DSPC : phosphatidylcholine disaturée
EC : ester de cholestérol
ECB : épithélium des conduits bronchiques
ECR : épithélium des conduits respiratoires
EGF : «epidermal growth factor» facteurs de croissance épidermal
FGF : «fibroblast growth factor» facteurs de croissance fibroblastique
Gapdh : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GATA : facteur de transcription ayant comme caractéristique de se lier à la séquence «GATA»
Gli : facteur de transcription Gli
GR : «glucocorticoid receptor» récepteurs des glucocorticoïdes
H : hépatocyte
HDL : «high density lipoprotein» lipoprotéine de haute densité
HFN3 β : «hepatic nuclear factor» protéines homologues nucléaires hépatiques
Hmbs : hydroxyméthylbilane synthase
IDL: «intermediate density lipoprotein» lipoprotéine de densité intermédiaire
IHC: immunohistochimie
Irx : complexes Iroquois
ISH: hybridation *in situ*
JG: jour de gestation
L : lac
L/S : ratio lécithine/sphingomyéline
LCAT : lécithine-cholestérol-acyltransférase
LDL: «low density lipoprtein» lipoprotéine de faible densité
LH: lipase hépatique
LPL : lipoprotéine lipase
M : mésenchyme

- MA** : macrophage
- ML** : muscle lisse
- Nkx2.1** : facteur de transcription thyroïdien 2.1
- OCT** : «optimal cutting temperature» température optimale de coupe
- OE** : œsophage
- P** : épithélium proximal
- PC** : phosphatidylcholine
- PCR** : «polymerase chain reaction» réaction de polymérase en chaîne
- PDGF** : «platelet-derived growth factor» facteur de croissance dérivés des plaquettes
- PECAM-1** : «platelet endothelial cell adhesion molecule» molécule d'adhésion aux plaquettes des cellules endothéliales
- PG** : phosphatidylglycérol
- PI** : phosphatidylinositol
- PN** : post-natal
- Pod-1** : facteur de transcription en forme hélice-boucle-hélice
- POMC** : «pro-opiomelanocortin» pro-opiomélanocortine
- PPAR α** : «peroxisome proliferator-activated receptors» récepteur au facteur activé de prolifération des peroxyosomes
- PTI** : pneumocyte type I
- PTII** : pneumocyte type II
- QPCR** : «quantitative polymerase chain reaction» réaction de polymérase en chaîne quantitative
- SDR** : syndrome de détresse respiratoire
- Shh** : Sonic hedgehog
- SP** : «surfactant protein» protéine associée au surfactant
- SR-BI/Cla-1** : «scavenger class B type 1 receptor» récepteur récupérateur de classe B et de type 1
- Tbx** : «T-box transcription factor» facteur de transcription de boîte T
- Tfm** : «testicular feminization mouse» souris féminisée ayant un récepteur des androgènes non fonctionnel
- TG** : triglycéride

V : vaisseau

VEGF : «vascular endothelial growth factor» facteur de croissance vasculaire endothéliale

VEGF/KDR : «vascular endothelial growth factor receptor 2» récepteur 2 du facteur de croissance vasculaire endothéliale

VLDL : «very low density lipoprotein» lipoprotéine de très faible densité

vWF : «von Willebrand factor» facteur de von Willebrand

α -sma : «alpha-smooth muscle actin» marqueur de muscle lisse

Chapitre I
Introduction

1. Description du développement pulmonaire

Le poumon a pour rôle de fournir de l'oxygène à l'organisme et d'en expulser les déchets gazeux du corps. Chez les mammifères, le système respiratoire se divise en deux régions fonctionnelles, soit la portion conductrice et la portion respiratoire. La portion conductrice est composée de la cavité nasale, du pharynx, du larynx, de la trachée, des bronches et des bronchioles. On y retrouve trois principaux types cellulaires : les cellules ciliées, les cellules calciformes et les cellules basales. La portion respiratoire qui représente l'unité d'échange gazeux est formée par les bronchioles qui mènent aux alvéoles. Les parois sont composées de deux types de cellules épithéliales : les pneumocytes de type I (PTI) et de type II (PTII) ¹. Les alvéoles sont en contact étroit avec le système vasculaire pulmonaire.

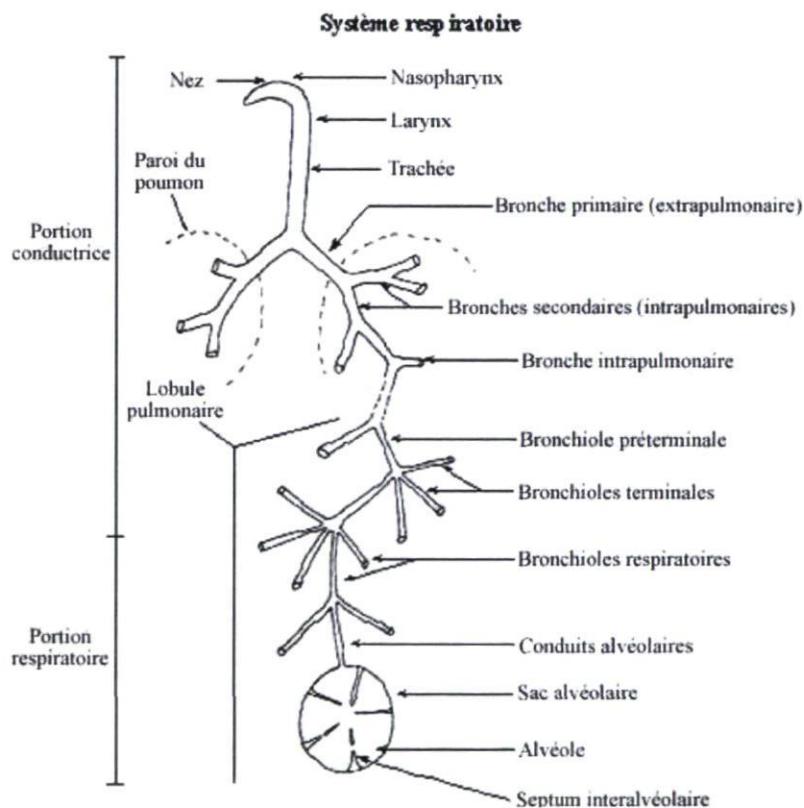


Figure 1 : Schéma représentant les composantes de la portion conductrice et de la portion respiratoire du système pulmonaire. Tirée de ²

Le développement pulmonaire chez les mammifères se divise en cinq grandes phases, soient embryonnaire, pseudoglandulaire, canaliculaire, sacculaire et alvéolaire/micro-vasculaire. Les périodes de développement correspondant à chacune de ces phases se chevauchent ³⁻⁷. Afin de faciliter la description de chacune des étapes du développement pulmonaire, les périodes inscrites ci-dessous sont basées sur l'article de Warburton et al ⁷. Voici un tableau résumant les principales caractéristiques de chacune des étapes du développement pulmonaire.

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques de chaque stade du développement pulmonaire. Tiré de ⁸

Stade	Période	Caractéristiques
Embryonnaire	- Humain : 0 à 7 semaines - Souris : 0 à 9.5 jours	- Émergence du bourgeon pulmonaire - Première ramification bronchique - Acquisition de l'asymétrie droite-gauche - Naissance des gros vaisseaux (veines et artères)
Pseudoglandulaire	- Humain : 8 à 17 semaines - Souris : 9.5 à 16.5 jours	- Formation de l'arbre bronchique (voie conductrice) par segmentations successives - Développement parallèle de l'arbre vasculaire
Canaliculaire	- Humain : 18 à 27 semaines - Souris : 16.5 à 17.5 jours	- Formation des dernières divisions terminales - Différenciation des épithéliums distal et proximal - Différenciation des pneumocytes de type I et II - Amincissement du parenchyme - Formation d'une barrière primitive d'échange
Sacculaire	- Humain : 28 à 35 semaines - Souris : 17.5 à post-natal 5	- Formation des saccules, expansion des espaces aériens - Accumulation des inclusions lamellaires - Contact des capillaires avec la membrane basale
Alvéolaire/micro-vasculaire	- Humain : terme à 3 ans - Souris : post-natal 5 à post-natal 30	- Formation des alvéoles par septalisation secondaire - Fusion des capillaires, passage à un seul réseau de capillaire - Amincissement de la barrière d'échange

1.1 Description de la phase embryonnaire

La première phase a lieu durant les sept premières semaines de gestation chez l'humain et les 9.5 premiers jours chez la souris. La phase embryonnaire débute avec la formation du sillon laryngotrachéal et l'apparition du bourgeon primordial. Le bourgeon pulmonaire se trouve au niveau de la partie caudale du sillon et se divise pour former les deux bourgeons bronchiques primaires. Par la suite, ces deux bronches primaires se divisent de manière inégale pour former les bronches lobaires. Chez l'humain, il y a formation de trois bourgeons du côté droit et de deux bourgeons du côté gauche. Chez la souris, on retrouve plutôt quatre bourgeons du côté droit et un seul du côté gauche. Ces bourgeons correspondent aux lobes pulmonaires ultérieurs. Ensuite, plusieurs divisions subséquentes des bourgeons endodermiques permettent l'apparition des bourgeons secondaires. Les bronches segmentées se forment, donnant naissance aux segments bronchopulmonaires^{1,8}. La vascularisation du poumon commence aussi à cette phase. Tout débute par la formation de lacs dans le mésenchyme adjacent aux bronches où l'on retrouve des cellules hématopoïétiques. Par la suite, les vaisseaux centraux se développent pour devenir ultérieurement l'artère et la veine pulmonaire⁸⁻¹¹.

1.2 Description de la phase pseudoglandulaire

La phase pseudoglandulaire chevauche les semaines 8 à 17 chez l'humain et les jours 9.5 à 16.5 chez la souris. C'est au cours de celle-ci qu'il y a ramifications des bourgeons bronchiques. Chez la souris, les ramifications atteignent 20 niveaux et n'augmentent ensuite qu'en taille. Les huit derniers niveaux de ramifications sont les bronchioles. L'épithélium, couvrant la partie conductrice du poumon, va se différencier en cellules épithéliales ciliées et en cellules sécrétoires. Au niveau des bronches et bronchioles, l'épithélium va se différencier et amorcer la sécrétion du liquide pulmonaire. D'autres types cellulaires peuvent être observés à ce stade du développement tel que les cellules musculaires lisses^{1,6,8}. L'arbre vasculaire se développe en parallèle avec l'arbre bronchique. Le système veineux est le premier à établir une connexion avec le cœur tandis que la connexion avec les artères pulmonaires gauche et droite survient plus tard au cours

de cette phase du développement. De plus, il y a une augmentation de la complexité du réseau vasculaire^{8, 10, 11}. Les membranes pleurales et le système lymphatique pulmonaire se développent à la fin de cette phase.

1.3 Description de la phase canaliculaire

La prochaine phase, nommée canaliculaire, a lieu de la 18^{ième} à la 27^{ième} semaine chez l'humain et aux jours 16.5 et 17.5 chez la souris. C'est au cours de cette période que les structures de base pour les échanges gazeux se forment et que le réseau de capillaires au niveau du mésenchyme se développe. Au début de cette phase, les premières bronchioles respiratoires se développent et des canalicules se forment à partir de la dernière génération de bronchioles respiratoires. Les cellules épithéliales respiratoires se différencient en PTI et en PTII¹². De petits vaisseaux sanguins envahissent l'épithélium des conduits respiratoires permettant ainsi l'ébauche de la barrière air-liquide¹¹. De plus, cette phase du développement coïncide avec le début de la synthèse du surfactant pulmonaire, un complexe essentiel au bon fonctionnement du poumon.

1.4 Description de la phase sacculaire

La période sacculaire, débutant à la 28^{ième} semaine chez l'humain ou au jour 17.5 chez la souris, est associée avec des changements drastiques dans l'apparence morphologique des poumons en développement. Le tissu interstitiel se développe augmentant ainsi le volume et la surface pulmonaires. Les sacs alvéolaires, formés de PTI et de PTII, se situent aux extrémités distales de chaque division terminale. De plus, les saccules sont séparées par des septa qui deviennent plus étroits et plus compacts^{8, 12}. C'est au niveau des cellules mésenchymateuses des septa que le réseau vasculaire termine son développement. À ce stade, le réseau est en contact avec les PTI assurant ainsi la structure de base pour les échanges gazeux^{8, 11}.

1.5 Description de la phase alvéolaire/micro-vasculaire

La dernière période, la phase alvéolaire/micro-vasculaire, est caractérisée par la poursuite du développement des alvéoles et de la maturation pulmonaire. Cette phase débute par une expansion pulmonaire où les saccules augmentent de volume. Par la suite, plusieurs bourgeons apparaissent sous l'influence de facteurs de régulation et se développent pour finir en petits espaces aériens appelés alvéoles. Les événements qui accompagnent cette phase du développement pulmonaire comprennent notamment la prolifération cellulaire, le renouvellement de la matrice extracellulaire et la réduction du tissu interstitiel. À la naissance, environ 50 millions des alvéoles du poumon humain sont formées. Cette phase se poursuit jusqu'à l'obtention d'environ 300 millions d'alvéoles pulmonaires. Sa durée est d'environ 2 ans chez l'humain et de 25 jours chez la souris ^{8, 12}.

Afin de mieux visualiser le poumon tout au long de son développement, voici une figure présentant des poumons aux différents stades de développement pulmonaire et les différents phénotypes cellulaires observables.

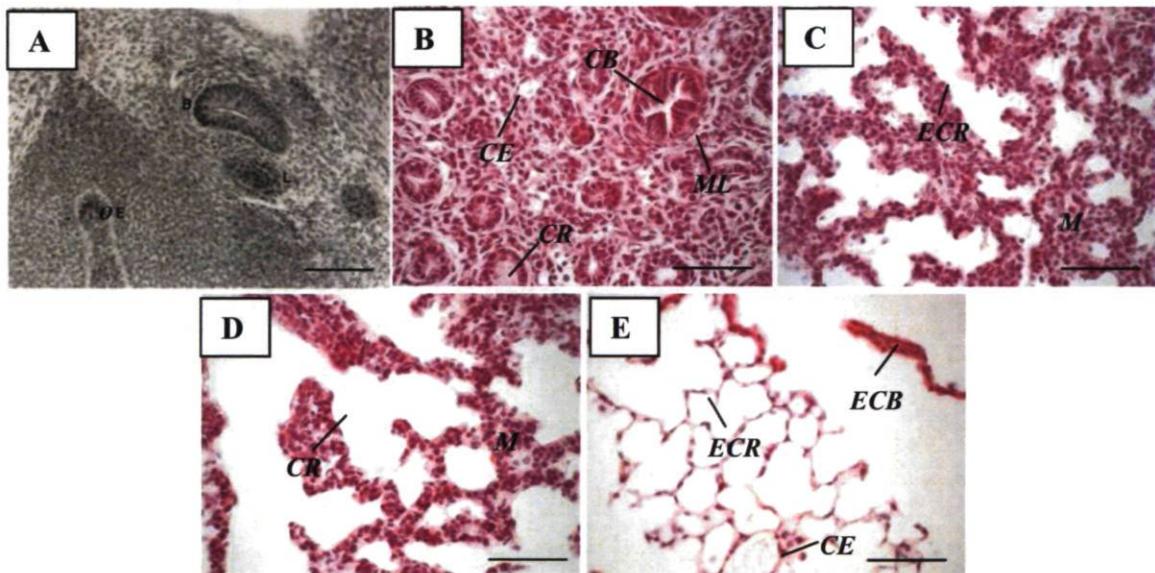


Figure 2 : Coupes histologiques de poumons aux différents stades de développement. A) Poumon humain à la phase embryonnaire, adaptée de ¹⁰ B) Poumon murin à la phase pseudoglandulaire C) Poumon murin à la phase canaliculaire D) Poumon murin à la phase sacculaire E) Poumon murin à la phase alvéolaire. Un grossissement, 200X (A) avec une barre d'erreur de 100µm ou de 400X (B, C, D et E) avec une barre d'erreur de 50 µm. **B :** Bronche; **CB :** conduit bronchique; **CE :** cellule endothéliale; **CR :** conduit respiratoire; **ECB :** cellule épithéliale des conduits bronchiques; **ECR :** cellule épithéliale des conduits respiratoires; **L :** Lac contenant des cellules hématopoïétiques; **M :** mésenchyme; **ML :** muscle lisse; **OE :** cœsophage.

2. Les régulateurs du développement pulmonaire

La morphogenèse pulmonaire est sous le contrôle de plusieurs facteurs qui vont interagir tout au long de l'axe proximal-distal des voies respiratoires. Parmi ces facteurs on retrouve des facteurs de transcription, des facteurs de croissance, des molécules de la matrice extracellulaire, des intégrines ainsi que des molécules d'adhésion intercellulaires. Ils vont influencer localement certains gènes et agir directement sur le patron endodermique et la morphogenèse de l'embranchement pulmonaire, l'asymétrie droite-gauche du poumon, la vascularisation et finalement sur la réponse mécanique au stress^{3,4}.

Certains facteurs qui sont exprimés par l'épithélium pulmonaire influencent sa propre différenciation. Parmi ces facteurs on retrouve les facteurs nucléaires hépatiques (HFN3 β), le facteur de transcription thyroïdien 2.1 (Nkx2.1), les facteurs de la famille des GATA (GATA-6) ainsi que les membres de la famille des boîtes homéotiques des complexes Iroquois (Irx)⁴. L'épithélium pulmonaire sécrète aussi les morphogènes Sonic Hedgehog (Shh) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFs). D'autres facteurs sont plutôt sécrétés par le mésenchyme pulmonaire. Parmi ceux-ci, on retrouve les facteurs fibroblastiques (FGFs) et épidermiques (EGFs). Certains facteurs exprimés au niveau du mésenchyme pulmonaire ont été associés au contrôle du patron épithélial. Parmi ceux-ci, on retrouve les facteurs de transcription Gli2 et Gli3, la protéine Pod-1, et les facteurs de transcription de boîte T2 (Tbx2) et 5 (Tbx5). Les facteurs impliqués dans la vascularisation du poumon comprennent notamment les membres de la famille des facteurs de croissance vasculaire endothéliale (VEGF), les membres de la famille des angiopoïétines ainsi que les membres de la famille des éphrines³. Certains facteurs sont cruciaux pour le développement pulmonaire. Par exemple, Shh et FGF10 sont essentiels à la mise en place du patron de développement du système respiratoire primordial. Chez la souris, il a été démontré que le rôle de Shh était de préserver l'asymétrie du poumon en prévenant l'expression de certains déterminants du lobe gauche de s'exprimer dans le lobe droit. D'autres facteurs tels que le FGF8, la N-cadhérine, l'activine β , le récepteur IIA de l'activine ainsi que le HNF4 sont impliqués dans l'asymétrie droite-gauche du poumon^{3,4}.

3. La maturation pulmonaire

La maturation pulmonaire se caractérise par la différenciation de l'épithélium et la sécrétion de surfactant ^{3, 13}. Plusieurs facteurs endocriniens sont impliqués dans la régulation du développement pulmonaire et dans la transition vers la vie extra-utérine ¹⁴. La communication entre les fibroblastes et les cellules épithéliales pulmonaires fait intervenir des facteurs paracrines favorisant la maturation des PTII. Cette communication intercellulaire entre les fibroblastes et les PTII permet d'amorcer la synthèse de surfactant pulmonaire ¹⁵.

3.1 Changement de la fonction de l'épithélium

Durant le développement fœtal, les poumons des mammifères sont des organes sécréteurs qui effectuent des mouvements semblables aux mouvements respiratoires. Les échanges gazeux ont lieu par l'intermédiaire du placenta. Les futures régions pulmonaires qui permettront les échanges sont remplies de liquide qui est essentiel à la croissance et au développement normal des poumons avant la naissance ^{16, 17}. Le transport actif d'ions chlorures (Cl⁻) à la surface des cellules épithéliales génère une force osmotique induisant la sécrétion du liquide de la microcirculation pulmonaire vers la lumière pulmonaire. La production du liquide pulmonaire par l'épithélium survient tôt en gestation, soit à la 6^{ème} semaine chez le fœtus humain ¹⁸. Ainsi, cette production induit une expansion du lumen nécessaire au bon développement pulmonaire. Dans un environnement aérien, les alvéoles doivent rester ouvertes et être dépourvues de liquide pulmonaire fœtal afin de permettre des échanges gazeux optimaux ¹⁹. À la naissance, le transport de l'oxygène du placenta aux poumons est dépendant de la réabsorption rapide du liquide pulmonaire fœtal. Il est donc primordial que les cellules de l'épithélium distal pulmonaire passe de la sécrétion de Cl⁻ à la sécrétion d'ions sodium ¹⁸.

Certaines études démontrent l'importance de la mécano-transduction pour le bon développement pulmonaire. La mécanotransduction est déclenchée par des contraintes mécaniques et se poursuit en activant plusieurs cascades complexes d'événements

biochimiques conduisant à des changements fonctionnels dans la cellule. La force exercée par le liquide pulmonaire lors du développement en est un exemple. L'occlusion trachéale permet d'étudier la mécanotransduction en permettant d'amplifier la distension pulmonaire, accélérant ainsi de façon significative le développement pulmonaire général¹⁹.

3.2 Surfactant

Le surfactant est un complexe de lipides et de protéines sécrété continuellement par les cellules épithéliales de type II. Il forme une monocouche à la surface des alvéoles pulmonaires afin de prévenir leur collapsus en diminuant la tension de surface qui existe à l'interface air-liquide des alvéoles et ainsi permettre au poumon d'être fonctionnel. Les composants principaux du surfactant sont des phospholipides et des protéines. Les phospholipides représentent environ 80% du matériel tensioactif et agissent comme support biochimique du surfactant. Son principal constituant est la phosphatidylcholine (PC) dont la moitié est représentée par le dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)^{8, 20, 21}. Les phospholipides acides tels que le phosphatidylglycérol (PG) et le phosphatidylinositol (PI) représentent 8-15% des phospholipides totaux du surfactant pulmonaire. La composition du surfactant pulmonaire diffère entre le fœtus et l'adulte. Au début du stade sacculaire, le PI prédomine sur le PG et laisse place progressivement au PG tout au long du développement pulmonaire. De plus, on retrouve des lipides neutres qui composent le surfactant pulmonaire tel que le cholestérol dans une proportion de 8-10%. De petites quantités de mono, di et tri-acylglycérol ont été rapportées, ainsi que des acides gras libres, dont principalement le palmitate⁸.

On retrouve également les protéines du surfactant (SP) que l'on peut classer en deux groupes, soit les protéines du surfactant hydrophiles SP-A et SP-D et les protéines du surfactant hydrophobes SP-B et SP-C. Ces protéines contribuent à diriger et à maintenir les phospholipides à l'interface alvéolaire sous une forme fonctionnelle grâce à des interactions moléculaires protéine-phospholipide et protéine-protéine. Les protéines SP-A et SP-D font partie de la famille des collectines. Leurs caractéristiques structurales permettent de lier différents ligands comme le calcium, les sucres et les lipides tout en leur conférant la

capacité de jouer un rôle important dans l'immunité naturelle du système. En effet, les protéines SP-A et SP-D possèdent aussi un rôle essentiel dans la fonction immune pulmonaire²². Les protéines SP-B et SP-C sont des polypeptides hydrophobes qui résultent du processus protéolytique de plus grands précurseurs lors de l'exocytose du surfactant pulmonaire par les PTII. Ces protéines jouent un rôle crucial dans la formation et la stabilisation du film qui forme le surfactant pulmonaire²³. De plus, chez l'humain il a été démontré que SP-B était nécessaire à l'expression de SP-C mature. En l'absence de SP-B, SP-C est sécrétée sous sa forme non clivée. Plusieurs croient que la présence de cette protéine anormale est nuisible pour la fonction pulmonaire^{8, 13, 24}.

Chez la souris, la production du surfactant pulmonaire débute autour du jour 17.5 de gestation²⁵ tandis que chez l'humain²⁶, elle débute au alentour de la 24^{ième} semaine de la grossesse. Tel que démontré par Mazela et Nielsen, l'augmentation de la production et de la sécrétion du surfactant se fait au jour 17.5 de la gestation chez la souris, et au cours de la 24^{ième} à la 35^{ième} semaine de la grossesse chez l'humain. La majorité des éléments du surfactant sont synthétisés par les pneumocytes de type II où ils sont stockés sous forme de corps lamellaires. Au cours du troisième trimestre, le surfactant s'accumule et change dans sa composition pour finalement être sécrété par exocytose. Une fois sécrété, les corps lamellaires changent de structure afin de former la myéline tubulaire. Cette dernière est une structure transitionnelle hautement ordonnée, organisée en réseau, et précurseur de la monocouche. À la naissance, une quantité abondante de ces inclusions sont sécrétées dans la lumière alvéolaire²¹. Chez l'adulte, le surfactant est en renouvellement constant puisque sa demi-vie est d'une durée de quelques dizaines heures. Environ 50% du surfactant est recyclé en corps lamellaires par les PTII tandis que l'autre 50% est dégradé par les macrophages ou emprunte la voie lysosomiale des PTII⁸.

3.3 Dimorphisme sexuel

Il y a plus de trente ans, les premières données furent publiées concernant l'incidence plus élevée du syndrome de détresse respiratoire chez les nouveau-nés garçons par rapport aux filles²⁷⁻³⁰. Tel que mentionné préalablement, plusieurs régulateurs positifs

et négatifs contrôlent le développement et la maturation pulmonaire ¹⁴. Plusieurs études ont permis d'associer ce délai dans la maturation pulmonaire chez les mâles à la présence d'androgènes dans le poumon fœtal. Ce délai peut être observé chez plusieurs mammifères tels que le rat, le lapin, la souris et l'humain. Un bon indicateur utilisé aujourd'hui afin d'évaluer la maturité pulmonaire est le ratio lécithine/sphingomyéline (L/S), composés présents dans le liquide amniotique. Ce rapport entre ces deux phospholipides diffère lors de l'augmentation de la synthèse du surfactant entre les mâles et les femelles. Brièvement, Nielsen et al. ont démontré que l'administration de dihydrotestostérone (DHT), un métabolite biologiquement actif de la testostérone, diminuait le ratio de phospholipides chez les fœtus femelles. De plus, l'administration de flutamide, un anti-androgène, augmentait le ratio L/S chez les fœtus mâles ³¹. D'autres études réalisées par Nielsen et al. ont permis de démontrer que le mécanisme de la maturation pulmonaire est un processus qui est dépendant du récepteur aux androgènes ²⁵. Leurs études furent réalisées à partir de la souris *Tfm*, un modèle animal féminisé présentant un récepteur des androgènes inactif. L'inactivation de ce récepteur permettait d'accélérer le développement pulmonaire chez les fœtus mâles qui avaient alors une maturation comparable à celle de la femelle.

Les estrogènes ont un effet opposé aux androgènes sur le développement pulmonaire. Des études ont démontré par des cultures d'explants de poumons fœtaux de rats en phase de prolifération cellulaire que l'estradiol diminuait la prolifération et stimulait la synthèse de surfactant chez les mâles et les femelles ³². De plus, les glucocorticoïdes accélèrent aussi la maturation pulmonaire en activant, entre autres, la synthèse des phospholipides du surfactant ³³.

4. Complications pulmonaires associées à la prématurité

La survie à la naissance dépend grandement du développement adéquat du poumon et de la maturation pulmonaire. En Amérique du Nord, environ 10% des grossesses se terminent prématurément et la complication la plus importante est le syndrome de détresse respiratoire (SDR) ou maladie des membranes hyalines. Cette pathologie compte pour 75% de la mort précoce et est un facteur important dans l'occurrence des maladies chroniques du poumon chez les enfants prématurés³. Plus précisément, l'occurrence du SDR est de 80 % pour les enfants nés à 28 semaines de grossesse et moins, 65% pour les enfants nés entre 29 et 30 semaines et 25% pour ceux nés entre 31 et 34 semaines³⁷. Sa forme la plus sévère mène à la bronchodysplasie pulmonaire (BDP) qui est associée à des problèmes pulmonaires et neurologiques et on l'observe le plus souvent chez les enfants nés à 28 semaines de grossesse et moins³⁴. Il existe deux sortes de BPD : la BPD classique et la «new» BPD. La BPD classique, étudié par l'équipe de Northway en 1967, se caractérise par un endommagement sévère des poumons d'un enfant né prématurément causé par la ventilation assistée et un haut taux d'oxygène³⁵. Les poumons d'enfants mourant de BPD présentent de l'inflammation, des alvéoles plus larges mais en moins grand nombre que la normale et un développement vasculaire anormal³⁵. Avec l'amélioration récente des soins prodigués aux enfants prématurés, la «new» BPD a été décrite par une dysfonction pulmonaire caractérisée par l'arrêt du développement des poumons des enfants prématurés et l'interruption de l'alvéolisation³⁶.

4.1 Description du syndrome de détresse respiratoire

Tel que mentionné antérieurement dans ce document, divers régulateurs contrôlent la production de surfactant pulmonaire par les cellules alvéolaires de type II. Ces dernières sont une part essentielle dans le processus de maturation pulmonaire. Une mauvaise régulation des facteurs qui gouvernent le processus de synthèse du surfactant augmente le risque de détresse respiratoire chez le fœtus. Ce phénomène est observé à la naissance d'un enfant qui a synthétisé et/ou sécrété les éléments du surfactant en une quantité et une qualité moindre, ce qui entraîne un collapsus pulmonaire de sévérité variable pouvant ainsi

engendrer plusieurs complications, telles que des maladies respiratoires chroniques, des séquelles neurologiques et même la mort. Le risque de détresse respiratoire, plus souvent observé chez les individus mâles, augmente avec le degré de prématurité du bébé ³⁷.

4.2 Les traitements et technique expérimentale

Jusqu'à ce jour, quelques thérapies ont été mises en place afin d'améliorer le pronostic respiratoire chez les nouveau-nés prématurés. Par contre, l'incidence plus élevée chez les garçons est toujours observée. Parmi les traitements les plus couramment pratiqués, on retrouve la corticothérapie anténatale, l'administration de surfactant exogène et la ventilation assistée. L'occlusion trachéale n'est pas utilisée fréquemment en clinique mais est parfois appliquée pour des cas particuliers. Les principaux aboutissements positifs de ces traitements sont la diminution de l'incidence du SDR, de la mortalité et de la morbidité chez les prématurés.

4.2.1 La corticothérapie anténatale

Les hormones glucocorticoïdes, produites naturellement par l'organisme, jouent un rôle primordial dans la régulation du développement pulmonaire. En fin de grossesse, une augmentation de la production de cortisol fœtal, un glucocorticoïde actif, est observée parallèlement à celle de son récepteur. Ce message endocrinien permet de stimuler la maturation pulmonaire. Plusieurs changements comme la différenciation des cellules mésenchymateuses, l'élimination du liquide intrapulmonaire et l'induction de la synthèse des composants du surfactant par les PTII sont sous l'effet des glucocorticoïdes menant ainsi à l'amélioration des fonctions respiratoires ³⁸. Par contre, certains effets négatifs des glucocorticoïdes ont été observés lors de l'alvéolarisation du poumon, comme l'augmentation du nombre et de la grosseur des alvéoles ³⁹.

En 1972, l'efficacité de la corticothérapie anténatale a été démontrée chez les mères à risque d'accoucher prématurément ⁴⁰. Les glucocorticoïdes synthétiques sont dérivés de la structure moléculaire du cortisol. Ces derniers ont une durée d'action plus longue, une

affinité supérieure pour le récepteur, une activité anti-inflammatoire plus importante et des propriétés minéralocorticoïdes réduites ou nulles comparativement aux glucocorticoïdes naturels. La bêtaméthasone et la dexaméthasone sont les glucocorticoïdes synthétiques les plus fréquemment utilisés. La bêtaméthasone est priorisée lors de traitements puisque les risques de problèmes neurologiques sont moins élevés ⁴¹. Bien que l'efficacité des traitements anténataux aux glucocorticoïdes, en ce qui concerne l'amélioration du pronostic des grands prématurés, soit reconnue, plusieurs questions demeurent sans réponse. Par exemple, l'utilisation de doses multiples ⁴¹ et le meilleur moment pour l'administration restent encore aujourd'hui des sources de débats ⁴². Notons que certains enfants ne répondent pas à la thérapie anténatale actuelle, mais nous en ignorons toujours la cause ³⁵. De plus, ces traitements peuvent induire des changements au niveau de la morphologie pulmonaire. Une réduction du nombre et une augmentation du volume des alvéoles peut être un effet négatif de la corticothérapie anténatale ³⁹.

4.2.2 L'administration de surfactant exogène

Les prématurés présentent souvent une déficience en surfactant. Suite à la naissance, il est possible de traiter ce déficit par l'administration de surfactant exogène. Souvent jumelé avec la corticothérapie anténatale, il s'agit d'un traitement couramment prodigué aux enfants nés prématurément. L'administration du surfactant permet de réduire la pression nécessaire à l'ouverture des voies respiratoires, d'augmenter le volume pulmonaire et de prévenir le collapsus pulmonaire ⁴³, tout en stimulant la production endogène de surfactant. Il existe deux types de surfactants exogènes pouvant être utilisés lors de ce traitement : d'origine naturelle et d'origine synthétique. La principale différence entre les deux types est la composition de la fraction protéique du surfactant. Ceux d'origine naturelle sont des dérivés bovins ou porcins et contiennent les protéines hydrophobes du surfactant et les lipides qui engendrent la distribution du film superficiel dans les alvéoles ⁴⁴, tandis que les surfactants synthétiques sont principalement composés de phosphatidylcholine disaturée (DSPC). Les deux types de surfactant sont efficaces dans la prévention et le traitement du SDR. Par contre, il semble que les surfactants naturels aient une action plus rapide et qu'ils diminuent davantage le risque de mortalité et la durée

de la ventilation assistée comparativement aux traitements synthétiques. Malgré l'efficacité des surfactants naturels, ces derniers peuvent causer des réactions immunologiques dues à la présence de protéines étrangères. Le moment de l'administration est aussi un facteur-clé. Par exemple, un traitement précoce réduirait l'incidence de pneumothorax, de maladies pulmonaires chroniques et d'emphysème ⁴⁵.

4.2.3 La ventilation assistée

Le support respiratoire jumelé à un autre traitement préalable est une pratique répandue dans le traitement de l'insuffisance respiratoire chez les enfants prématurés. Toutefois, cette intervention peut mener à une inflammation chronique, qui peut engendrer des changements physiologiques et morphologiques néfastes à la santé pulmonaire ultérieure de l'enfant. En effet, il est possible qu'une concentration trop élevée en oxygène lors de la ressuscitation soit associée à un taux accru de bronchodysplasie pulmonaire et de rétinopathie de la prématurité ^{46, 47}.

4.2.4 L'occlusion trachéale

Cette technique chirurgicale est principalement utilisée avec des modèles animaux pour étudier l'impact de la mécanotransduction sur le développement pulmonaire. Chez l'humain, elle peut être réalisée entre 26 et 28 semaines de grossesse et son utilisation clinique est restreinte à des cas particuliers de prématurité comme pour les fœtus porteurs d'hypoplasie pulmonaire⁴⁸. Cette intervention consiste à introduire un ballonnet à l'intérieur de la trachée. Le mode d'action est la séquestration du liquide intrapulmonaire qui entraîne une augmentation de la distension du poumon, ce qui active une réponse de mécanotransduction qui engendre une induction de la croissance pulmonaire ^{49, 50}. En effet, des études réalisées chez le rat et la souris ont démontré qu'une occlusion trachéale anténatale a un effet bénéfique sur le développement pulmonaire ⁵¹. Cependant l'occlusion trachéale n'a pas pour effet d'accélérer la maturation pulmonaire. Au contraire, dans la

plupart des modèles étudiés, l'occlusion trachéale diminue la différenciation des pneumocytes de types II et la production de surfactant⁵¹.

5. Particules du transport des lipides : les lipoprotéines

Les lipoprotéines participent au transport des lipides. Elles sont des particules globulaires de haute masse moléculaire formée d'une monocouche de phospholipides et de cholestérol libre, d'un cœur formé de lipides apolaires comme les triglycérides et le cholestérol estérifié, et présentent à leur surface des apolipoprotéines (apo).

Le cholestérol entre dans la composition des membranes cellulaires et est nécessaire à la synthèse des hormones stéroïdiennes. Il existe deux origines au cholestérol, soit le cholestérol exogène provenant de l'alimentation et le cholestérol endogène provenant de la synthèse par l'organisme. Les acides gras sont classifiés par leur longueur et par l'existence ou non de double liaison. Ceux ne comportant pas de double liaison sont dits saturés tandis que ceux comportant une ou plusieurs doubles liaisons sont dits insaturés. Dans le plasma, les acides gras saturés et insaturés existent essentiellement sous une forme estérifiée formant ainsi les triglycérides à partir du glycérol et le cholestérol estérifié à partir du cholestérol. Les apolipoprotéines sont amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles possèdent des propriétés hydrophiles et lipophiles. Disposées en périphérie, elles exposent vers le milieu aqueux des résidus hydrophiles, alors que les domaines apolaires sont en contact avec le noyau de la lipoprotéine. Cela permet ainsi le transport des lipides dans les liquides biologiques. Les apolipoprotéines sont synthétisées principalement par le foie et/ou l'intestin, et leurs poids moléculaire varient entre 7 000 et 250 000 Da en fonction du type. Elles assurent plusieurs rôles dont la fixation et la captation des lipoprotéines par les récepteurs membranaires situés dans plusieurs tissus. De plus, elles permettent l'activation de certaines enzymes telles que la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme libérant les acides gras de certaines lipoprotéines, et la lécithine-cholestérol-acyltransférase (LCAT), enzyme qui convertit le cholestérol en ester de cholestérol, lui permettant ainsi d'être véhiculé dans le cœur de la lipoprotéine^{52,53}.

5.1 La classification des lipoprotéines

On peut séparer les lipoprotéines en fonction de leur densité. On y retrouve cinq classes dont les chylomicrons (CM), les lipoprotéines de très faible densité (VLDLs), les

lipoprotéines de faible densité (LDLs), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDLs) et les lipoprotéines de forte densité (HDLs)^{52, 53}.

5.1.1 Les chylomicrons

Les chylomicrons sont responsables du transport des lipides alimentaires des intestins aux tissus. Ils ont un diamètre variant entre 80 et 500 nm, une densité de 0.93 g/ml et ils sont composés d'environ 86% de triglycérides, 3% d'esters de cholestérol, 2% de cholestérol libre, 7% de phospholipides et 2% de protéines. Une particule de chylomicron pourrait contenir les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III et E. L'apoB-48 est nécessaire à l'assemblage du chylomicron et elle est obtenue à partir d'une désamination de l'ARN de l'apoB-100^{54, 52, 55}.

5.1.2 Lipoprotéines de très faible densité

Les VLDLs sont produites et sécrétées par le foie. Elles participent à la voie de transport endogène des lipides, soit du foie vers les tissus périphériques. Ces particules, d'un diamètre variant de 30 à 70 nm et d'une densité de 0.95 à 1.010 g/ml, sont composées d'environ 55% de triglycérides, 12% d'esters de cholestérol, 7% de cholestérol libre, 18% de phospholipides et 8% de protéines. La fraction protéique peut être composée des apolipoprotéines B-100, E, C-I, C-II et C-III. L'apoB-100 est requise pour l'assemblage et pour l'intégrité structurelle du VLDL, alors que les autres apolipoprotéines peuvent subir des échanges avec d'autres lipoprotéines. La population de particules VLDL est hétérogène quant à la composition et à la fonction puisque la proportion des apolipoprotéines peut varier d'une particule à l'autre. La composition elle-même varie à partir de la production du VLDL vers sa conversion en IDL au fur et à mesure que les lipases viennent hydrolyser les triglycérides pour l'utilisation par les cellules^{54, 52, 56, 57}.

5.1.3 Lipoprotéines de densité intermédiaire

Les IDLs sont issues de l'hydrolyse des VLDLs par les lipases. Les IDLs sont de taille et de densité intermédiaires aux VLDLs et aux LDLs, soit de 27,2 à 30 nm et de 1.008 à 1.019 g/ml. Elles contiennent environ 23% de triglycérides, 29% d'esters de cholestérol, 9% de cholestérol libre, 19% de phospholipides et 19% de protéines. Une molécule d'apoB-100 est présente sur chaque IDL, de même que plusieurs molécules d'apoE^{54, 52, 57}.

5.1.4 Lipoprotéines de faible densité

Les LDLs sont issues des IDLs et constituent la dernière classe de lipoprotéines de la cascade des lipoprotéines contenant l'apoB-100. Par l'action des lipases, la particule VLDL originale, dans sa course vers la classe LDL, a perdu la majeure partie de ses triglycérides et s'est ainsi retrouvée enrichie en cholestérol estérifié. La taille des LDLs est d'environ 22 à 27,2 nm et leur densité varie entre 1.019 et 1.060 g/ml. Elles sont composées d'environ 6% de triglycérides, 42% d'esters de cholestérol, 8% de cholestérol libre, 22% de phospholipides et 22% de protéines. Une seule copie de l'apoB-100 est présente sur une LDL et elle est nécessaire au maintien de l'intégrité structurale de la particule. Les LDLs sont hétérogènes en fonction de leur taille, de leur densité et de certaines de leurs propriétés. Elles alimentent les tissus en lipides, ce qui explique qu'une augmentation en LDL entraîne des surcharges lipidiques. Petites et denses, elles sont considérées comme étant la sous-population la plus athérogène. Les LDLs peuvent être classées en sous-populations de phénotype A (petites particules très denses) et de phénotype B (larges particules)⁵⁸. Une autre classification permet de regrouper les sous-populations selon leur taille, de LDL₁ à LDL₇^{52, 54, 56, 57}.

5.1.5 Lipoprotéines de haute densité

Les particules HDLs en circulation peuvent être divisées en trois catégories selon leurs densités : les HDLs naissantes, les HDLs₂ et les HDLs₃. Les HDLs naissantes ont une forme discoïde stabilisée par les apolipoprotéines. Elles sont sécrétées par le foie et l'intestin et sont dérivées des résidus d'hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycérides

soit les chylomicrons et les VLDLs. Leur principal constituant lipidique est le phospholipide. Elles possèdent à leur surface les apolipoprotéines A-I, C-II, C-III et E. Lors de la maturation des HDLs, les apolipoprotéines C-II, C-III et E sont relâchées vers les lipoprotéines riches en triglycérides alors qu'elles recrutent les apolipoprotéines A-II et A-IV. Les HDL₂ ont une taille de 9 à 10 nm, une densité de 1.063 à 1.125 g/ml et présentent une composition d'environ 5% de triglycérides, 17% d'esters de cholestérol, 5% de cholestérol libre, 55% de phospholipides et 40% de protéines. Les HDL₃, quant à elles, ont une taille de 7 à 9 nm, une densité de 1.125 à 1.210 g/ml et une composition d'environ 3% de triglycérides, 13% d'esters de cholestérol, 4% de cholestérol libre, 25% de phospholipides et 55% de protéines^{54, 52, 59}.

5.2 Métabolisme des lipides

Les lipoprotéines transportent les lipides d'un tissu à l'autre, permettant le transport de composés hydrophobes (les lipides) dans un milieu hydrophile (le plasma sanguin). Tout au long de leur déplacement, les lipoprotéines subissent des modifications complexes qui affectent leur composition, leur structure et leur fonction. Arrivées à destination, les lipoprotéines sont captées par des récepteurs spécifiques ou non-spécifiques, afin de délivrer leur contenu aux cellules. Ce contenu peut ainsi être utilisé par la cellule pour la production d'énergie, le stockage de composés énergétiques, la production et le maintien des membranes cellulaires et la fabrication de différentes substances endogènes, tels que les hormones stéroïdiennes. Le métabolisme des lipides peut être divisé en trois parties : la voie exogène (à partir de l'intestin vers les autres tissus), la voie endogène (du foie aux autres tissus) et le transport inverse du cholestérol (des tissus au foie)^{52, 53}.

5.2.1 La voie des lipides exogènes

La fonction de la voie exogène est d'amener les lipides alimentaires aux tissus pour la production d'énergie, le stockage ou la synthèse de molécules. Les lipides alimentaires sont hydrolysés dans le petit intestin et sont absorbés par les cellules épithéliales intestinales. Les lipides y seront estérifiés et seront assemblés à l'aide de l'apoB-48 pour

former des CM. Ces derniers sont sécrétés dans la lymphe pour se retrouver dans la circulation sanguine. Dans les muscles et les tissus adipeux, les triglycérides contenus dans les CM sont hydrolysés par la LPL permettant ainsi la libération des acides gras pour le stockage ou la production d'énergie. L'apoC-II contenue dans les CM active la LPL, alors que l'apoC-III est reconnue pour diminuer son activité. C'est donc le ratio entre l'apoC-II et l'apoC-III qui déterminera la rapidité à laquelle le CM sera transformé en remnant de CM. Puisque seuls les triglycérides sont hydrolysés, le résidu sera enrichi en cholestérol estérifié et en apoE. Il est à noter que les apolipoprotéines A-I, A-IV, C-II, C-III et E peuvent subir des échanges avec les autres classes de lipoprotéines et, si elles sont relâchées en circulation, peuvent servir de constituants de base pour la formation des HDLs naissantes. Les résidus de CM sont captés au niveau du foie via le récepteur B/E. Environ 12 heures suivant un repas, la quantité de résidus de CM est très faible ^{53, 55, 60}.

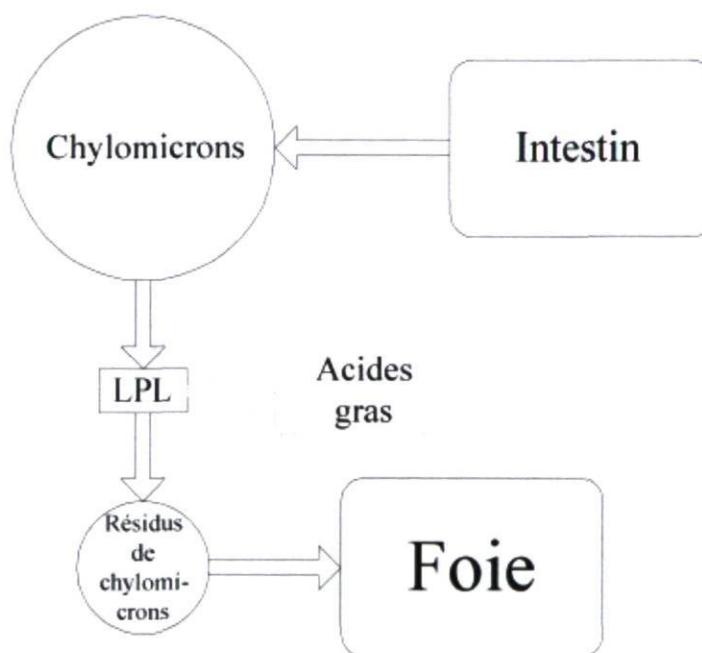


Figure 3 : Schéma représentant la voie des lipides exogènes. Adaptée de ⁶⁰

5.2.2 La voie des lipides endogènes

La voie des lipides endogènes permet le transport des lipides endogènes, du foie aux tissus périphériques. Lorsque la quantité de CM en circulation est faible, les besoins en triglycérides des tissus périphériques sont assurés par les lipides synthétisés dans le foie ou

transitant par celui-ci. Dans les capillaires, l'activité de la LPL sera modulée par le ratio apoCII/apoCIII et permettra l'hydrolyse des VLDLs. Les acides gras libérés par cette lipase serviront alors de source d'énergie. Les VLDLs subiront l'hydrolyse de leurs triglycérides par l'action de la lipase hépatique (LH) et principalement de la LPL, menant ainsi à la particule LDL. La LH peut hydrolyser les triglycérides restant dans la particule LDL. En cours de route, la grande majorité des apolipoprotéines des VLDLs sont perdues soit par échange ou par libération dans le plasma. Il ne reste alors qu'une seule molécule d'apoB-100, nécessaire au maintien de l'intégrité de la LDL. Les LDLs peuvent allées au foie ou être internalisées par des cellules extra-hépatiques via le récepteur B/E afin d'apporter du cholestérol aux tissus périphériques. Chez l'humain, la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP) peut échanger le cholestérol estérifié contre des triglycérides entre différentes classes de lipoprotéines^{53, 55, 60}.

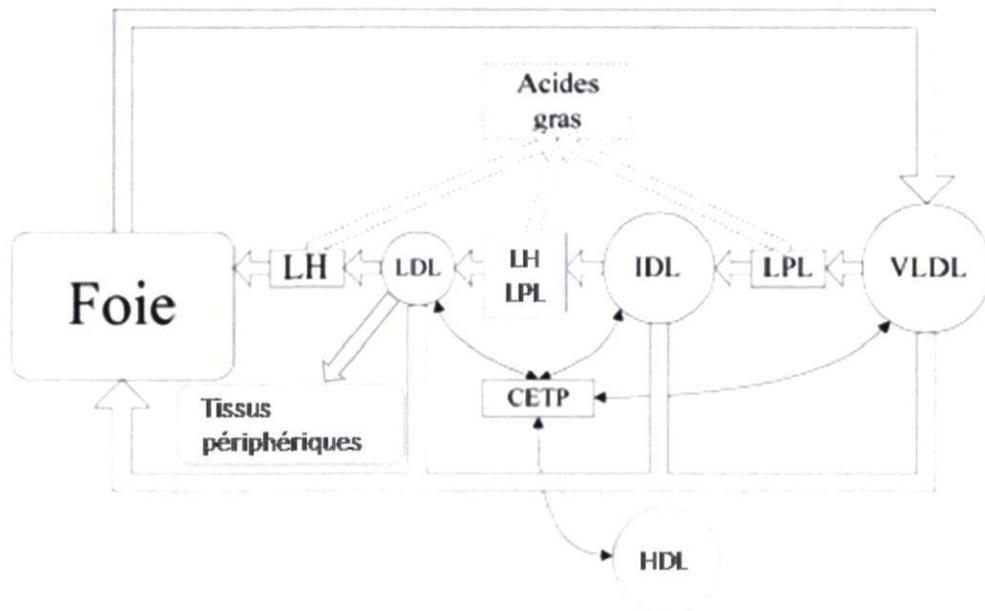


Figure 4 : Schéma représentant la voie des lipides endogènes. Adaptée de⁶⁰

5.2.3 Le transport inverse du cholestérol

Les particules circulantes de HDL ont la capacité de réduire le cholestérol des tissus périphériques, y compris les macrophages chargés de lipides de la paroi des vaisseaux, et de le rediriger vers le foie où il sera finalement éliminé, un processus intitulé le transport inverse du cholestérol. L'étape initiale est la sortie du cholestérol. Les particules circulantes de HDL ont la capacité de soustraire le cholestérol des membranes cellulaires. De nombreuses voies ont été identifiées à l'origine de ce processus, comprenant la simple diffusion et le transport ATP-dépendant. Récemment, il a été découvert que le transporteur transmembranaire ABCA-1 participait à la sortie du cholestérol à partir d'une vaste gamme de tissus. Les particules circulantes de HDL ont une structure et une composition hétérogènes. La plupart de ces particules sont sphériques, mais la répartition de leur taille est polymodale, les fractions les plus nombreuses étant les HDL₂ et HDL₃. Cependant, les HDL naissantes ou pré-β-HDL ne constituent qu'une petite fraction des HDL circulantes. Ces particules sont formées principalement de phospholipides, et l'élément protéique est exclusivement l'apolipoprotéine A-I, la principale protéine structurelle des particules de HDL. Lorsqu'elles absorbent le cholestérol cellulaire, ces particules absorbent également la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT), une enzyme qui induit l'estérification du cholestérol dérivé des cellules ou convertit le cholestérol libre en ester de cholestérol. Ce lipide neutre s'introduit dans le noyau de la particule de HDL et diminue continuellement le cholestérol libre du HDL, maintenant ainsi un gradient de concentration permettant d'assurer constamment la sortie du cholestérol libre des tissus. En raison de l'accumulation continue de cholestérol estérifié, les particules de HDL deviennent sphériques et augmentent de dimension. Le cholestérol estérifié dérivé des cellules peut ensuite être transféré vers les particules contenant l'apolipoprotéine B (VLDL, IDL et LDL) en échange des triglycérides, par le biais de la protéine de transfert de l'ester de cholestérol. Bien que le cholestérol dérivé des cellules puisse être absorbé par le foie par le biais de l'absorption des particules de LDL, des études récentes suggèrent que le transport direct du cholestérol des HDL au foie peut avoir lieu par l'intermédiaire d'un récepteur des HDL nouvellement décrit, le récepteur capteur de classe B type I (SR-B1). En outre, les triglycérides s'accumulant dans les HDL sont continuellement hydrolysés par la LH. Dans le foie, le cholestérol sera transformé en sels biliaires ou sera directement excrété dans la bile, alors

que dans les tissus stéroïdogéniques, le cholestérol sera transformé en hormones stéroïdiennes^{52, 59, 61}.

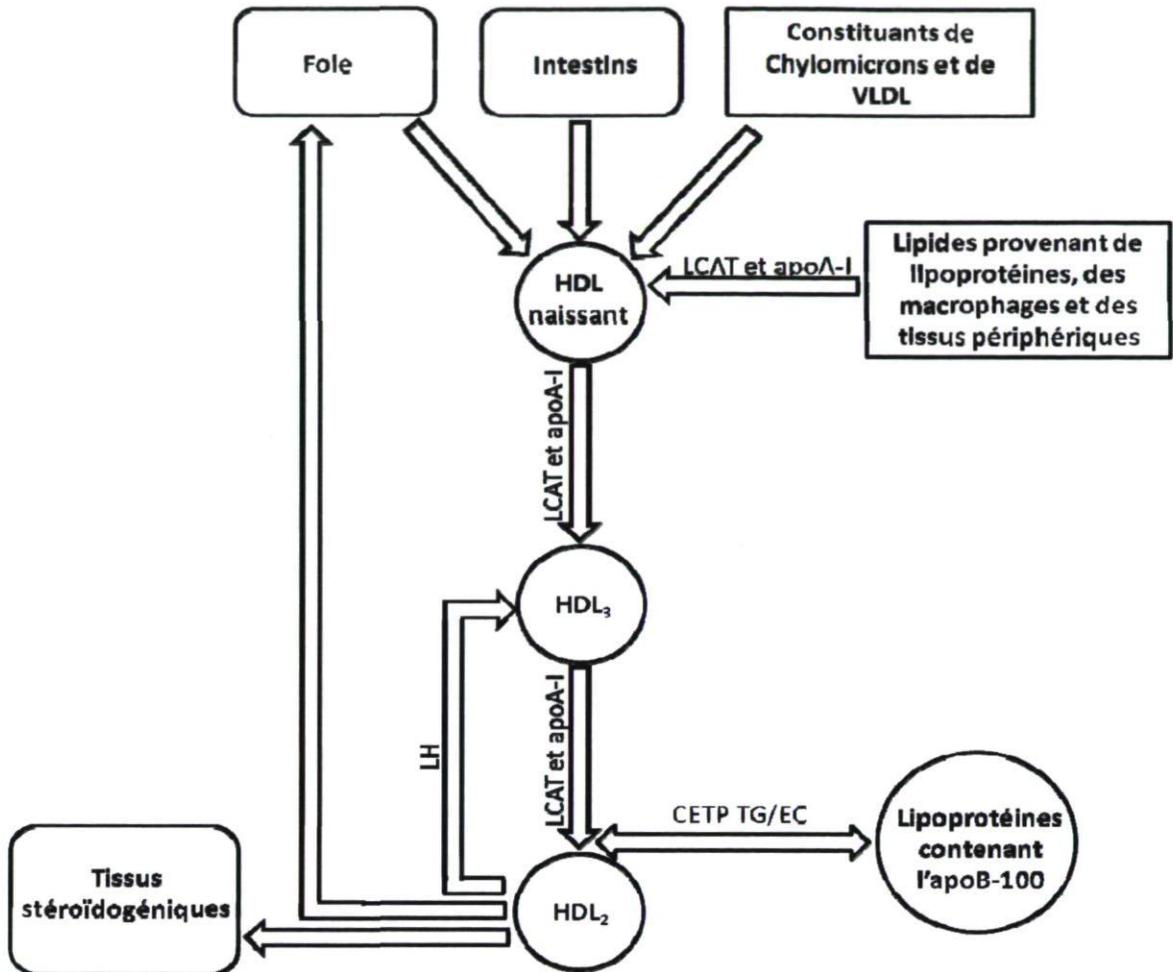


Figure 5 : Schéma représentant la voie de transport inverse du cholestérol. Adaptée de⁶⁰

5.3 Les lipides du poumon fœtal

Le développement fœtal est étroitement dépendant de la disponibilité en substrats lipidiques, tel que les acides gras, qui vont être utilisés pour la synthèse de la phosphatidylcholine disaturée (DSPC). Le principal composant lipidique du surfactant pulmonaire, la DSPC, est synthétisée principalement par les cellules PTII. Afin d'augmenter la production de DSPC, les cellules PTII doivent être en présence d'une quantité adéquate de glucose, servant de source pour le glycérol, la structure de base de la phosphatidylcholine. De plus, de longues chaînes d'acides gras provenant d'une synthèse de novo, du complexe acide gras-albumine, ou de triglycérides transportés par les lipoprotéines, sont nécessaires pour la synthèse de DSPC⁶².

5.3.1 Apolipoprotéine A-I

L'apolipoprotéine A-I fait partie de la famille des apolipoprotéines. Les parties N-terminale et C-terminale sont hautement conservées entre les mammifères et sont reconnues comme étant impliquées dans les liaisons avec les lipides. Le domaine central est associé à l'activation de la LCAT. On observe plusieurs différences pour cette région entre les espèces. L'apolipoprotéine A-I est synthétisée principalement dans le foie et des cellules épithéliales de l'intestin. À un niveau moindre, l'expression de l'apoA-I a aussi été localisée dans les reins et le cerveau⁶³.

L'apolipoprotéine A-I est la principale protéine des HDLs. Elle permet le transport du cholestérol des tissus périphériques au foie. Cette protéine est surtout étudiée pour son rôle de protection contre les maladies cardiovasculaires. L'apoA-I agit comme cofacteur pour l'activation de la LCAT. Cette dernière va être utilisée pour la conversion du cholestérol libre en ester de cholestérol⁶⁴. De nombreuses études ont démontré que les hormones stéroïdiennes sont impliquées dans la régulation de la production de l'apolipoprotéine A-I. En effet, il a été démontré qu'au niveau du foie, l'estradiol augmentait l'expression de l'apoA-I tandis que la testostérone la diminuait. Par contre, le mécanisme de régulation n'est aucunement connu⁶⁵. De plus, une étude réalisée par notre

laboratoire a démontré une différence sexuelle dans le niveau d'expression de l'apolipoprotéine A-I dans le poumon fœtal lors de la période qui chevauche la maturation pulmonaire ($p=0,0896$)^{66,67}.

5.3.2 Apolipoprotéine A-II

L'apolipoprotéine A-II fait aussi partie des membres de la famille des apolipoprotéines et constitue l'une des protéines principales des HDLs. Elle est connue comme composante structurale de ce type de lipoprotéine. Elle est synthétisée majoritairement par le foie sous forme de précurseur de 100 acides aminés (a.a.), soit la preproapoA-II. Pendant la traduction, la preproapo A-II subit un premier clivage de 18 a.a. produisant ainsi la proapo A-II. La proapoA-II va être clivée de 5 a.a. afin de produire l'apoA-II mature. Cette dernière est celle observée dans le plasma sous forme de dimère de 77 acides aminés. Il est connu que l'expression de l'apoA-II est régulée par certains récepteurs nucléaires comme le récepteur au facteur activé de prolifération des peroxysomes (PPAR α). Une fois de plus, notre laboratoire a démontré une différence sexuelle dans l'expression de l'apoA-II dans le poumon fœtal en développement ($p=0,0896$)^{66,67}.

5.3.3 Apolipoprotéine C-II

L'apolipoprotéine C-II est un polypeptide synthétisé majoritairement par le foie et sécrété dans le plasma comme composant de surface des chylomicrons, des VLDLs et des HDLs⁶³. Elle est le coactivateur essentiel à l'activité enzymatique de la LPL. La protéine apoC-II mature est composée de 79 a.a. et a un poids moléculaire de 8,9 kDa. La région C-terminale est essentielle pour l'activation de la LPL tandis que la région N-terminale a pour rôle d'attirer les lipides. Il est à noter que l'apoC-II active aussi l'enzyme LCAT⁶⁸. On observe des différences sexuelles dans son niveau d'expression lors de la période chevauchant la maturation pulmonaire ($p=0,0195$)^{66,67}.

5.3.4 Apolipoprotéine H

L'apolipoprotéine H, aussi connu sous le nom de la beta-2-glycoprotéine, est une protéine de 50 kDa retrouvée de façon libre ou combinée à une lipoprotéine dans le plasma. Elle est composée de 5 modules répétés de 60 acides aminés. Elle possède une séquence en a.a. hautement conservée entre l'humain, le rat et le bovin. L'expression de l'apoH a été détectée dans les cholangiocytes, cellules épithéliales du conduit biliaire, et des cellules hépatocytes du foie⁶⁹. Une expression plus faible a été localisée dans les reins, les intestins et le cœur⁷⁰. Une fois de plus, une différence sexuelle pour l'expression de l'apoH a été observée dans le poumon fœtal en développement ($p=0,0607$)^{66,67}.

Plusieurs rôles biologiques de la protéine au sein du transport lipidique ont été attribués à l'apoH. L'équipe de Cai et al,⁷¹ ont identifié l'apoH comme étant un facteur de survit des cellules endothéliales dans le sérum fœtal de bovin. Des études *in vitro* ont démontré que l'apolipoprotéine H bloque l'angiogénèse en régulant de façon négative l'expression du récepteur du VEGF/KDR sur les cellules endothéliales, bloquant ainsi la phosphorylation du VEGF^{72, 73}. De plus, Nakaya et al,⁷⁴ ont démontré que le complexe apoH/apoC-II augmente l'activité de la lipoprotéine lipase. En effet, il a été démontré que la LPL a une plus forte activité lorsqu'elle est en présence de l'apoC-II et de l'apoH comparativement à la présence seule de l'apoC-II.

5.3.5 Lipoprotéine lipase

La lipoprotéine lipase est l'un des membres de la famille des lipases. Son gène est composé de dix exons séparés par neuf introns. Elle a été isolée chez plusieurs espèces incluant l'humain, la souris, le rat, le poulet, le babouin, le mouton et le cochon. Ses séquences nucléotidiques et en a.a. sont hautement conservées entre les différentes espèces de mammifères, soit de 77 à 82% et de plus de 90%, respectivement. La région C-terminale de la LPL est un domaine de liaison des triglycérides tandis que la région N-terminale est responsable de son activité catalytique. La liaison de son coactivateur, l'apolipoprotéine C-II, est essentielle à son activité enzymatique. Le site majeur d'expression de la LPL est le

tissu adipeux. Plusieurs autres tissus comme le foie, le cœur et les muscles squelettiques sont des sites de très forte expression. À un niveau moindre, on retrouve la LPL dans les macrophages, les surrénales, les ovaires, certaines cellules neuronales, l'aorte, la rate, les testicules, les poumons et les reins. Il est à noter que l'expression de la LPL peut changer dans certains tissus au cours du développement⁷⁵. De plus, certaines hormones influencent l'expression de la LPL. Par exemple, il a été démontré que les glucocorticoïdes augmentent l'expression du messager et de la protéine dans des cellules pré-adipocytes chez l'humain⁷⁵.

La fonction de la LPL est au niveau du métabolisme et du transport des lipides. Son rôle est de catalyser l'hydrolyse des triacylglycérols des chylomicrons et des VLDLs en circulation, ce qui permet la libération des acides gras. Puisque son rôle s'exerce principalement dans les capillaires, il aurait été logique de penser que le messager serait synthétisé dans les cellules endothéliales. Cependant, plusieurs études ont démontré par hybridation *in situ* que le messager de la LPL dans plusieurs tissus ne se retrouve pas dans les cellules endothéliales mais plutôt dans d'autres types cellulaires. Ces observations suggèrent que la LPL est tout d'abord synthétisée par les cellules du parenchyme et par la suite, subit une translocation dans le site d'action, soit le réseau de capillaires⁷⁶.

Comme énoncé préalablement, le composant principal du surfactant est le dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). Les acides gras sont des composants du DPPC. Plusieurs sources potentielles d'acides gras peuvent intervenir dans la synthèse du surfactant dont la synthèse de novo par le fœtus et le transport par les lipoprotéines de la circulation maternelle. Notre laboratoire a démontré l'expression de la LPL dans le poumon en développement^{66,67}.

6. Description des études antérieures de notre laboratoire ayant menées à l'étude de la localisation du messenger et de la protéine des apolipoprotéines A-I, A-II, C-II, H et de la lipoprotéine lipase.

Tel que mentionné préalablement, la synthèse de surfactant pulmonaire fœtal est étroitement dépendante de la disponibilité en substrats lipidiques. Les apolipoprotéines et la lipoprotéine lipase ont pour rôle de transporter et convertir les lipides afin de les utiliser dans la production du surfactant et dans la synthèse de stéroïdes. Dans le contexte du développement pulmonaire, de la maturation pulmonaire et du dimorphisme sexuel, notre laboratoire étudie les gènes du métabolisme des lipides plus précisément les apolipoprotéines A-I, A-II, C-II, H et la lipoprotéine lipase.

6.1 Expression de gènes présentant un dimorphisme sexuel pendant une période de développement chevauchant la maturation des PTII dans les poumons fœtaux murins (titre français de ⁶⁷).

Cette étude, publiée en 2006 par notre laboratoire, consistait à amasser des extraits d'ARN totaux de poumon fœtaux murins mâles et femelles aux jours de gestation 15.5, 16.5 et 17.5 et d'appliquer la technique de micropuce à ADN afin d'identifier les gènes présentant une différence sexuelle lors de la maturation pulmonaire. Plusieurs gènes impliqués dans la maturation pulmonaire ne présentent pas de différence sexuelle. Des 14 000 transcrits représentés sur la micropuce, seulement 83 présentaient une différence sexuelle à un ou plusieurs temps de gestation. Parmi eux, on y retrouve certains gènes impliqués dans le métabolisme et la régulation des hormones stéroïdiennes, de l'apoptose, de la régulation de la transcription et du métabolisme des lipides incluant les apolipoprotéines A-I, A-II, C-II et H. Certains gènes présentant un dimorphisme sexuel auraient potentiellement un rôle dans la maturation pulmonaire. De plus, les différences sexuelles observées pour les lipides du surfactant au jour de gestation 17.5 corrèlent avec les différences sexuelles observées dans l'expression des apolipoprotéines qui sont impliquées dans le transport des lipides. Ce résultat suggère un rôle pour ces gènes dans la synthèse de surfactant. Les différences sexuelles pour les différentes apolipoprotéines ont

été étudiées plus en détail dans le manuscrit scientifique présenté au prochain chapitre. De plus, l'étude a permis d'identifier de nouveaux gènes candidats pouvant être impliqués dans la physiopathologie de la détresse respiratoire du nouveau-né.

6.2 Expression des apolipoprotéines A-I, A-II, C-II et H dans les poumons en développement et la différence sexuelle pour les lipides du surfactant (titre français de l'article⁶⁶).

L'expression des apolipoprotéines A-I, A-II, C-II, E, H et de la lipoprotéine lipase a été étudiée par PCR quantitatif en temps réel chez des regroupements de poumons fœtaux mâles et femelles murins aux jours de gestation 15.5 à 18.5. Une co-expression en fonction du temps de gestation a été observée pour les apolipoprotéines A-I, A-II, C-II et H. De plus, les apolipoprotéines présentent toutes une différence sexuelle ($p= 0,0896, 0,0896, 0,0195$ et $0,0607$ respectivement) avec une tendance à une expression plus forte chez la femelle. L'apoE et la LPL présentent une augmentation significative de l'expression de JG 17.5 à 18.5. Une augmentation de l'expression du jour 16.5 à 17.5 de gestation pour les apolipoprotéines A-I, A-II, C-II et H a été démontrée et corrèle avec l'émergence des pneumocytes de type II matures. De plus, ces quatre apolipoprotéines sont coréglées avec les 17beta-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (17 β HSD2) et de type 5 (17 β HSD5) qui sont connues respectivement pour avoir un rôle dans l'inactivation et la synthèse des androgènes. Finalement, l'apoC-II a été localisée par immunohistochimie dans des structures qui seraient des granules sécrétoires et ce, dans les cellules épithéliales des conduits respiratoires distaux. Les résultats obtenus sont compatibles avec le rôle des apolipoprotéines dans le métabolisme et le transport des lipides lors du développement pulmonaire, en association avec une différence sexuelle dans la synthèse des lipides du surfactant.

7. Mon projet de maîtrise

7.1 Hypothèse de travail

Nos résultats antérieurs ont démontré qu'il y avait une co-expression qui varie dans le temps entre l'apoA-I, l'apoA-II, l'apoC-II et l'apoH dans les poumons fœtaux murins. L'hypothèse générale de mon projet de recherche est que dans les poumons fœtaux de souris tard en gestation, l'expression des différentes apolipoprotéines (A-I, A-II, C-II et H) et de la lipoprotéine lipase se situe dans les cellules épithéliales distales pour la synthèse et la sécrétion du surfactant et dans certaines cellules du mésenchyme pouvant correspondre aux lipofibroblastes, cellules de stockage des lipides pour les PTII. Un changement de localisation de l'expression de ces gènes pourrait être causé par le début de la synthèse du surfactant. Par contre, une co-localisation entre les messagers et les protéines n'est pas nécessairement attendue puisque plusieurs de ces protéines sont sécrétés et que différentes études ont démontré pour certains des gènes étudiés que leurs sites d'expressions n'est pas le même que leurs sites d'action⁷⁶.

7.2 Objectifs

L'objectif général de mon projet est la recherche d'un rôle potentiel pour les apolipoprotéines dans le métabolisme des lipides du poumon en développement. Plus précisément, le but de cette étude est d'identifier dans des poumons murins en développement (JG 15.5 à PN 10) le phénotype des cellules exprimant des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des lipides. Les différents gènes à l'étude sont l'apoA-I, l'apoA-II, l'apoC-II, l'apoH et la lipoprotéine lipase. La localisation sera étudiée en fonction du sexe et des différents temps de gestation. Des expériences d'hybridation *in situ* permettront de localiser les ARN messagers des gènes à l'étude, tandis que des expériences d'immunohistochimie permettront de localiser leurs protéines respectives dans des poumons de fœtus mâles et femelles aux jours de gestation 15.5 jusqu'au jour 10 de la période post-natale. Un minimum de trois femelles gestantes comprenant au moins un fœtus mâle et un fœtus femelle sera étudié pour chaque jour à l'étude.

7.3 Description de mon projet

Les études antérieures réalisées au sein de notre laboratoire ont permis de montrer dans le poumon foetal murin, l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des lipides. Les apolipoprotéines A-I, A-II, C-II et H sont exprimées en présentant des différences sexuelles lors du développement pulmonaire et montrent une augmentation de leur expression du JG 17.5 au JG 18.5 en corrélation avec la maturation des PTII. Puisque les différences sexuelles observées pour les lipides du surfactant sont associées à une incidence plus élevée de détresse respiratoire chez les mâles, nous avons décidé de localiser les messagers et les protéines de ces quatre apolipoprotéines et de la lipoprotéine lipase dans le poumon murin en développement dans le but de mieux comprendre leur implication dans la production du surfactant.

7.4 Justification de l'utilisation du modèle murin

Pour le présent projet, la souris est le modèle expérimental de choix. Tout d'abord, son génome est connu et bien caractérisé ce qui rend disponible les outils pour l'analyse du profil d'expression transcriptionnelle régulant les processus entourant le développement pulmonaire foetal. La souche de souris utilisée pour cette étude est la Balb/c. Cette dernière est consanguine sur plus de 150 générations et présente une homogénéité génétique de plus de 99% permettant ainsi de diminuer les variations intra et inter-portées. De plus, ce modèle est très avantageux et pratique en termes de disponibilité des échantillons biologiques, de la durée de la fenêtre gestationnelle (19 jours) et du nombre de fœtus par portée. Les coûts engendrés par l'achat des souris, l'hébergement et les manipulations sont beaucoup moindre comparativement à d'autres modèles animaux tels que le lapin, le mouton et le singe.

Chapitre II
Articles

1. Clarification des rôles respectifs des co-auteurs

Le présent chapitre est composé d'un article intitulé: «Apolipoprotein C-II and lipoprotein lipase show a temporal and geographic correlation with surfactant lipid synthesis in preparation for birth». Ce dernier a été soumis dans «BMC Developmental Biology». Il s'avère donc nécessaire d'y inclure quelques précisions introductives concernant la participation des co-auteurs. Enfin, un bref résumé en français précède l'article, lui-même rédigé en anglais.

1.1. Avant-propos

Voici la liste des co-auteurs ainsi qu'une brève description de leur participation respective à la rédaction de cet article :

Yves Tremblay Ph.D : le Dr Yves Tremblay est professeur titulaire et chercheur au Centre de Recherche du CHUL et il est aussi mon directeur de recherche. Avec le Dr Provost, il est à la source de l'élaboration de mon projet de recherche et il a supervisé mes travaux et les textes s'y rattachant.

Pierre R Provost Ph.D : Le Dr Pierre R Provost est professeur associé dans l'équipe du Dr Tremblay. Sa participation fut très importante à tous les niveaux du projet de la conception à l'écriture des articles, incluant une participation très active dans l'interprétation des résultats.

Pour ma part, j'ai participé à la mise au point des techniques présentées dans cet article, j'ai également effectué toutes les expériences qui sont présentées dans l'article. J'ai rédigé cet article en collaboration avec le Dr Pierre Provost et le Dr Yves Tremblay.

2. Résumé

Les acides gras sont les précurseurs dans la synthèse des phospholipides du surfactant pulmonaire. Tout récemment, notre laboratoire a démontré l'expression de l'apolipoprotéine C-II, cofacteur essentiel au fonctionnement de la lipoprotéine lipase (LPL), dans le poumon fœtal murin et a observé la protéine dans des granules sécrétoires dans les épithéliums distaux au jour où il y a augmentation de la synthèse du surfactant (JG 17.5). L'étude présentée ci-dessous permet la localisation du messager et de la protéine de l'apoC-II et de la LPL dans le poumon murin entre le jour de gestation (JG) 15.5 et le jour en période postnatale (PN) 10. Le site majeur d'expression de l'apoC-II et de la LPL varie selon le temps mais se retrouve dans les épithéliums distaux à la fin de la période de gestation. L'accumulation de l'apoC-II dans les granules sécrétoires est observée dans les épithéliums distaux avec peu ou pas de lumière à partir du JG 16.5 jusqu'après la naissance. La LPL est observée dans les capillaires à tout les temps de l'étude. Cette étude a démontrée que les messagers de l'apoC-II et de la LPL corrèlent temporellement et géographiquement avec les structures impliquées dans la synthèse de surfactant et suggère que le recrutement des acides gras de la circulation par la LPL activée est modulé régionalement par la sécrétion d'apoC-II.

3. Abstract

Fatty acids are precursors in the synthesis of surfactant phospholipids. Recently, we showed expression of apolipoprotein C-II (apoC-II), the essential cofactor of lipoprotein lipase (LPL), in the fetal mouse lung and found the protein on the day of the surge of surfactant synthesis (gestation day 17.5) in secretory granule-like structures in the distal epithelium. The present study investigated whether the sites of apoC-II and LPL mRNA and protein accumulation are regulated in the mouse lung between gestation day 15 and postnatal day 10. The major sites of apoC-II and LPL gene expression changed over time and were found mainly in the distal epithelium at the end of gestation but not after birth. Accumulation of apoC-II in secretory granule-like structures was not systematically observed, but was found in the distal epithelium only at the end of gestation and soon after birth, mainly in epithelia with no or small lumina. LPL was detected in capillaries at all the developmental times studied. This study demonstrates that apoC-II and LPL mRNAs correlate temporally and geographically with surfactant lipid synthesis in preparation for birth and suggests that fatty acid recruitment from the circulation by apoC-II-activated LPL is regionally modulated by apoC-II secretion.

4. Introduction

The preparation of the lung for an aerobic environment includes the surge of surfactant synthesis, which occurs late in pregnancy in Type II pneumocytes (PTII) in the distal epithelium (1-6). Pulmonary surfactant is a combination of lipids and proteins (7, 8) enabling normal respiration by preventing alveolar collapse. Surfactant deficiency is the major cause of respiratory distress syndrome of the neonate (or hyaline membrane disease) (9, 10), a pathology occurring when birth arises before adequate PTII cell maturation.

Fatty acids are precursor molecules in the synthesis of surfactant phospholipids. They can be synthesized in the lung or originate from circulating triglycerides. In the plasma, triglycerides are mainly found in the core of VLDL and chylomicrons, the latter carrying alimentary lipids after secretion by the small intestine. In many tissues including adipose tissue and skeletal muscle, delivery of fatty acids from triglyceride-rich lipoproteins occurs by hydrolysis on the luminal surface of the capillary endothelium. This reaction is catalyzed by lipoprotein lipase (LPL) (11, 12) and requires apolipoprotein C-II (apoC-II) as essential and specific cofactor (13, 14).

LPL expression was studied in the mature lung. In the guinea pig, LPL mRNA was mainly found in alveolar macrophages, while the protein was mainly localized in capillaries (15). This is compatible with a previous observation in the adult rat where LPL activity was found in lung macrophages (16). In the human, fetal lung explants from the second trimester of gestation were studied (17). LPL protein was found at the surface of epithelial cells after stimulation of the tissue with dexamethasone/8-Br-cAMP/isobutylmethylxanthine.

Recently, we reported expression of LPL and apoC-II in the fetal mouse lung between gestation days (GD) 15.5 to 18.5 (18). A sex difference in the level of apoC-II mRNA was observed ($P=0.0195$), while a significant increase in LPL mRNA was found from GD 17.5 to 18.5 ($P=0.0003$). Immunohistochemistry (IHC) revealed the presence of apoC-II in secretory granule-like structures in the distal epithelium, mainly near the basal membrane, close to the mesenchyme, a structure that is distinct from lamellar bodies (18). The fact that the apoC-II protein is found at this site on the day when the surge of surfactant

synthesis occurs suggests the participation of apoC-II in this process. Many questions arise from this work for which an answer will clarify the role of apoC-II and LPL in surfactant synthesis. Does apoC-II protein localization change according to the stage of lung development, thus according to the need in surfactant? Are LPL molecules translocated to the luminal surface of capillaries? Do the sites of apoC-II and LPL gene expression change according to the stage of lung development and to protein localization? To answer these questions, we have performed in situ hybridization (ISH) and IHC of LPL and apoC-II from GD 15.5 to the first days of alveolarization. QPCR analysis of apoC-II and LPL mRNAs was also performed with samples from GD 19.5 to postnatal day 10 (PN 10).

5. Materials and methods

5.1 Mouse tissue preparation

Protocols were approved by the Animal Care and Use Committee and the Institutional Review Board of the Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec (protocols no. 2005–091 and 2008-071-2). Female and male Balb/c mice (Charles River Laboratories St-Constant S.A., St-Constant, Qc, Canada) were mated during the night (mating window ± 8 h). The day of copulatory plug was considered as GD 0.5 (term GD 19.5) while the beginning of post-natal day 0 (PN 0) corresponded to delivery. Pregnant females were killed by exposure to a CO₂ atmosphere. The fetal sex was identified by examination of the genital tract. Confirmation of individual sex was done by PCR amplification of the *Sry* gene. Fetal lungs were collected and either kept frozen until RNA extraction or fixed in 4% buffered paraformaldehyde for 48 h at 4°C. Tissues were paraffin-embedded and cut in 5 μ m slices. ISH and IHC were performed on samples from one female and one male of three or four litters for each gestation or postnatal day studied.

5.2 RNA probes and in situ hybridization

Specific amplicons were synthesized from fetal lung cDNA using oligonucleotides designed to span at least one intron. Amplified gene/ GenBank accession

number/ position of the amplified sequence/ 5' oligonucleotide/ 3' oligonucleotide (sequences include one restriction site for sub-cloning): *Lpl*/ NM_008509/ 750-955/ GGGGAATTC-CAGCTGGGCCTAACTTTGAG/ GGGAAGCTT-AATCACACGGATGGCTTCTC; *ApoC-III*/ NM_009695/ 269-508/ GGGGAATTC-CCTGGCTCTATTCTGGTCA/ GGGAAGCTT-AAAATGCCTGCGTAAGTGCT. These amplicons were cloned into pGEM-4Z (Promega Corp., WI, USA). DNA matrix for SP6 and T7 polymerases were prepared by PCR amplification of each of the subcloned amplicon with the oligonucleotides GGATTTAGGTGACACTATAGAATA and TAATACGACTCACTATAGGGAGAC, which overlap the 5' end of the SP6 and the T7 promoters, respectively. Then, RNA probes were prepared using digoxigenin (DIG)-UTP substrate (Roche Diagnostics, Qc, Canada) and SP6 (sense) or T7 (antisense) RNA polymerases (Roche Diagnostics), as previously described (19). ISH was performed as reported (19) except that denatured DIG-cRNA probes were used at 5 ng/ μ l. Slides were counterstained with 0.25% neutral red.

5.3 Immunohistochemistry

Tissues were deparaffinized and subjected to IHC as reported (19). The anti-apoC-II (T-12) (1:100) and the anti-LPL (C-20) (1:20) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, USA). A mouse anti-cytokeratin 18 monoclonal antibody (Abcam Inc., MA, USA) (1:200) was also used. A goat IgG preparation (Vector Laboratories Inc, ON, Canada) was used instead of primary antibody as negative control. A mouse anti- α -smooth muscle actin (α -sma) (VWR International CO., QC, Canada) (1:200) was also used. A biotinylated donkey anti-goat IgG (Millipore Canada Ltd, ON, Canada) and a biotinylated goat anti-mouse IgG (Cedarlane, ON, Canada) were used as secondary antibodies. The signals were revealed with the streptavidin-biotin peroxidase reaction method using an ABC Vectastain elite kit (Vector Laboratories Inc) and 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, Sigma-Aldrich) as chromagen. Slides were counterstained with Mayer's hematoxylin.

Slightly different conditions were used for the rabbit anti-PECAM antibody (Wako Chemicals USA, Inc.). After deparaffinization, the antigen retrieval step consisted in a treatment with proteinase K (10 mg/ml in PBS) for 20 min. Incubation with the primary (anti-PECAM antibody (1:10)) and the secondary antibodies and all washing steps were performed in 0.1% Tween 20 in PBS.

5.4 Quantitative Real-Time PCR and Statistical Analysis

RNA extraction, cDNA synthesis, and QPCR were performed as described (18). QPCR values were normalized for the amount of RNA input for each sample using a set of normalization factors obtained as described (18, 20) from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) and hydroxymethylbilane synthase (Hmbs) housekeeping genes.

Statistical analysis was performed using all data, including the outlier values. To ensure normality and homogeneous variances of the data set, the natural logarithm and the reciprocal of the dependent variable (expression) were used for apoC-II and LPL, respectively. To study the effects of the day of gestation and sex parameters on the expression of each gene, two-way ANOVA with repeated measures analyses were conducted using GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc., CA, USA). The day of gestation was considered as a fixed factor. To account for possible correlations between observations made from the same litter, male and female values were considered as repeated measures.

6. Results

6.1 mRNA and protein localization of LPL and apoC-II during the pseudoglandular and the canalicular stages

The surge of surfactant synthesis occurs on gestation day (GD) 17.5 in the mouse as indicated by the appearance of lamellar bodies (21), an increase in surface activity in the mouse lung homogenate (21), and by increases in the activity of some enzymes involved in pulmonary lipid metabolism (22, 23). Therefore, we have first studied samples from

pseudoglandular (GD 15.5) to late canalicular (GD 17.5) stages of lung development in order to determine whether mRNA and/or protein localization of LPL and apoC-II change in preparation to the surge of surfactant synthesis.

On GD 15.5, apoC-II mRNA was found mainly in the mesenchyme (Fig. 1, A, B). Positive signals were also found in cells of some epithelia (Fig. 1, A and B), while the most proximal epithelium was negative (Fig. 1, A). In contrast, the apoC-II protein did not accumulate in all the sites of apoC-II gene expression on GD 15.5 but only in the epithelium where a diffuse signal was observed in the cytoplasm (Fig. 1, H). On GD 17.5, the apoC-II mRNA and protein co-localized. They were found only in the distal epithelium with lumina (Fig. 1, D and L) and the most distal epithelium before apparition of the lumina (Fig. 1, E and K). It should be noted that structures corresponding to the most distal epithelium differ between GD 15.5 and 17.5. The most distal epithelium observed on GD 15.5 is no longer the most distal epithelium on GD 17.5 where a more differentiated epithelium is observed. The identity of cells composing the most distal epithelium with no lumina on GD 17.5 was confirmed by IHC using an anti-cytokeratin 18 antibody (Fig. 1, N), which is a marker of epithelial cells (24).

Recently we reported that the apoC-II protein accumulated on GD 17.5 in the distal epithelium, more precisely in structures looking like secretory granules, mainly localized near the basal membrane, close to the mesenchyme (18). Similar results were obtained here (Fig. 1, K). Interestingly, we show here that localization of the positive signal in the cells is different on GD 15.5 compared to GD 17.5. No positive secretory granules were observed on GD 15.5. Accordingly, data obtained on GD 16.5 show a transition state between results at GD 15.5 and those at GD 17.5. As shown in panel I of Fig. 1, both a diffuse positive signal in the cytoplasm of epithelial cells and a few dots looking like secretory granules were observed in the same tissue. Panel J of Fig. 1 is from another GD 16.5 litter and shows small positive dots, but no diffuse signal in the epithelium, which could represent a later developmental event. No positive signal was observed by ISH using lung materials of 6 fetuses from 3 litters sacrificed on GD 16.5 (data not shown), which is also compatible with a transition state.

LPL protein was found in capillary-like structures on GD 15.5, GD 16.5, and GD 17.5 (Fig. 2, G to L, and data not shown). LPL mRNA was mainly found in epithelial cells of the distal epithelium on GD 17.5 (Fig. 2, C, D). This mRNA was absent of the proximal epithelium on GD 17.5 except for a few cells that may present barely detectable signals (Fig. 2, C). On GD 15.5, LPL mRNA was mainly found in the mesenchyme and the distal epithelium (Fig. 2, A) as for apoC-II mRNA. On GD 16.5, no signal was obtained by ISH for LPL using lung tissues of 7 fetuses from 4 litters. (data not shown).

An anti-PECAM antibody was used on GD 17.5-lung tissue sections to stain capillaries. Results show that staining of capillary network (Fig. 3, A and B) is very similar to the positive signals identified as capillary-like structures using an anti-LPL antibody. In contrast, the use of an anti- α -sma antibody leads to a different staining profile (Fig. 3, C and D).

ApoC-II (Fig. 1, F) and LPL (Fig. 2, E) mRNAs were observed in smooth muscles surrounding large arteries. LPL protein was found in smooth muscles of arteries (Fig. 2, K), but signal intensities were lower than those found in adjacent capillaries. No IHC signal was found in smooth muscles for apoC-II (data not shown). In most cases, it was difficult to determine whether endothelial cells of large vessels were stained because of the proximity to positive structures. Nevertheless, endothelial cells positive for LPL by IHC (Fig. 2, I) and others negative for apoC-II by ISH and IHC (data not shown) were also found on GD 17.5.

6.2 ApoC-II and LPL mRNA levels during the saccular stage and the first segment of the alveolar stage

ApoC-II and LPL QPCR data were recently published for samples from GD 15.5 to GD 18.5 (18), but not for further developmental times. Here, QPCR analysis of these two genes is presented between GD 19.5 and PN 10 using male and female pools of various litters (Fig. 4). Levels of apoC-II mRNA showed more variations from sample to sample than those of LPL mRNA. There was no statistically significant sex difference for the two genes, even though higher values were observed for males for apoC-II mRNA on PN 3 in

four of the five analyzed litters (Fig. 4, A). A statistically significant difference according to developmental time was observed only for LPL mRNA ($P=0.0005$) (Fig. 4, C).

6.3 mRNA and protein localization of LPL and apoC-II during the saccular and the beginning of the alveolar stages of lung development

Similarities were found between apoC-II and LPL expression patterns during the perinatal period. Both genes were expressed in the distal epithelium short time before birth (Fig. 5, A; Fig. 6, A), but not after birth (Fig. 5, C; Fig. 6, C) (delivery occurred during GD 19). In contrast, the proximal epithelium was negative on GD 17.5, showed a weak positive signal on GD 18.5 and 19.5 (data not shown), presented a marked increase in intensity soon after birth (Fig. 5, C; Fig. 6, C), and was negative on PN 5 for both genes. Using 6 fetuses on GD 19.5 (3 males and 3 females) and 6 neonates on PN 0, we confirmed that the switch from the distal to the proximal epithelium correlated with birth, not with sex (data not shown). ApoC-II and LPL mRNAs were also found in a few scattered distal epithelial cells after birth. In addition, positive signals by ISH were observed in association with blood vessels before birth (Fig. 5, A; Fig. 6, A) but not after birth (data not shown) for both genes. On PN 5, thus at junction between saccularization and alveolarization, apoC-II and LPL mRNA were found in alveolar walls (Fig. 5, D and E; Fig. 6, E and F), including newly-formed septa (Fig. 5, E and data not shown).

Albeit similarities were observed in the expression profiles of their encoding genes, apoC-II and LPL proteins did not accumulate in the same structures. Interestingly, apoC-II was observed in secretory granule-like structures until soon after birth (Fig. 5, G and data not shown), but positive signal had disappeared one day later (Fig. 5, I). In fact, between GD 18.5 and PN 0, apoC-II-positive secretory granules were mainly observed in distal epithelia with no or small lumina, but not with large lumina (Fig. 5, G, H and data not shown). Such a discrepancy was less evident for apoC-II mRNA for which some distal epithelia with large lumina were also positive (Fig. 5, A). This strongly suggests that apoC-II protein is synthesized and retained within the epithelium in secretory granules until the lumina reaches a certain diameter, and that it is then secreted (Fig. 7). We did not observe any sex difference or developmental delay in our experiment in that the three males and the

three females analyzed on PN 0 presented secretory granules, while the six other animals studied on PN 1 did not show any secretory granule (data not shown). In all of the experiments, neonates sacrificed on PN 0 were killed between a few minutes and four hours after the birth of the first neonate. The apoC-II protein was still undetectable on PN 2 (Fig. 5, K), while secretory granules were found in the epithelial cells of the respiratory bronchioles on PN 3, near the basal membrane, close to the mesenchyme (Fig. 5, L). Only a few secretory granules were still positive on PN 5. ApoC-II-positive capillaries, as those shown on panel O of Figure 5, were only observed in one third of the subjects analyzed on PN 10. In fact, after its secretion, apoC-II protein may be difficult to detect depending of the nature of its association with the tissue.

The situation was clearly different for LPL. The protein was found in capillaries from PN 0 to PN 10 for all the analyzed neonates (Fig. 6, H to K, M, and data not shown) as well as before birth. LPL positive signals were also found in cells of the respiratory bronchiole from GD 19.5 to PN 3 (Fig. 6, G, J, and data not shown), but not on GD 18.5 and PN 5. In this epithelium, signal intensity showed variation from cell to cell. In contrast, no protein was detected in most proximal epithelium (Fig. 6, I).

Cells localized in the alveolar space on PN 5 were positive for apoC-II and LPL by both ISH (Fig. 5, E and Fig. 6, E) and IHC (data not shown) with no sex difference. Based on their localization and morphology, these cells were most probably macrophages. ApoC-II and LPL proteins were also found in macrophages on PN 10 (Fig. 5, O and Fig. 6, M).

7. Discussion

Surfactant is of the first importance in the distal epithelium to prevent alveolar collapse. Our results show that the LPL-related molecular machinery is regulated temporally and geographically in the developing lung in correlation with the need in surfactant lipid synthesis. Major changes in sites of apoC-II and LPL mRNA are summarized in Table 1. Changes in protein localization were mainly observed for apoC-II and are summarized in Table 2. Our results show that the tissue needing surfactant governs itself LPL and apoC-II gene expression and apoC-II secretion during the critical period.

Thus, the LPL machinery is subjected to a complex regulation during the canalicular and the saccular stages of lung development.

One major observation about apoC-II protein is that it accumulated in secretory granules within several distal epithelia from GD 17.5 to a developmental time point soon after birth. Thus, temporal and geographic correlations exist between the appearance of lamellar bodies as reported in the literature (21) and apoC-II accumulation in secretory granules presented in Figure 1. In contrast to apoC-II, LPL protein was obviously secreted out of the producing cells and accumulated in capillaries. Accordingly, a rapid release of 10-15% of total tissue LPL was observed following infusion of heparin into isolated perfused adult rat lungs ((25) and references therein). The presence of LPL in capillaries in the fetal lung is compatible with its recognized function in recruitment of fatty acids from lipoprotein-associated triglycerides (26, 27). In contrast to LPL, apoC-II was observed in its producing cells within secretory granules. This suggests that apoC-II secretion is controlled. From GD 18.5 to PN0, distal epithelia with no or small lumina containing apoC-II-positive secretory granules as well as distal epithelia with large lumina negative for apoC-II were observed. As explained in Fig. 7, these observations suggest that apoC-II is secreted by distal epithelia reaching a specific level of development, which stimulates local LPL activity for fatty acid recruitment for surfactant synthesis. In contrast to LPL, apoC-II was not reported to bind to the endothelium and consequently, most of the apoC-II molecules secreted by the epithelia would be washed off of the slide during the IHC procedure so that the presence of apoC-II in capillaries could be difficult to demonstrate.

In 1998, LPL expression was found in lipofibroblasts isolated from rat developing lungs (28). More specifically, 20 fold and 3 fold increases in LPL mRNA levels were observed by Northern blot analysis in isolated lipofibroblasts and whole lungs, respectively, between postnatal days -3 and +2. In our experiments, not only did we fail to reproduce this rise at birth in whole mouse lungs by quantitative real time PCR, but LPL mRNA accumulation sites changed from distal to proximal epithelium at birth with no or only a few positive signal in the mesenchyme after birth. Furthermore, the IHC signal we obtained for LPL was close to the background in the mesenchyme during the perinatal period. Of course, it is not excluded that LPL expression in lipofibroblasts be very low and under the

limit of detection in our assays, but obviously, our data indicate that this cell population is not a major site of LPL mRNA and protein accumulation. The results of Chen et al are also incompatible with other studies reporting many years ago that pulmonary LPL activity in growing rats peaks one day before birth and decreases at birth (29, 30). The decrease at birth may correspond to the switch we observed in the site of LPL gene expression in the mouse. In fact, the timing of LPL activity in the rats, the temporal and cell specific regulations of LPL gene expression we observed in the mouse and the presence of LPL in capillaries underscore a role in recruitment of lipids for the surge of surfactant synthesis. Such a role has been already proposed based on the presence of VLDL in the fetal circulation at 21 days' gestation in the rat when the peak in LPL activity occurs ((25) and references therein).

LPL proteins were also found in other sites in the developing lung as in respiratory bronchioles during sacularization and in macrophages from the beginning of alveolarization. As reported for rats, an increase in LPL activity was observed after the first week of life following the decrease at birth (29). This observation is compatible with the increase we observed in LPL mRNA from PN 5 to 10 (Fig 4) and may be explained by apparition of intra-alveolar macrophages, which express LPL as reported here (Fig. 6) and in the literature (16). Our data cannot support or exclude LPL expression by lipofibroblasts at this developmental time.

No sex difference was observed in sites of apoC-II and LPL gene expression and protein accumulation for any of the analyzed time point. No sex difference in signal intensity was observed, although ISH and IHC are not reliable quantitative tools. QPCR analysis (Fig. 4) did not reveal any significant sex difference when all the population was considered, but some differences from sample to sample prevented us to conclude at the absence of any sex difference at specific time points, as at PN 3 when higher levels of apoC-II mRNA were observed more frequently in males. The sex difference reported recently (18) in apoC-II mRNA levels in favor of females in developmental times preceding GD 19.5 is not ruled out by the present work. This statistically significant sex difference in apoC-II mRNA suggests that a significant proportion of females would start accumulating apoC-II earlier than males.

In conclusion, we have shown that sites of apoC-II as well as LPL mRNA and protein accumulation are regulated during the canalicular and the saccular stages of lung development. These changes show a complex regulation of the LPL molecular machinery during an important period for the adaptation of the lung to gas exchange. From this work, apoC-II appears to be an interesting potential pharmaceutical target for treatment and/or prevention of respiratory distress syndrome of the neonate.

8. Acknowledgements

We thank Dr. Manon Richard for critical reading of the manuscript.

Grants

This work was supported by grant MOP84221 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to YT.

9. References

1. Chevalier, G., and A. J. Collet. 1972. *In vivo* incorporation of choline-³H, leucine-³H, and galactose-³H in alveolar type II pneumocytes in relation to surfactant synthesis. A quantitative radioautographic study in mouse by electron microscopy. *Anat. Rec.* **174**: 289-310.
2. Kikkawa, Y., K. Yoneda, F. Smith, B. Pacard, and K. Suzuki. 1975. The type II epithelial cells of the lung. II. Chemical composition and phospholipid synthesis. *Lab. Invest.* **32**: 295-302.
3. Williams, M. C. 1977. Conversion of lamellar body membranes into tubular myelin in alveoli of fetal rat lungs. *J. Cell Biol.* **72**: 260-277.
4. Askin, F. B., and C. Kuhn III. 1971. The cellular origin of pulmonary surfactant. *Lab. Invest.* **25**: 260-268.
5. Bensch, K., K. Schaefer, and M. E. Avery. 1964. Granular pneumocytes: electron microscopic evidence of their exocrine function. *Science (New York, N.Y)* **145**: 1318-1319.
6. Dermer, G. B. 1970. The pulmonary surfactant content of the inclusion bodies found within type II alveolar cells. *J. Ultrastruct. Res.* **33**: 306-317.
7. Goerke, J. 1974. Lung surfactant. *Biochim. Biophys. Acta* **344**: 241-261.
8. Goerke, J. 1998. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim. Biophys. Acta* **1408**: 79-89.
9. Avery, M. E., and J. Mead. 1959. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am. J. Dis. Child.* **97**: 517-523.
10. Liggins, G. C., and R. Howie. 1972. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* **50**: 515-525.
11. Goldberg, I. J., and M. Merkel. 2001. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front. Biosci.* **6**: D388-405.
12. Wang, H., and R. H. Eckel. 2009. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am. J. Physiol.* **297**: E271-288.
13. Breckenridge, W. C., J. A. Little, G. Steiner, A. Chow, and M. Poapst. 1978. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II. *N. Engl. J. Med.* **298**: 1265-1273.

14. Kinnunen, P. K., R. L. Jackson, L. C. Smith, A. M. Gotto, Jr., and J. T. Sparrow. 1977. Activation of lipoprotein lipase by native and synthetic fragments of human plasma apolipoprotein C-II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 4848-4851.
15. Camps, L., M. Reina, M. Llobera, G. Bengtsson-Olivecrona, T. Olivecrona, and S. Vilaro. 1991. Lipoprotein lipase in lungs, spleen, and liver: synthesis and distribution. *J. Lipid Res.* **32**: 1877-1888.
16. Okabe, T., H. Yorifuji, T. Murase, and F. Takaku. 1984. Pulmonary macrophage: a major source of lipoprotein lipase in the lung. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **125**: 273-278.
17. Wade, K. C., S. H. Guttentag, L. W. Gonzales, K. L. Maschhoff, J. Gonzales, V. Kolla, S. Singhal, and P. L. Ballard. 2006. Gene induction during differentiation of human pulmonary type II cells in vitro. *Am. J. Respir. Cell Molec. Biol.* **34**: 727-737.
18. Provost, P. R., E. Boucher, and Y. Tremblay. 2009. Apolipoprotein A-I, A-II, C-II, and H expression in the developing lung and sex difference in surfactant lipids. *J. Endocrinol.* **200**: 321-330.
19. Plante, J., M. Simard, P. Rantakari, M. Côté, P. R. Provost, M. Poutanen, and Y. Tremblay. 2009. Epithelial cells are the major site of hydroxysteroid (17 β) dehydrogenase 2 and androgen receptor expression in the fetal mouse lungs during the period overlapping the surge of surfactant. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **117**: 139-145.
20. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**: RESEARCH0034.
21. Buckingham, S., and M. E. Avery. 1962. Time of appearance of lung surfactant in the fetal mouse. *Nature (London)* **193**: 688-689.
22. Brehier, A., and S. A. Rooney. 1981. Phosphatidylcholine synthesis and glycogen depletion in fetal mouse lung: developmental changes and the effects of dexamethasone. *Exp. Lung Res.* **2**: 273-287.
23. Oldenberg, V., and L. M. G. Van Golde. 1977. The enzymes of phosphatidylcholine biosynthesis in the fetal mouse lung. *Biochim. Biophys. Acta* **489**: 454-465.
24. Schlichenmaier, H., M. Steffl, F. Sinowatz, and W. M. Amselgruber. 2002. Expression of cytokeratin 18 during pre- and post-natal porcine lung development. *Anat. Histol. Embryol.* **31**: 273-277.
25. Hamosh, M., and P. Hamosh. 1983. Lipoprotein lipase: its physiological and clinical significance. *Molec. Aspects Med.* **6**: 199-289.

26. Goldberg, I. J. 1996. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Lipid Res.* **37**: 693-707.
27. Stins, M. F., F. R. Maxfield, and I. J. Goldberg. 1992. Polarized binding of lipoprotein lipase to endothelial cells. Implications for its physiological actions. *Arterioscler. Thromb.* **12**: 1437-1446.
28. Chen, H., S. Jackson, M. Doro, and S. McGowan. 1998. Perinatal expression of genes that may participate in lipid metabolism by lipid-laden lung fibroblasts. *J. Lipid Res.* **39**: 2483-2492.
29. Hietanen, E., and J. Hartiala. 1979. Developmental pattern of pulmonary lipoprotein lipase in growing rats. *Biol. Neonate* **36**: 85-91.
30. Mostello, D. J., M. Hamosh, and P. Hamosh. 1981. Effect of dexamethasone on lipoprotein lipase activity of fetal rat lung. *Biol. Neonate* **40**: 121-128.

10. Figure legends

Fig. 1: Distribution of apolipoprotein C-II mRNA and protein in the mouse fetal lung. Mouse tissue sections are from pseudoglandular (GD 15.5, A, B, G, H), junction between pseudoglandular and canalicular (GD 16.5, I, J), or late canalicular (GD 17.5, C to F, K to N). *In situ* hybridization (A to F) was performed with apoC-II anti-sense (A, B, D to F) and sense (C) probes. A change in sites of apoC-II mRNA synthesis (positive signal, blue) according to developmental time was observed. Immunohistochemistry was performed using an anti-apoC-II polyclonal antibody (H to L), an anti-cytokeratin 18 monoclonal antibody (N), or goat IgG as negative control (G, M). Positive signal (red) was found in the distal epithelium from GD 15.5 to GD 17.5, but it was found in secretory granule-like structures during the canalicular stage, but not the pseudoglandular stage. A transition state was observed on GD 16.5 (I, J). Scale bars, 50 μm (A, C, D, F to H, L, M) or 20 μm (B, E, I to K). *A*, artery; *D*, distal epithelium; *M*, mesenchyme; *P*, proximal epithelium; *SM*, smooth muscle; *V*, vein.

Fig. 2: Distribution of lipoprotein lipase mRNA and protein in the mouse fetal lung. Mouse tissue sections are from pseudoglandular (GD 15.5, A, B, G, H) or late canalicular (GD 17.5, C to F, I to L) stages. *In situ* hybridization (A to F) was performed with LPL anti-sense (A, C to E) and sense (B, F) probes. The site of LPL mRNA synthesis (positive signal, blue) changed according to gestation time. Immunohistochemistry was performed using an anti-LPL polyclonal antibody (G, I to K) or goat IgG as negative control (H, L). Positive signals (red) were mainly found on capillaries from GD 15.5 to 17.5. Scale bars, 50 μm (A to C, E to I, K, L), 20 μm (D, J) or 10 μm (N). *A*, artery; *C*, capillary; *D*, distal epithelium; *EC*, endothelial cell; *M*, mesenchyme; *P*, proximal epithelium; *SM*, smooth muscle.

Fig. 3: Distribution of PECAM and α -sma proteins in the mouse fetal lung. Mouse tissue sections isolated on GD 17.5 were subjected to immunohistochemistry using anti-PECAM (A, B) or anti- α -sma (C, D) as primary antibodies. Capillaries are stained by PECAM.

Specific staining is clearly different between the two antibodies. Scale bars, 80 μm (A, C), 20 μm (B) or 40 μm (D). C, capillaries.

Fig. 4: Apolipoprotein C-II and lipoprotein lipase mRNA levels in perinatal mouse lungs. Expression of apoC-II (A,) and lipoprotein lipase (B, C) genes in developing lungs of male and female mouse fetuses of several litters between GD 19.5 and PN 10. (A and B): Each bar represents the value (\pm S.D.) obtained from technical duplicate using a pool of male or female fetuses of the indicated litter. (C): Means \pm SEM of relative mRNA levels according to developmental time (day). The values were calculated from the results presented in B excluding the outlier values obtained for males of litters no. 13 and 16. The values were normalized by two housekeeping genes. For apoC-II and LPL, the mean values respectively obtained at PN 2 and PN 0 were fixed as onefold.

Fig. 5: Distribution of apolipoprotein C-II mRNA and protein in the perinatal mouse lung. Mouse tissue sections are from saccular stage (A, B, H, GD 19.5; C, G, PN 0; I, J, PN 1; K, PN 2; L, PN 3; D to F, M, N, PN 5) or alveolar stage (O, PN 10). *In situ* hybridization (A to F) was performed with apoC-II anti-sense (A, C to E) and sense (B, F) probes. The major site of apoC-II mRNA synthesis (positive signal, blue) changed after birth (compare A to C). Positive signals were found in newly-formed septa (D, E) and macrophages (E) on PN 5. Immunohistochemistry was performed using an anti-apoC-II polyclonal antibody (G to I, K to M, O) or goat IgG as negative control (J, N). Positive signals (red) were found in secretory granule-like structures in distal epithelial cells on GD 19.5 (H) and PN0 (G) but not in later timepoints. On PN 3, positive secretory granules were also found in epithelial cells of the respiratory bronchioles near the basal membrane, close to the mesenchyme (L). Macrophages were positive on PN 5 and 10 while capillaries were positive on PN 10 in one third of the analyzed subjects (O and data not shown). Scale bars, 50 μm (A to D, F, H, K, L, M, N) or 20 μm (E, G, I, J, L, O). *BV*, blood vessel; *C*, capillary; *D*, distal epithelium; *MA*, macrophage; *P*, proximal epithelium; *RB*, respiratory bronchiole; *S*, septa; *V*, vein.

Fig. 6: Distribution of lipoprotein lipase mRNA and protein in the perinatal mouse lung. Mouse tissue sections are from saccular stage (A, B, GD 19.5; C, D, G, H, PN 0; I, PN 3; E, F, J, K, PN 5) or alveolar stage (L, M, PN 10). *In situ* hybridization (A to F) was performed with LPL anti-sense (A, C, E, F) and sense (B, D) probes. The major site of LPL mRNA synthesis (positive signal, blue) changed at birth (compare A and C). Positive signals were found in the alveolar wall and possibly in macrophages on PN 5. Immunohistochemistry was performed using an anti-LPL polyclonal antibody (G to M) or goat IgG as negative control (L). Positive signals (red) were found in capillaries in all the analyzed developmental times, in respiratory bronchioles from GD 19.5 to PN 3 (J, K and data not shown), and in macrophages on PN 5 and PN 10 (M and data not shown). Scale bars, 50 μm (A to E, G, L) or 20 μm (F, H to K, M). **BV**, blood vessel; **C**, capillary; **D**, distal epithelium; **MA**, macrophage; **P**, proximal epithelium; **RB**, respiratory bronchiole; **V**, vein.

Fig. 7: Model of apoC-II secretion. ApoC-II-containing secretory granules (dots) are observed in distal epithelia with no or small lumina from GD 16.5 to PN 0, but not in the distal epithelia with a large lumina between GD 18.5 and PN 0. These observations suggest that apoC-II secretion is delayed until apparition of the lumina. After its secretion, apoC-II can reach LPL molecules localized on the luminal surface of capillaries to activate LPL activity and fatty acid recruitment. According to this hypothesis, it could be difficult to detect apoC-II after its secretion because of the nature of its association with the tissue.

11. Tables and figures

Table 1: Major sites of apoC-II and LPL mRNA accumulation

	GD 15,5	GD 17,5	GD 18,5	GD 19,5	PN 0	PN 5
Mesenchyme	CII & LPL					
Distal epithelium	CII & LPL	CII & LPL	CII & LPL	CII & LPL		
Respiratory bronchioles					CII & LPL	
Septa						CII & LPL
Macrophages						CII & LPL

Table 2: Major sites of apoC-II and LPL protein accumulation

	GD 15,5	GD 17,5	GD 18,5	GD 19,5	PN0	PN1	PN2	PN3	PN5	PN10
Epithelium	C-II									
Secretory granules-distal epithelium										
- with no or small lumina		C-II	C-II	C-II	C-II					
- with large lumina		C-II								
Secretory granules-respiratory bronchioles								C-II		
Respiratory bronchioles					LPL	LPL	LPL	LPL	LPL	
Capillaries		LPL	LPL	LPL	LPL	LPL	LPL	LPL	LPL	LPL (CII)*
Macrophages									CII & LPL	CII & LPL
Not observed						C-II	C-II			

Figure 1

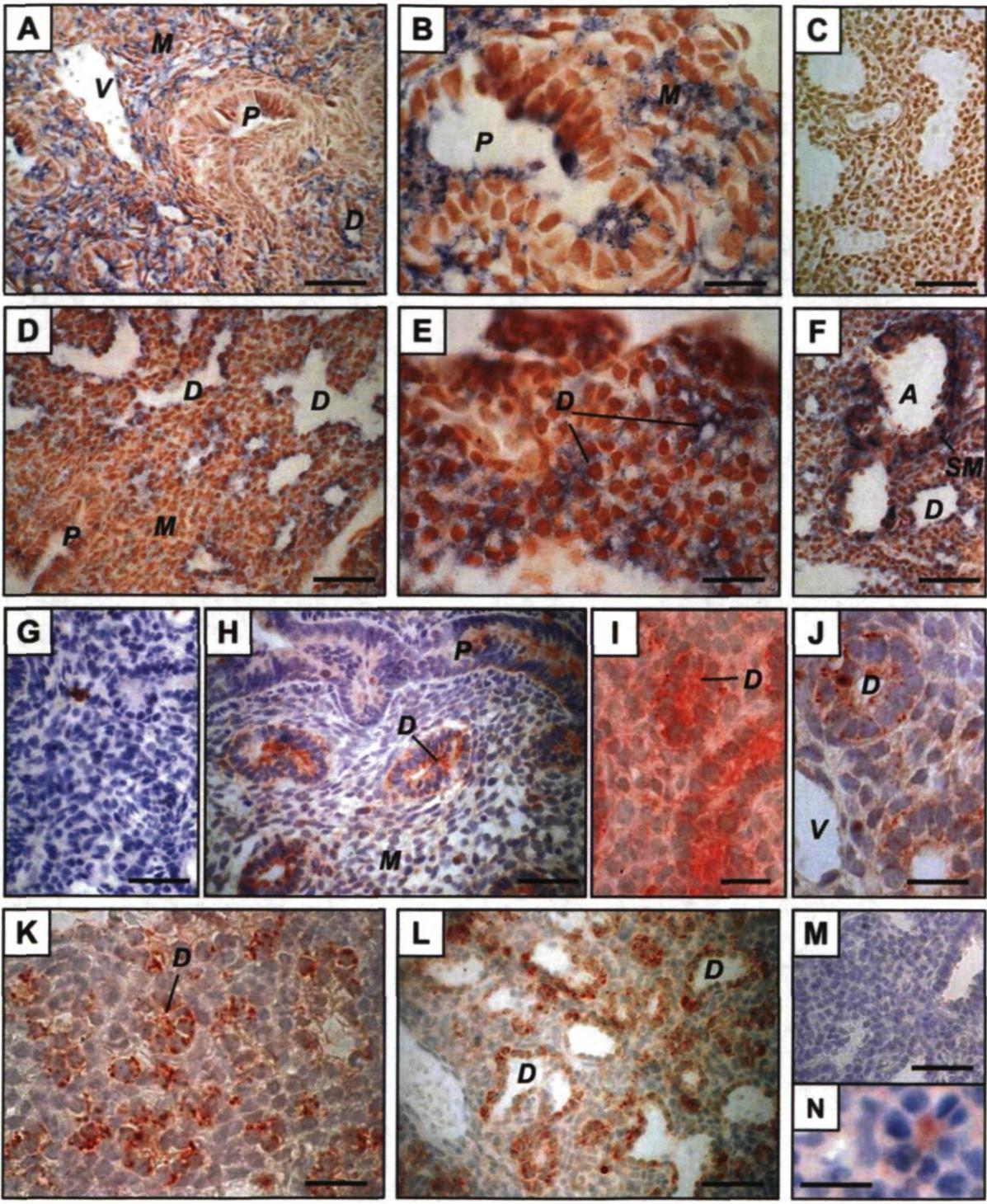


Figure 2

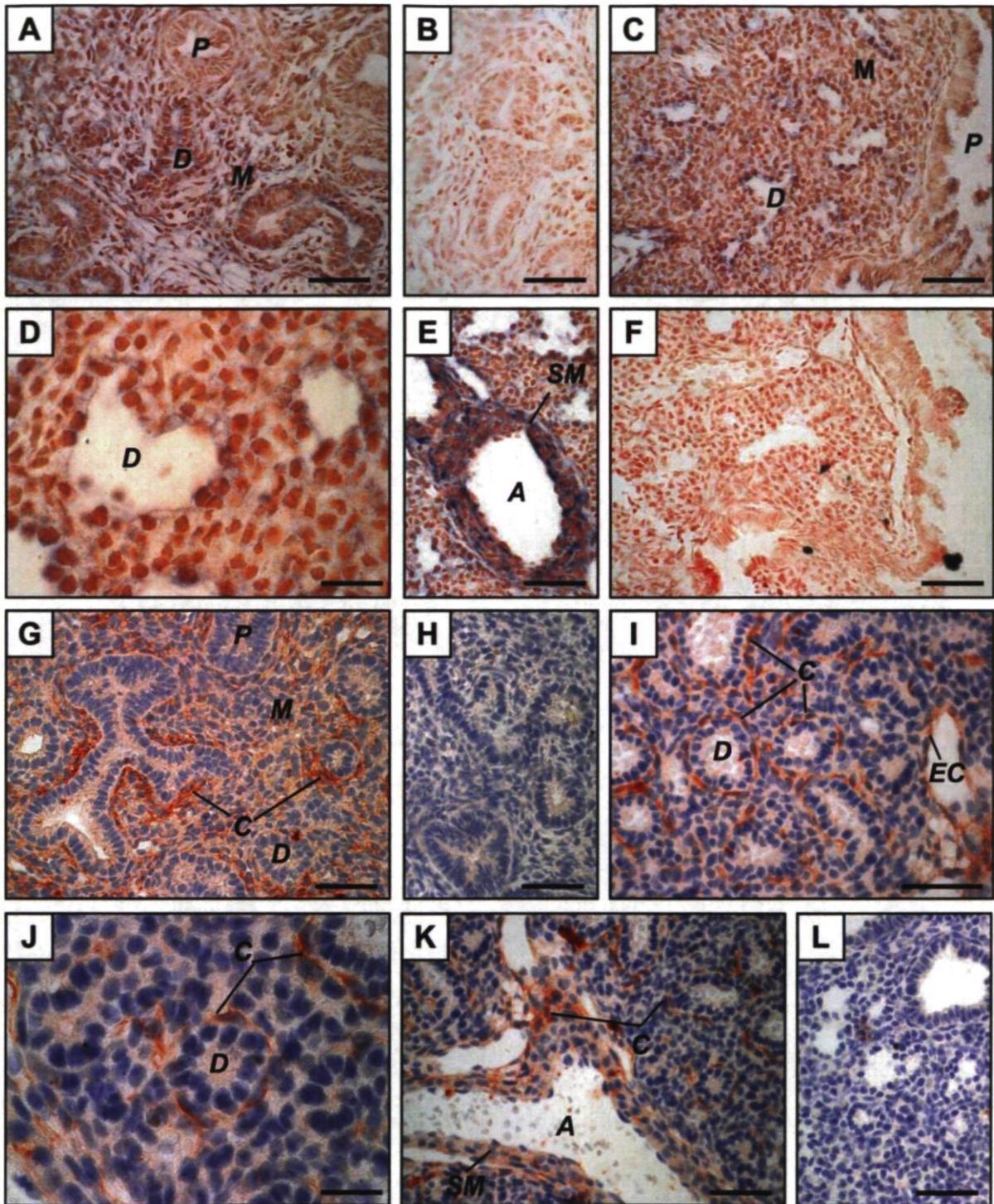


Figure 3

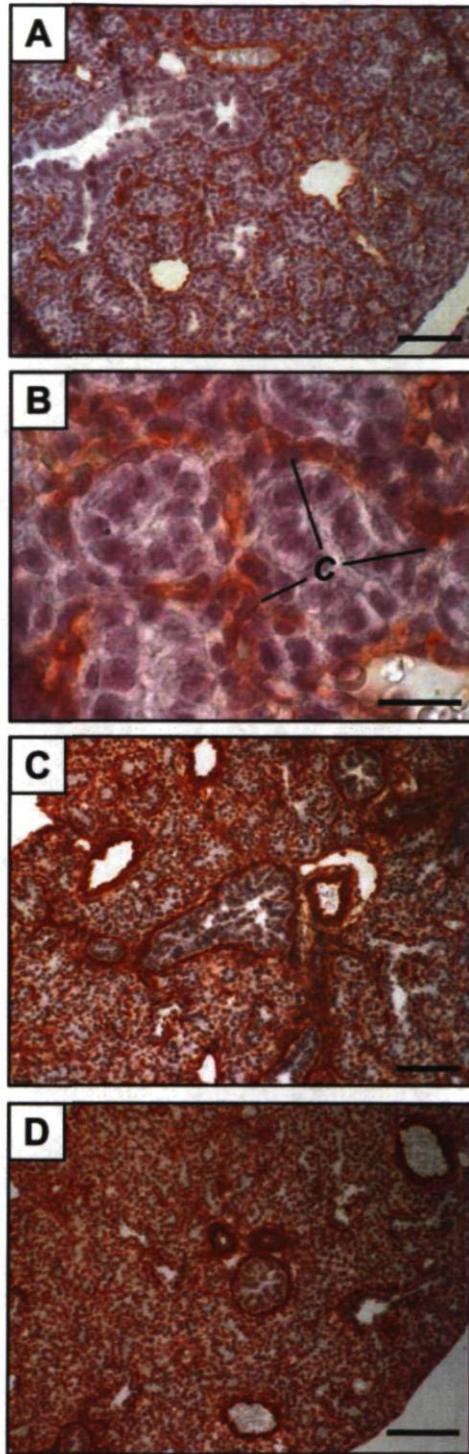


Figure 4

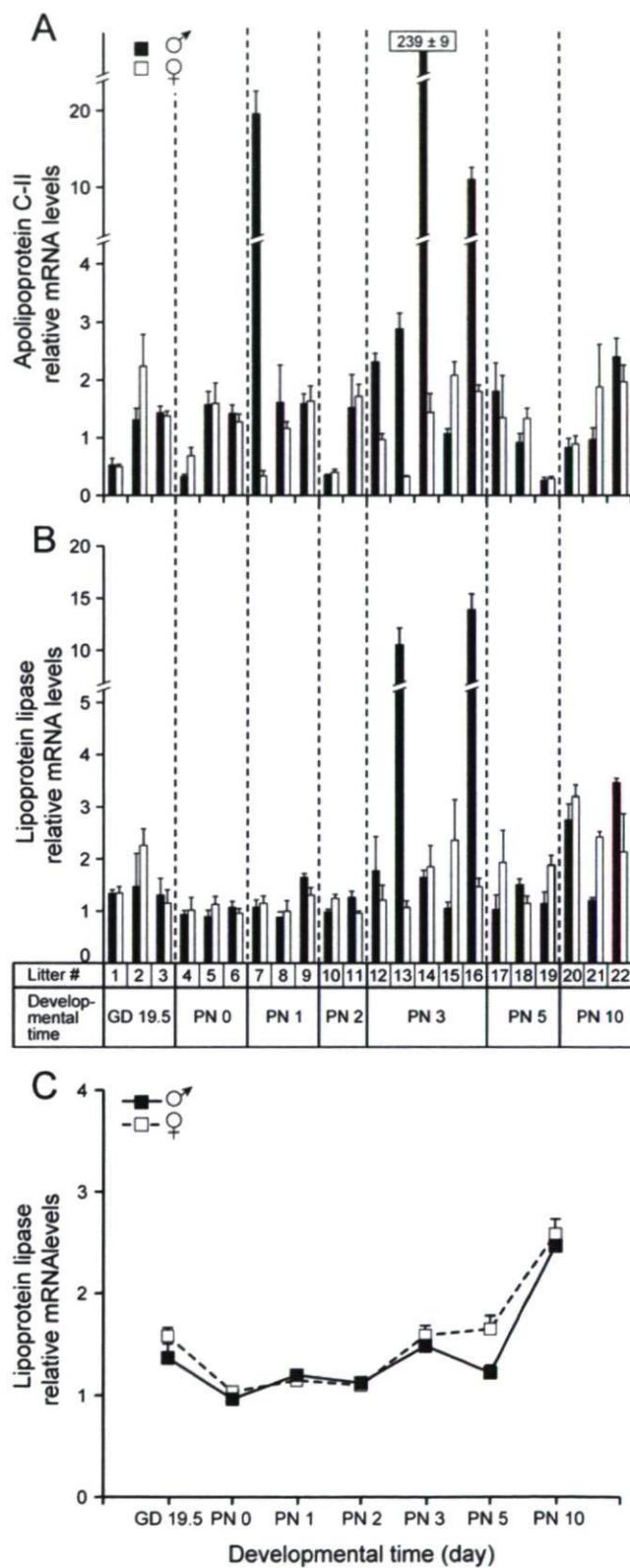


Figure 5

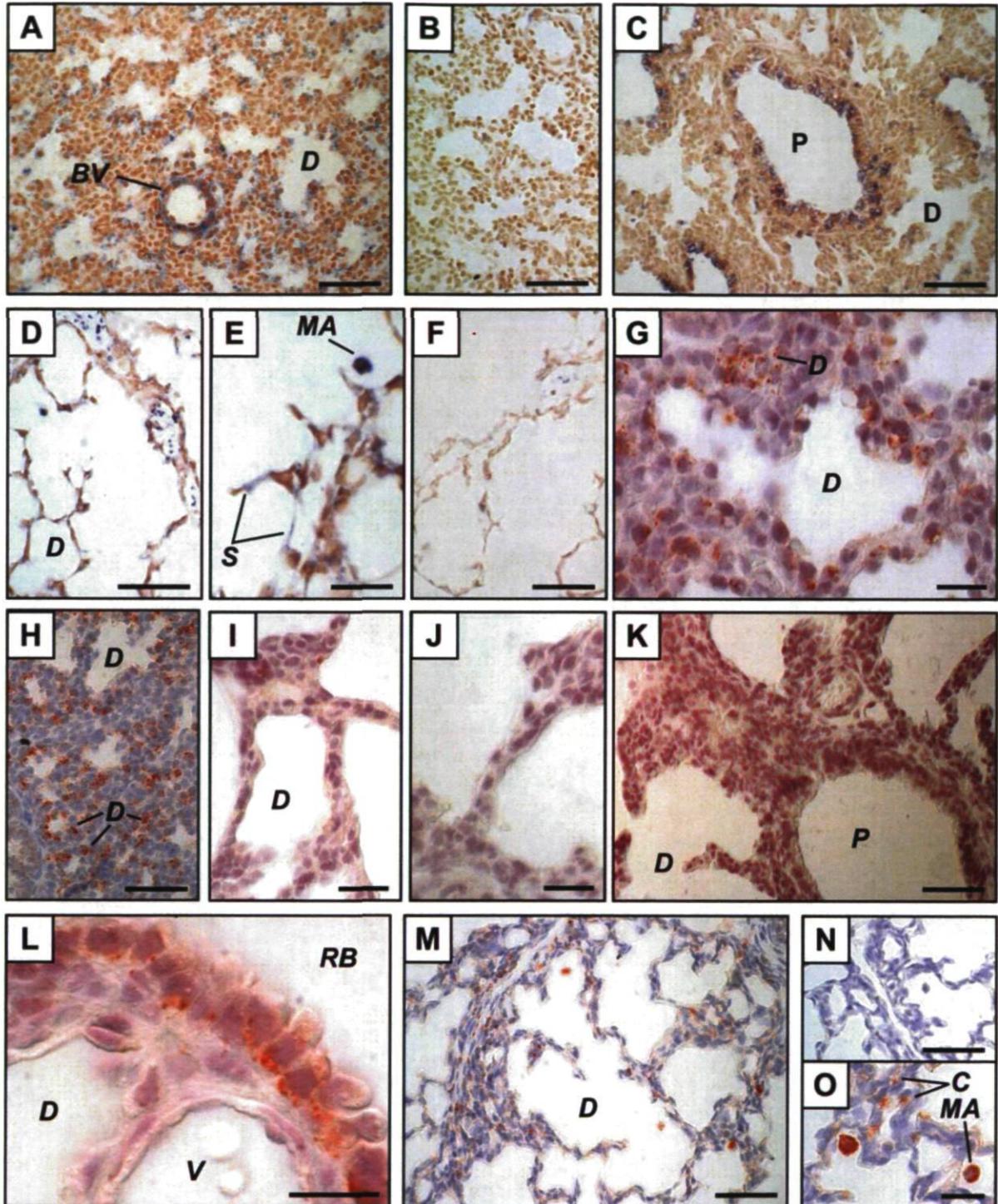


Figure 6

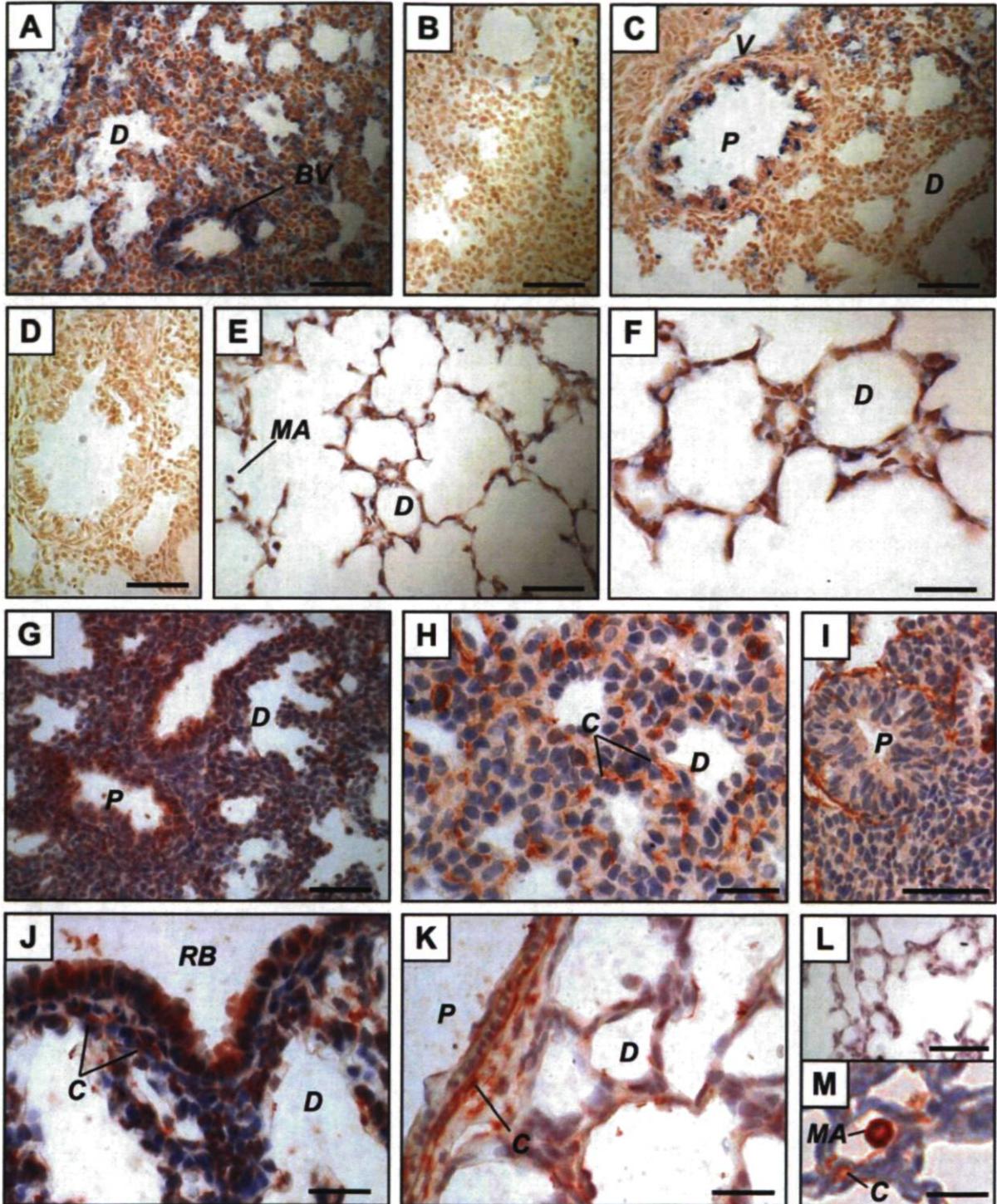
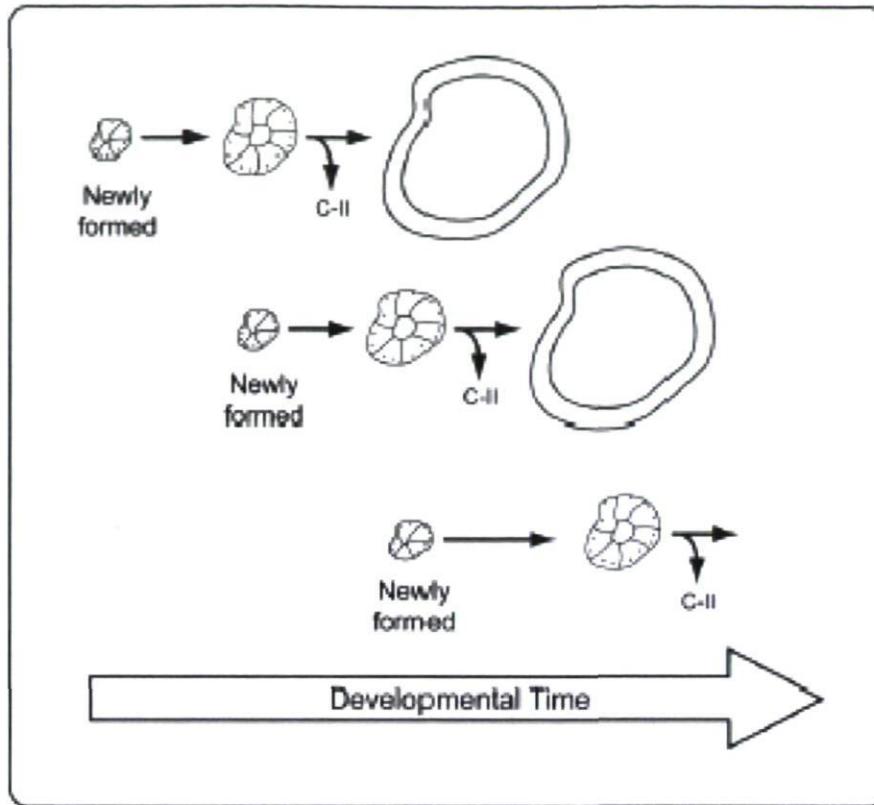


Figure 7



Chapitre III

Étude de caractérisation des apolipoprotéines A-I, A-II et H dans le poumon foetal murin

Le présent chapitre est un complément des expériences effectuées pour l'article scientifique qui compose le chapitre II de ce manuscrit. Ces résultats font l'objet d'un article qui a été soumis tout récemment dans «Histochemistry and Cell Biology» qui a pour titre «Apolipoprotein A-I, A-II and H mRNA and protein accumulation in the developing lung in late gestation including a transient nuclear anti-apolipoprotein A-II signal». Les techniques utilisées sont les mêmes que celles présentées dans le chapitre II, à l'exception des temps de révélations pour les techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie qui peuvent varier selon la sonde et l'anticorps. Notez que l'exécution des expériences complémentaires a été réalisée par l'auteure de ce mémoire.

L'augmentation de la synthèse du surfactant a lieu au jour de gestation 17.5 chez la souris tel que déterminé par l'apparition des corps lamellaires et que l'augmentation de l'activité de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides pulmonaires^{99, 100}. Nous avons poursuivi l'étude de caractérisation pour les apolipoprotéines A-I, A-II et H dans des poumons fœtaux murins du JG 15.5 au JG 17.5 afin de couvrir le début de la période d'augmentation de la synthèse de surfactant. Pour chacune des expérimentations, un minimum de six individus ont été analysés, soit un mâle et une femelle par portée.

Comme démontré par l'hybridation *in situ*, le site d'expression de l'apoA-I change entre les JG 15.5 et 17.5 (Figure 6A à 6E). Au jour de gestation 15.5, le message est retrouvé quasiment exclusivement dans le mésenchyme. Par contre, au JG 17.5, le signal positif se retrouve dans les cellules épithéliales des conduits respiratoires distaux et non pas dans les conduits bronchiques et le mésenchyme. Un faible signal dans le mésenchyme peut être observé au JG 16.5 (résultat non montré). Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'une deuxième sonde spécifique pour l'apoA-I (résultat non montré). La protéine apoA-I a été localisée par immunohistochimie. Étonnamment, la protéine se retrouve dans des structures similaires du JG 15.5 à 17.5 (Figure 6F à 6K). Un fort signal positif est observé dans le réseau de capillaires et un marquage plus diffus se retrouve dans les autres structures pulmonaires, ce qui est compatible avec la possibilité que la protéine apoA-I soit sécrétée. Aucune accumulation de la protéine n'a été observée aux sites d'expression. Au JG 16.5, le signal ressemble fortement au marquage observé au JG 15.5,

soit un signal fort dans le réseau de capillaires et un signal diffus dans les autres structures pulmonaires (résultat non montré).

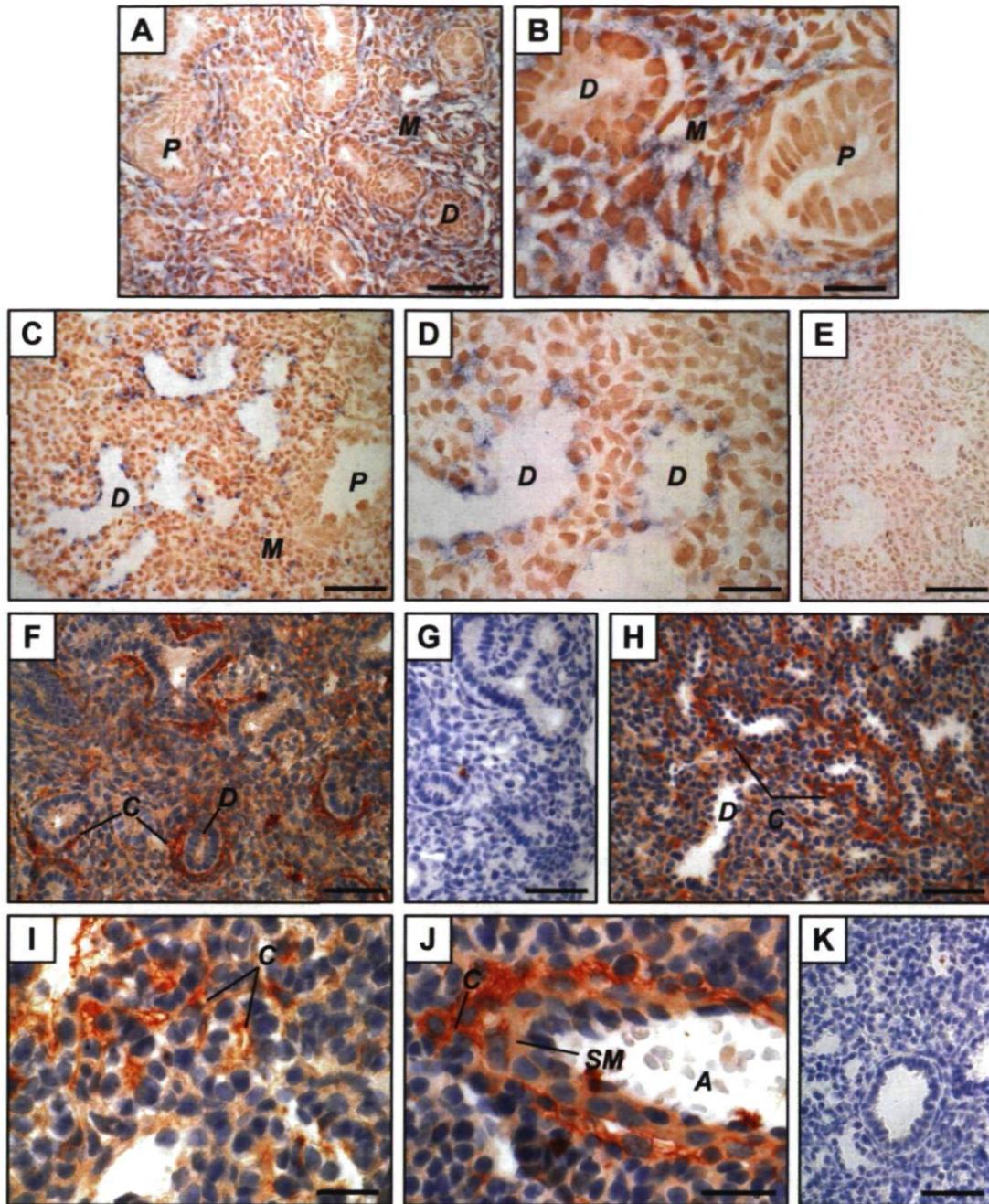


Figure 6 : Distribution du messager et de la protéine de l'apoA-I dans le poumon fœtal murin. Coupes de poumons au stade pseudoglandulaire (JG 15.5, A, B, F et G) ou au stade canaliculaire (JG 17.5, C à E, H à K). L'hybridation *in situ* (A à E) a été réalisée avec une sonde apoA-I anti-sens (A à D) et une sonde apoA-I sens (E). Le signal positif (bleu) montre un changement de localisation en fonction du temps de gestation. L'immunohistochimie a été réalisée avec un anticorps polyclonal anti-apoA-I (F, H à J) et des IgG de chèvre comme contrôle négatif (G et K). Le signal positif (rouge) est retrouvé principalement dans le réseau de capillaires. Un grossissement, 400X (A, C, E à H, J et K) avec une barre d'erreur de 50 μm ou de 1000X (B, D et I) avec une barre d'erreur de 20 μm . *A*, artère; *C*, capillaire; *D*, épithélium distal; *M*, mésenchyme; *P*, épithélium proximal; *SM*, muscle lisse.

Quelques similarités dans le patron d'expression de l'apoA-I et de l'apoA-II ont été observées. Comme pour l'apoA-I, le site majeur d'expression pour l'apoA-II change de localisation. Plus précisément, le messager est localisé dans le mésenchyme au JG 15.5 pour se situer dans les cellules épithéliales des conduits respiratoires distaux au JG 17.5 (Figure 7A à 7F). Par contre, le signal positif observé pour le messager de l'apoA-II aux JG 15.5 et 16.6 semble plus spécifique que celui observé pour l'apoA-I. Le signal obtenu par hybridation *in situ* pour l'apoA-II pour l'ensemble des jours étudiés est très défini (Figure 7A, 7B et 7D) comparativement à l'apoA-I où la totalité des cellules du mésenchyme sont marquée (Figure 6A à 6E).

La protéine apoA-II a été localisée par immunohistochimie au JG 15.5 dans les cellules du mésenchyme (Figure 7). Contrairement à l'apoA-I, aucun signal n'a été détecté pour l'apoA-II dans les cellules épithéliales distales et proximales. Au JG 17.5, deux patrons de localisation sont observés (Figure 7H et 7K). Certains individus présentent une localisation de l'apoA-II dans le mésenchyme tandis que d'autres présentent la protéine dans les capillaires. L'explication de l'observation de ces deux patrons de localisation s'expliquerait par un changement de localisation au JG 17.5 du mésenchyme vers les capillaires. Des individus au JG 18.5 ont été ajoutés à l'étude. L'apoA-II se localise seulement dans les capillaires (Figure 7L et 7M) pour tous les individus supplémentaires. Une autre observation surprenante est qu'il y a un fort signal positif dans les noyaux de plusieurs cellules du mésenchyme. Ce signal est observé aux JG 15.5 et 17.5 (Figure 7G à 7K) mais pas au JG 18.5 (Figure 7L et 7K).

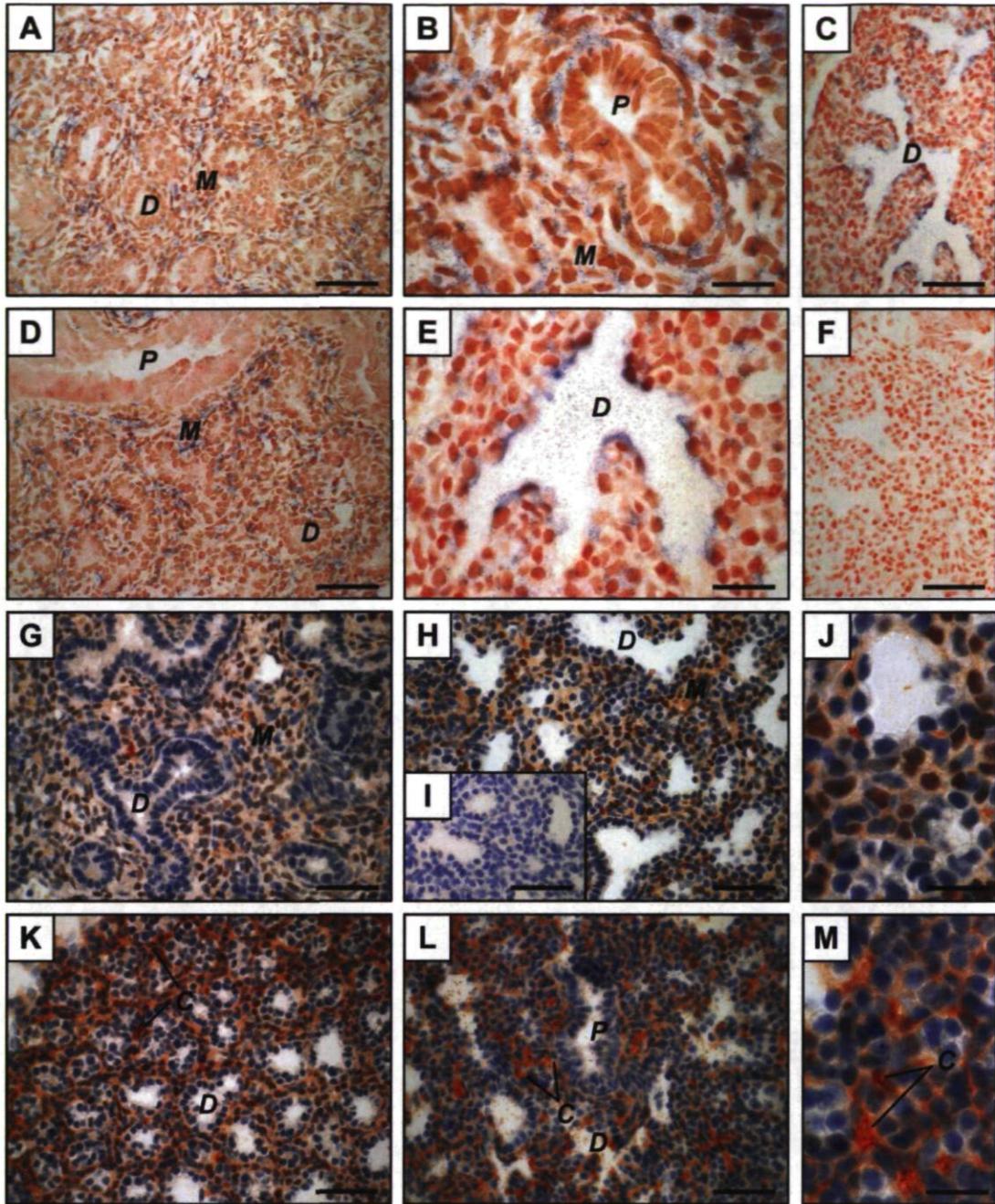


Figure 7: Distribution du message et de la protéine de l'apoA-II dans le poumon foetal murin. Coupes de poumons au stade pseudoglandulaire (JG 15.5, A, B et G), entre les stades pseudoglandulaire et canaliculaire (JG 16.5, D), au stade canaliculaire (JG 17.5, C, E, F, H à K) ou au début de la phase sacculaire (JG 18.5, L et M). L'hybridation *in situ* (A à F) a été réalisée avec une sonde apoA-II anti-sens (A à E) et une sonde apoA-II sens (F). Le signal positif (bleu) montre un changement de localisation en fonction du temps de gestation. L'immunohistochimie a été réalisée avec un anticorps polyclonal anti-apoA-II (G, H, J à M) et des IgG de chèvre comme contrôle négatif (I). Le signal positif (rouge) est retrouvé principalement dans le mésenchyme et change pour le réseau de capillaires au JG 17.5. Un grossissement, 400X (A, C, D, F à I, K et L) avec une barre d'erreur de 50 μm ou de 1000X (B, E, J et M) avec une barre d'erreur de 20 μm . C, capillaire; D, épithélium distal; M, mésenchyme; P, épithélium proximal.

Une sonde spécifique pour l'apoH a été réalisée pour la localisation du messenger par hybridation *in situ*. Par contre, aucun signal n'a été détecté au JG 15.5 pour le messenger de l'apoH (8 fœtus de 4 portées). Il est à noter qu'une étude antérieure menée par notre laboratoire a permis de quantifier par QPCR le mRNA de l'apoH au JG 15.5⁶⁶. Plusieurs raisons peuvent expliquer l'absence de signal en hybridation *in situ* malgré le résultat obtenu par QPCR. L'étude antérieure démontre une faible quantité d'apoH dans le poumon fœtal. Cette faible quantité peut être insuffisante pour atteindre le seuil de détection de la technique d'hybridation *in situ*. Au JG 17.5, l'expression de l'apoH est retrouvée dans les cellules épithéliales distales et dans le muscle lisse de certaines grosses artères (Figure 8A à 8E). La protéine apoH se retrouve dans les capillaires à partir du JG 15.5 au JG 17.5 (Figure 8F à 8L). De plus, un signal positif est retrouvé à partir du JG 17.5 dans le muscle lisse de certaines grosses artères (Figure 8K) ce qui concorde avec les résultats obtenus par l'hybridation *in situ* (Figure 8E).

Certaines similitudes dans la localisation ont été observées entre les messagers et les protéines de l'apoH, l'apoC-II et la LPL. Au JG 15.5, aucun signal n'avait été détecté pour l'apoH tandis qu'un très faible signal a été détecté pour le messenger de la LPL (article, Figure 1A). Au JG 17.7, le muscle lisse des grosses artères est marqué pour les trois messagers (article Figure 1E et 2F). De plus, la LPL, tout comme l'apoH, se localise dans les capillaires à partir du JG15.5 et dans le muscle lisse au JG17.5 (article, Figure 1G à 1L).

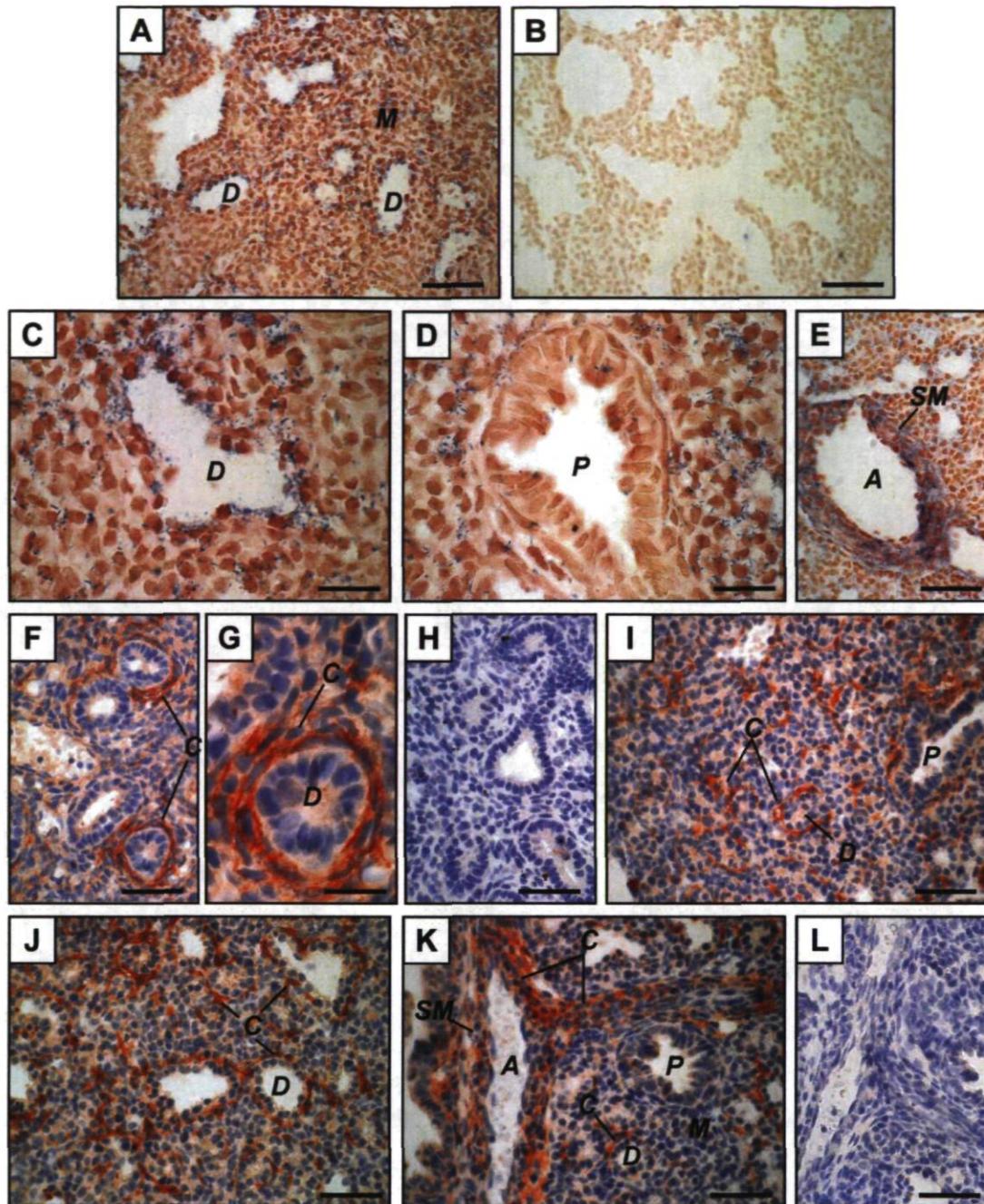


Figure 8 : Distribution du messager et de la protéine de l'apoH dans le poumon fœtal murin. Coupes de poumons au stade pseudoglandulaire (JG 15.5, F à H) ou au stade canaliculaire (JG 17.5, A à E, I à L). L'hybridation *in situ* (A à E) a été réalisée avec une sonde apoH anti-sens (A, C à E) et une sonde apoH sens (B). Le signal positif (bleu) a été détecté seulement au JG 17.5 dans les cellules épithéliales des conduits respiratoires distaux et dans le muscle lisse des grosses artères. L'immunohistochimie a été réalisée avec un anticorps polyclonal anti-apoH (F, G, I à K) et des IgG de chèvre comme contrôle négatif (H et L). Le signal positif (rouge) est retrouvé principalement dans les capillaires. Un grossissement, 400X (A, B, E, F, H à L) avec une barre d'erreur de 50 μm ou de 1000X (C, D et G) avec une barre d'erreur de 20 μm . *A*, artère; *C*, capillaire; *D*, épithélium distal; *M*, mésenchyme; *P*, épithélium proximal; *SM*, muscle lisse.

Chapitre IV
Discussion et conclusion

1. Résumé des principaux résultats de l'étude

Le processus de maturation du poumon implique la production de surfactant pulmonaire, un composé majoritairement lipidique^{3, 13}. Une mauvaise régulation des facteurs qui gouvernent ce processus augmente le risque du syndrome de détresse respiratoire se caractérisant par un déficit en surfactant. La disponibilité en substrats lipidiques est essentielle à la synthèse du principal composant du surfactant pulmonaire : la phosphatidylcholine disaturée (DSPC). Afin d'augmenter la production de DSPC, les cellules PTII doivent être en présence d'une quantité adéquate de chaînes d'acides gras. Plusieurs sources potentielles d'acides gras peuvent intervenir dans la synthèse du surfactant dont la synthèse de novo par le fœtus et le transport par les lipoprotéines de la circulation maternelle⁶².

Cette étude réalisée du jour de gestation 15.5 au jour post-natal 10 a permis d'identifier les sites d'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des lipides dans le poumon murin en développement, soit les apolipoprotéines A-I, A-II, C-II, H et la lipoprotéine lipase. L'hybridation *in situ* a permis d'observer un changement de localisation en fonction du temps de l'expression de tous les gènes de l'étude. De plus, une co-localisation au JG 17.5 pour tous les messagers a été observée dans les cellules épithéliales distales. Un fort signal positif est observé au JG 17.5 pour l'apoC-II, l'apoH et la LPL dans le muscle lisse de certaines grosses artères. Par immunohistochimie, une co-localisation a été observée pour l'apoA-I, H et la LPL dans les capillaires. À partir du JG 15.5, l'apoA-II est située dans le mésenchyme tandis qu'à partir du JG18.5, elle se localise dans les capillaires. L'apoC-II est exprimée dans les cellules épithéliales des conduits respiratoires. En période post-natale, le QPCR a permis de démontrer qu'il existe une grande variabilité entre les individus d'une même portée pour l'expression de l'apoC-II comparativement à l'expression de la LPL. Il est possible d'observer un changement de localisation du messenger et de la protéine pour l'apoC-II et la LPL selon l'âge. Vers l'âge PN 3, les messagers et protéines se retrouvent dans les cellules épithéliales des conduits proximaux tandis qu'à l'âge PN 5, ils se retrouvent dans les macrophages.

1.1. Changement de localisation pour l'apoA-I

Tel que mentionné préalablement dans ce document, la principale fonction de l'apoA-I est de permettre le transport du cholestérol des tissus périphériques au foie. L'apoA-I agit comme cofacteur pour l'activation de la LCAT, enzyme souvent associée aux vaisseaux sanguins. Par contre, il n'y a aucune démonstration directe du rôle de l'apoA-I dans le poumon foetal sur la LCAT.

En période anténatale, aucune co-localisation n'est observée entre la protéine et le messenger pour l'apoA-I. Nos résultats démontrent que le messenger au JG 15.5 se localise dans le mésenchyme du poumon foetal. Au JG17.5, on observe un changement de localisation de l'expression de l'apoA-I. Le messenger est concentré dans les cellules épithéliales des conduits respiratoires. Puisque ce jour de gestation est associé à la production du surfactant par les PTII, il est probable que le messenger de l'apoA-I est un rôle avec la synthèse de surfactant. Le faible signal observé pour le messenger de l'apoA-I au JG 16.5 peut être appuyé par des résultats antérieurs de QPCR qui démontraient une diminution de la quantité de messenger pour ce temps de gestation ⁶⁶. De plus, la protéine apoA-I est retrouvée dans les capillaires entourant les cellules épithéliales des conduits distaux. Il est aussi connu que l'apoA-I est une protéine sécrétée ce qui expliquerait le faible marquage diffus sur l'ensemble des structures pulmonaires ⁶⁴.

1.2. Changement de localisation pour l'apoA-II

L'apoA-II est connue comme composante structurale des lipoprotéines HDLs. Au JG 15.5, le messenger de l'apoA-II se localise seulement dans certaines cellules du mésenchyme. Il est possible que les cellules exprimant l'apoA-II soient des lipofibroblastes. Les lipofibroblastes sont un sous-type de cellules fibroblastiques présentant des gouttelettes lipidiques. Malheureusement, la démonstration de la co-localisation du messenger de l'apoA-II et des lipofibroblastes n'a pu être réalisée puisque leurs localisations font appel à deux techniques différentes. Pour l'apoA-II, la localisation

ne pouvait se faire que par la technique d'IHC sur des coupes en paraffine tandis que la localisation des lipofibroblastes s'effectue seulement par la technique de coloration à l'huile rouge sur des tissus fixés à température optimal de coupe (OCT). La protéine apoA-II est la seule que nous avons détectée dans le mésenchyme. Seules les cellules mésenchymateuses présentent un signal positif pour cette protéine. Il est possible d'observer la protéine dans le noyau de certaines cellules du mésenchyme. Cette localisation nucléaire de l'apoA-II est plutôt inattendue. De plus, certains individus au JG 17.5 présentent un marquage positif exclusif aux capillaires. Une étude réalisée par de Beer et al. démontre que l'apoA-II pourrait inhiber la LCAT^{101, 102}.

1.3. Changement de localisation pour l'apoH

Le messenger de l'apoH au JG 15.5 se retrouve dans le mésenchyme pour ensuite se localiser dans les cellules épithéliales de conduits respiratoires au JG 17.5 comme tous les gènes de l'étude. Un fort signal positif est observé dans le muscle lisse des grosses artères. L'absence de signal aux JG 15.5 et 16.5 peut être expliquée par la faible quantité de messenger détectée par QPCR. À vrai dire, l'apoH présente la plus faible quantité de messenger comparativement aux autres gènes de l'étude⁶⁶. La protéine de l'apoH se retrouve dans le réseau de capillaires et dans le muscle lisse des grosses artères au JG 17.5. Le marquage dans le muscle lisse des grosses artères est aussi observé pour le messenger et la protéine de la LPL et de l'apoC-II. Nous pouvons suggérer qu'il existe une relation entre ces trois protéines. Tel que démontré par l'équipe de Nakaya et al⁷⁴, le complexe apoH/apoC-II augmente l'activité de la LPL comparativement à l'apoC-II seul. Puisque le site d'action de la LPL est le réseau de capillaires, l'apoH pourrait se retrouver dans les mêmes structures.

2. Rôles des androgènes et des glucocorticoïdes dans l'expression des apolipoprotéines A-I, A-II, C-II, H et de la lipoprotéine lipase dans le développement pulmonaire

Il est reconnu que la montée de surfactant pulmonaire est sous le contrôle de plusieurs hormones tels que les androgènes, les estrogènes et les glucocorticoïdes^{14, 31, 103, 104}. Une étude antérieure réalisée au sein de notre laboratoire a permis d'observer par QPCR les différences sexuelles dans le poumon fœtal aux jours 15.5 à 18.5 de gestation⁶⁶. Il a été démontré que l'expression de l'apoA-I, A-II, C-II et H présente une différence sexuelle dont les valeurs d'expression sont beaucoup plus élevées au niveau des poumons de fœtus femelles que de fœtus mâles au JG15.5. Ces résultats suggèrent que ces apolipoprotéines sont impliquées dans le délai transitoire de la montée de surfactant pulmonaire observé chez les fœtus mâles. Cette étude démontre aussi une co-régulation de l'apoA-I, A-II, C-II et H avec les 17beta-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (17βHSD2) et de type 5 (17βHSD5). La 17βHSD5 est entre autre responsable de la synthèse de la testostérone (conversion de l'androstènedione en testostérone) tandis que la 17βHSD2 a un rôle dans l'inactivation de la testostérone (conversion de testostérone en androstènedione). Ces résultats suggèrent une régulation des différentes apolipoprotéines par les androgènes. Plus précisément, il a été démontré que la testostérone diminuait l'expression de l'apoA-I chez les deux sexes. Cependant, les estrogènes ont un effet opposé à la testostérone, soit qu'elles augmentaient l'expression de l'apoA-I⁶⁵.

Quelques études ont observé la régulation par les glucocorticoïdes de l'expression de plusieurs apolipoprotéines. Des études cliniques ont démontré que des injections de dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse, augmentait l'expression générale de l'apoA-I⁷⁵. De plus, il a été démontré que les glucocorticoïdes ont un effet sur la transcription de l'apoA-I. Le mode d'action n'est pas encore connu mais certaines expériences de transfections démontrent que l'augmentation de l'apoA-I s'explique entre autre par la liaison du récepteur des glucocorticoïdes (GR) au promoteur de l'apoA-I. En effet, un antagoniste au GR a été administré à des rats ayant subit un traitement à la dexaméthasone et les résultats démontrent un blocage de l'augmentation de l'expression de l'apoA-I⁶⁵. De plus, il a été démontré que les glucocorticoïdes augmentent également

l'expression de la LPL dans les préadipocytes humain. Une étude réalisée par Torday et al. a démontré que les glucocorticoïdes régule positivement le mécanisme de mobilisation des triacylglycérols des fibroblastes aux cellules PTII. ¹⁰⁵

3. Conclusions

3.1. Rappel des principaux résultats de l'étude

Les résultats obtenus suite à cette étude réalisée du jour de gestation 15.5 au jour post-natal 10 a permis d'identifier les sites d'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des lipides dans le poumon murin en développement, soit les apolipoprotéines (apo) A-I, A-II, C-II, H et la lipoprotéine lipase. L'hybridation *in situ* a permis d'observer une co-localisation au JG17.5 pour tous les gènes étudiés dans les cellules épithéliales des conduits respiratoires. Une co-localisation a été observée par immunohistochimie pour les apoH, A-I et la LPL dans les capillaires. Aux JG 15.5 et 16.5, l'apoA-II se retrouve dans les cellules du mésenchyme seulement. En période post-natale, le niveau d'expression de l'apoC-II varie beaucoup entre les individus du même âge tandis qu'on observe une augmentation significative par QPCR de l'expression de la LPL dans le temps. Il est possible d'observer un changement de localisation du messenger et de la protéine entre les jours PN 0 et 5 pour l'apoC-II et la LPL. Les messagers se retrouvent dans les conduits bronchiques proximaux pour ensuite se situer dans les macrophages.

3.2. Implications des résultats obtenus

Les résultats de l'étude suggèrent que les cellules épithéliales, exprimant les diverses apolipoprotéines et la lipoprotéine lipase, aient un rôle dans la maturation pulmonaire. La localisation et le niveau d'expression au JG 17.5 des messagers de l'apolipoprotéine A-I, A-II, C-II, H et de la LPL suggèrent fortement qu'ils ont un rôle dans la production de surfactant. Il est probable que la machinerie pour le recrutement des acides gras de la circulation par la LPL activée soit modulée régionalement par la sécrétion de l'apoC-II et de l'apoH.

Afin de mieux comprendre les implications de chacun des gènes étudiés ayant un rôle dans le métabolisme et le transport des lipides dans le développement pulmonaire, il serait intéressant de vérifier la synthèse de surfactant et la morphologie du poumon chez les

fœtus mâles et femelles des souris dont le gène apoA-I, apoA-II, apoC-II ou apoH a été délété. Une souris déficiente pour la LPL meurt peu après la naissance d'une insuffisance respiratoire¹⁰⁷. Afin de mieux comprendre la contribution des apolipoprotéines dans le développement pulmonaire et de contourner le problème de mortalité, des souris Cre-Lox pourrait être envisagées afin de réguler l'expression d'un gène pour un tissu spécifique et/ou un type cellulaire précis.

Ainsi, l'étude des apolipoprotéines et de la lipoprotéine lipase dans la période de la maturation pulmonaire est d'une importance majeure afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la production du surfactant. Ces études permettront éventuellement d'obtenir un meilleur pronostic des enfants nés prématurément et d'élaborer et administrer de meilleurs traitements selon le besoin de chacun des individus malades.

Chapitre V
Bibliographie

1. <http://www.embryology.ch/francais/rrespiratory/phasen02.html>
2. <http://www.mapageweb.umontreal.ca/cabanat/bio2412/Images/Pageh110.jpeg>
3. Copland, I. & Post, M. Lung development and fetal lung growth. *Paediatr Respir Rev* **5 Suppl A**, S259-64 (2004).
4. Costa, R.H. et al. Transcription factors in mouse lung development and function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**, L823-38 (2001).
5. Hislop, A. Developmental biology of the pulmonary circulation. *Paediatr Respir Rev* **6**, 35-43 (2005).
6. Kitaoka, H. et al. Development of the human fetal airway tree: analysis of the numerical density of airway endtips. *Anat Rec* **244**, 207-13 (1996).
7. Warburton, D. et al. The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech Dev* **92**, 55-81 (2000).
8. Saliba, E. et al. Médecine et biologie du développement. Du gène au nouveau-né. *Health & Fitness* **1**. 1-431 (2001)
9. Akeson, A.L. et al. Embryonic vasculogenesis by endothelial precursor cells derived from lung mesenchyme. *Dev Dyn* **217**, 11-23 (2000).
10. Parera, M.C. et al. Distal angiogenesis: a new concept for lung vascular morphogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**, L141-9 (2005).
11. deMello, D.E. & Reid, L.M. Embryonic and early fetal development of human lung vasculature and its functional implications. *Pediatr Dev Pathol* **3**, 439-49 (2000).
12. Delacourt, C. et al. Normal and abnormal alveolar development. *Rev Mal Respir* **20**, 373-83 (2003).
13. Parmigiani, S. et al. Current concepts on the pulmonary surfactant in infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* **18**, 369-80 (2005).
14. Ballard, P.L. Hormonal regulation of pulmonary surfactant. *Endocr Rev* **10**, 165-81 (1989).
15. Whitsett, J.A. et al. Differential effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta on synthesis of Mr = 35,000 surfactant-associated protein in fetal lung. *J Biol Chem* **262**, 7908-13 (1987).
16. Alcorn, D. et al. Morphological effects of chronic tracheal ligation and drainage in the fetal lamb lung. *J Anat* **123**, 649-60 (1977).

17. Moessinger, A.C. et al. Role of lung fluid volume in growth and maturation of the fetal sheep lung. *J Clin Invest* **86**, 1270-7 (1990).
18. Bland, R.D. & Nielson, D.W. Developmental changes in lung epithelial ion transport and liquid movement. *Annu Rev Physiol* **54**, 373-94 (1992).
19. McCray, P.B. et al. Developing bronchopulmonary epithelium of the human fetus secretes fluid. *Am J Physiol* **262**, L270-9 (1992).
20. Rooney, S.A. et al. Molecular and cellular processing of lung surfactant. *Faseb J* **8**, 957-67 (1994).
21. Serrano, A.G. & Perez-Gil, J. Protein-lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system. *Chem Phys Lipids* **141**, 105-18 (2006).
22. Korfhagen, T.R. et al. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9594-9 (1996).
23. Klein, J.M. et al. Transient surfactant protein B deficiency in a term infant with severe respiratory failure. *J Pediatr* **132**, 244-8 (1998).
24. Mazela, J. et al. Evolution of pulmonary surfactants for the treatment of neonatal respiratory distress syndrome and paediatric lung diseases. *Acta Paediatr* **95**, 1036-48 (2006).
25. Nielsen, H.C. Androgen receptors influence the production of pulmonary surfactant in the testicular feminization mouse fetus. *J Clin Invest* **76**, 177-81 (1985).
26. Mendelson, C.R. & Boggaram, V. Hormonal and developmental regulation of pulmonary surfactant synthesis in fetal lung. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **4**, 351-78 (1990).
27. Floros, J. et al. Dihydrotestosterone blocks fetal lung fibroblast-pneumonocyte factor at a pretranslational level. *J Biol Chem* **262**, 13592-8 (1987).
28. Torday, J.S. Dihydrotestosterone inhibits fibroblast-pneumonocyte factor-mediated synthesis of saturated phosphatidylcholine by fetal rat lung cells. *Biochim Biophys Acta* **835**, 23-8 (1985).
29. Klein, J.M. & Nielsen, H.C. Androgen regulation of epidermal growth factor receptor binding activity during fetal rabbit lung development. *J Clin Invest* **91**, 425-31 (1993).
30. Pereira, S. et al. Transforming growth factor beta 1 binding and receptor kinetics in fetal mouse lung fibroblasts. *Proc Soc Exp Biol Med* **218**, 51-61 (1998).

31. Nielsen, H.C. et al. Dihydrotestosterone inhibits fetal rabbit pulmonary surfactant production. *J Clin Invest* **69**, 611-6 (1982).
32. Adamson, I.Y. et al. Accelerated fetal lung maturation by estrogen is associated with an epithelial-fibroblast interaction. *In Vitro Cell Dev Biol* **26**, 784-90 (1990).
33. Roberts, D. & Dalziel, S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev* **3**, CD004454 (2006).
34. Marlow, N. et al. Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth. *N Engl J Med* **352**, 9-19 (2005).
35. Jobe, A.H. & Ikegami, M. Lung development and function in preterm infants in the surfactant treatment era. *Annu Rev Physiol* **62**, 825-46 (2000).
36. Stevenson, D.K. et al. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1993 through December 1994. *Am J Obstet Gynecol* **179**, 1632-9 (1998).
37. Farrell, P.M. & Avery, M.E. Hyaline membrane disease. *Am Rev Respir Dis* **111**, 657-88 (1975).
38. Saizou, C. et al. Antenatal corticosteroids: benefits and risks. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **34**, S111-7 (2005).
39. Valencia, A.M. et al. Early postnatal dexamethasone influences matrix metalloproteinase-2 and -9, and their tissue inhibitors in the developing rat lung. *Pediatr Pulmonol* **35**, 456-62 (2003).
40. Liggins, G.C. & Howie, R.N. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* **50**, 515-25 (1972).
41. Sweet, D. et al. European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome. *J Perinat Med* **35**, 175-86 (2007).
42. Wapner, R. Antenatal corticosteroids: we continue to learn. *Am J Obstet Gynecol* **190**, 875 (2004).
43. Sinha, S. et al. Surfactant for respiratory distress syndrome: are there important clinical differences among preparations? *Curr Opin Pediatr* **19**, 150-4 (2007).
44. Ghodrati, M. Lung surfactants. *Am J Health Syst Pharm* **63**, 1504-21 (2006).
45. Soll, R.F. & Morley, C.J. Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000510 (2001).

46. Askie, L.M. et al. Oxygen-saturation targets and outcomes in extremely preterm infants. *N Engl J Med* **349**, 959-67 (2003).
47. Saugstad, O.D. Oxygen for newborns: how much is too much? *J Perinatol* **25 Suppl 2**, S45-9; discussion S50 (2005).
48. Benachi, A.a.R.R. Le poumon anténatal: de l'imagerie à l'interventionnel. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* **47**, 435-57 (2007).
49. Seaborn, T. et al. Identification of cellular processes that are rapidly modulated in response to tracheal occlusion within mice lungs. *Pediatr Res* **63**, 124-30 (2008).
50. Maltais, F. et al. In vivo tracheal occlusion in fetal mice induces rapid lung development without affecting surfactant protein C expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**, L622-32 (2003).
51. Kitano, Y. et al. Tracheal occlusion in the fetal rat: a new experimental model for the study of accelerated lung growth. *J Pediatr Surg* **33**, 1741-4 (1998).
52. Pownall, H. & Gotto, A. M., Jr. Structure and dynamics of human plasma lipoproteins. *New York : Oxford University Press Inc.*, **3** (1999).
53. Packard, C.J.a.S., J. Physiology of the lipoprotein transport system : an overview of lipoprotein metabolism, *Arnold, Hodder Headline Group*, London, 533-544 (1999).
54. Hamosh, M. & Hamosh, P. Lipoprotein lipase: its physiological and clinical significance. *Mol Aspects Med* **6**, 199-289 (1983).
55. Redgrave, T.G. Chylomicrons. *Arnold, Hodder Headline Group*, London, 31-54 (1999).
56. Ginsberg, H.N. et al. VLDL/LDL cascade system : assembly, secretion and intravascular metabolism of apoprotein B-containing lipoproteins. *Arnold, Hodder Headline Group*, London, 55-70 (1999).
57. Berneis, K.K. & Krauss, R. M. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J.Lipid Res.* **43**, 1363-1379 (2002).
58. Feingold, K.R. et al. LDL subclass phenotypes and triglyceride metabolism in non-insulin-dependent diabetes. *Arterioscler Thromb* **12**, 1496-502 (1992).
59. Eisenberg, S. High density lipoprotein metabolism. *Arnold, Hodder Headline Group*, London, 71-85 (1999).
60. Gagné, C.a.G., D. Les dyslipoprotéïnémies : L'approche clinique. 2, Québec, 157 (1997).

61. Tall, A.R. et al. Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. *J Clin Invest* **110**, 899-904 (2002).
62. Tordet, C. et al. Pulmonary di-and-triacylglycerols during the perinatal development of the rat. *Experientia* **37**, 333-4 (1981).
63. Hopkins, B. et al. Organ distribution of apolipoprotein gene transcripts in 6-12 week postfertilization human embryos. *J Embryol Exp Morphol* **97**, 177-87 (1986).
64. Frank, P.G. & Marcel, Y.L. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res* **41**, 853-72 (2000).
65. Hargrove, G.M. et al. Hormonal regulation of apolipoprotein AI. *J Mol Endocrinol* **22**, 103-11 (1999).
66. Provost, P.R. et al. Apolipoprotein A-I, A-II, C-II, and H expression in the developing lung and sex difference in surfactant lipids. *J Endocrinol* **200**, 321-30 (2009).
67. Simard, M. et al. Sexually dimorphic gene expression that overlaps maturation of type II pneumocytes in fetal mouse lungs. *Reprod Biol Endocrinol* **4**, 25 (2006).
68. Hoffer, M.J. et al. Structure and expression of the mouse apolipoprotein C2 gene. *Genomics* **17**, 45-51 (1993).
69. Sheng, Y. et al. Cloning and characterization of the gene encoding the mouse beta 2-glycoprotein I. *Genomics* **41**, 128-30 (1997).
70. Okkels, H. et al. Structure of the human beta2-glycoprotein I (apolipoprotein H) gene. *Eur J Biochem* **259**, 435-40 (1999).
71. Cai, G. et al. Purification and characterization of an endothelial cell-viability maintaining factor from fetal bovine serum. *Biochim Biophys Acta* **1269**, 13-8 (1995).
72. Lin, K.Y. et al. Evidence for inhibition of low density lipoprotein oxidation and cholesterol accumulation by apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I). *Life Sci* **69**, 707-19 (2001).
73. Yu, P. et al. Beta2-glycoprotein I inhibits vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induced angiogenesis through its amino terminal domain. *J Thromb Haemost* **6**, 1215-23 (2008).
74. Nakaya, Y. et al. Activation of human post heparin lipoprotein lipase by apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I). *Biochem Biophys Res Commun* **95**, 1168-72 (1980).

75. Camps, L. et al. Lipoprotein lipase in lungs, spleen, and liver: synthesis and distribution. *J Lipid Res* **32**, 1877-88 (1991).
76. Mamputu, J.C. et al. Proliferative effect of lipoprotein lipase on human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 2212-9 (2000).
77. Chevalier, G. & Collet, A.J. *In vivo* incorporation of choline-³H, leucine-³H, and galactose-³H in alveolar type II pneumocytes in relation to surfactant synthesis. A quantitative radioautographic study in mouse by electron microscopy. *Anat. Rec.* **174**, 289-310 (1972).
78. Kikkawa, Y. et al. The type II epithelial cells of the lung. II. Chemical composition and phospholipid synthesis. *Lab. Invest.* **32**, 295-302 (1975).
79. Williams, M.C. Conversion of lamellar body membranes into tubular myelin in alveoli of fetal rat lungs. *J. Cell Biol.* **72**, 260-277 (1977).
80. Askin, F.B. & Kuhn III, C. The cellular origin of pulmonary surfactant. *Lab. Invest.* **25**, 260-268 (1971).
81. Bensch, K. et al. Granular pneumocytes: electron microscopic evidence of their exocrine function. *Science* **145**, 1318-1319 (1964).
82. Dermer, G.B. The pulmonary surfactant content of the inclusion bodies found within type II alveolar cells. *J. Ultrastruct. Res.* **33**, 306-317 (1970).
83. Goerke, J. Lung surfactant. *Biochim. Biophys. Acta* **344**, 241-261 (1974).
84. Goerke, J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim. Biophys. Acta* **1408**, 79-89 (1998).
85. Avery, M.E. & Mead, J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am. J. Dis. Child.* **97**, 517-523 (1959).
86. Liggins, G.C. & Howie, R. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* **50**, 515-525 (1972).
87. Goldberg, I.J. & Merkel, M. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front Biosci* **6**, D388-405 (2001).
88. Wang, H. & Eckel, R.H. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E271-88 (2009).
89. Breckenridge, W.C. et al. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II. *N Engl J Med* **298**, 1265-73 (1978).

90. Kinnunen, P.K. et al. Activation of lipoprotein lipase by native and synthetic fragments of human plasma apolipoprotein C-II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 4848-51 (1977).
91. Okabe, T. et al. Pulmonary macrophage: a major source of lipoprotein lipase in the lung. *Biochem Biophys Res Commun* **125**, 273-8 (1984).
92. Wade, K.C. et al. Gene induction during differentiation of human pulmonary type II cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**, 727-37 (2006).
93. Provost, P.R. et al. Apolipoprotein A-I, A-II, C-II, and H expression in the developing lung and sex difference in surfactant lipids. *J Endocrinol* **200**, 321-330 (2009).
94. Plante, J. et al. Epithelial cells are the major site of hydroxysteroid (17beta) dehydrogenase 2 and androgen receptor expression in the fetal mouse lungs during the period overlapping the surge of surfactant. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **117**, 139-145 (2009).
95. Vandesompele, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, 21-34 (2002).
96. Buckingham, S. & Avery, M.E. Time of appearance of lung surfactant in the fetal mouse. *Nature (London)* **193**, 688-689 (1962).
97. Brehier, A. & Rooney, S.A. Phosphatidylcholine synthesis and glycogen depletion in fetal mouse lung: developmental changes and the effects of dexamethasone. *Exp. Lung Res.* **2**, 273-287 (1981).
98. Oldenberg, V. & Van Golde, L.M.G. The enzymes of phosphatidylcholine biosynthesis in the fetal mouse lung. *Biochim. Biophys. Acta* **489**, 454-465 (1977).
99. Brehier, A. & Rooney, S.A. Phosphatidylcholine synthesis and glycogen depletion in fetal mouse lung: developmental changes and the effects of dexamethasone. *Exp Lung Res* **2**, 273-87 (1981).
100. Oldenborg, V. & Van Golde, L.M. The enzymes of phosphatidylcholine biosynthesis in the fetal mouse lung. Effects of dexamethasone. *Biochim Biophys Acta* **489**, 454-65 (1977).
101. Vu-Dac, N. et al. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest* **96**, 741-50 (1995).
102. de Beer, M.C. et al. SR-BI-mediated selective lipid uptake segregates apoA-I and apoA-II catabolism. *J Lipid Res* **46**, 2143-50 (2005).

103. Chu, A.J. & Rooney, S.A. Estrogen stimulation of surfactant synthesis. *Pediatr Pulmonol* **1**, S110-4 (1985).
104. Swezey, N.B. et al. Glucocorticoid receptor mRNA and protein in fetal rat lung in vivo: modulation by glucocorticoid and androgen. *Am J Physiol* **275**, L103-9 (1998).
105. Torday, J. et al. Metabolism and fate of neutral lipids of fetal lung fibroblast origin. *Biochim Biophys Acta* **1254**, 198-206 (1995).
106. Provost, P.R. & Tremblay, Y. Genes involved in the adrenal pathway of glucocorticoid synthesis are transiently expressed in the developing lung. *Endocrinology* **146**, 2239-45 (2005).
107. Weinstock, P.H. et al. Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. Mild hypertriglyceridemia with impaired very low density lipoprotein clearance in heterozygotes. *J Clin Invest* **96**, 2555-68 (1995).
108. Plante, J. et al. Epithelial cells are the major site of hydroxysteroid (17 β) dehydrogenase 2 and androgen receptor expression in fetal mouse lungs during the period overlapping the surge of surfactant. *J Steroid Biochem Mol Biol* **117**, 139-45 (2009).
109. Peng, T. et al. The distribution of apolipoproteins AI, CII and CIII mRNA in rat tissues. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* **22**, 232-4 (1991).
110. Lenich, C. et al. Apolipoprotein gene expression in the rabbit: abundance, size, and distribution of apolipoprotein mRNA species in different tissues. *J Lipid Res* **29**, 755-64 (1988).
111. Fu, L. et al. Extrahepatic expression of apolipoprotein A-II in mouse tissues: possible contribution to mouse senile amyloidosis. *J Histochem Cytochem* **49**, 739-48 (2001).
112. Ragusa, M.A. et al. RT-PCR and in situ hybridization analysis of apolipoprotein H expression in rat normal tissues. *Int J Mol Med* **18**, 449-55 (2006).
113. Vilaro, S. et al. Lipoprotein lipase uptake by the liver: localization, turnover, and metabolic role. *Am J Physiol* **254**, G711-22 (1988).

Annexe
Résultats complémentaires

1. Validation de la technique d'hybridation *in situ* à la DIG par l'hybridation *in situ* au ^{35}S

La technique d'hybridation *in situ* utilisée lors de ma maîtrise fut la technique d'hybridation *in situ* à la DIG. Comme mentionné précédemment, l'hybridation *in situ* à la DIG est une méthode non radioactive qui consiste à incorporer l'uracile marqué à la DIG en remplacement de la thymine dans la séquence de la sonde lors de sa synthèse. La détection de la sonde se fait en utilisant une phosphatase alcaline anti-digoxigénine qui donne un précipité bleu foncé suite à l'ajout du substrat.

Cette nouvelle technique était effectuée pour la première fois dans notre laboratoire. Afin de valider les résultats obtenus avec l'hybridation *in situ* à la DIG, nous avons décidé de comparer avec les résultats d'une méthode radioactive reconnue: l'hybridation *in situ* au ^{35}S . Cette dernière utilise plutôt un uracile marqué à l'isotope ^{35}S qui va être intégré dans la séquence de la sonde. Plusieurs similitudes existent entre les deux techniques, mais le temps de révélation est beaucoup plus court pour la technique à la DIG, soit 3 jours au lieu de quelques semaines. Le protocole d'hybridation *in situ* à la DIG fut décrit en détail dans l'article de Plante et al ¹⁰⁸. Afin de valider la spécificité de la technique à la DIG, nous avons sous-cloné un marqueur de phénotype cellulaire reconnu dans le poumon fœtal murin, soit le «alpha-smooth muscle actin» (α -SMA), un marqueur des cellules musculaires lisses. Deux sondes ayant la même séquence ont été synthétisées, soit une en présence d'uracile marqué au ^{35}S et l'autre en présence d'uracile marqué à la digoxigénine.

La figure 10 présente les résultats obtenus sur des coupes adjacentes de poumon fœtal murin au JG15.5 suite à l'expérimentation des deux techniques d'hybridation *in situ*, soit au ^{35}S (figure 10A) et à la DIG (figure 10B). Dans les deux cas, les cellules musculaires lisses entourant les cellules épithéliales des conduits bronchiques sont marquées. De plus, les deux techniques présentent une localisation similaire (voir flèches pointant la même structure pulmonaire dans la figure 10). Ce résultat valide la spécificité de la technique d'hybridation *in situ* à la DIG.

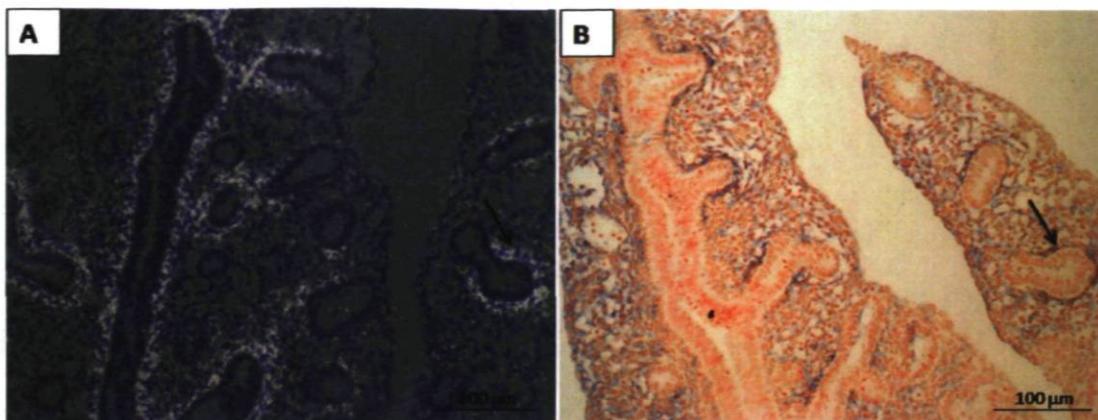


Figure 9 : Hybridation *in situ* au ^{35}S et hybridation *in situ* à la DIG pour α -SMA sur des coupes adjacentes d'un poumon fœtal murin au JG 15.5. A) Marquage obtenu avec la technique à la radioactivité (marquage aux grains d'argent); B) Marquage obtenu avec la technique à la DIG (coloration bleue). Les flèches pointent la même structure pulmonaire sur les deux photos. Grossissement de 200X et une barre erreur de 100 μm .

2. Vérification de la spécificité des sondes par hybridation *in situ* sur des tissus murins contrôlés.

Cette section présente les expériences effectuées afin de valider la spécificité des sondes pour les apolipoprotéines A-I, A-II, C-II, H et la lipoprotéine lipase. Pour ce faire, j'ai effectué des expériences d'hybridation *in situ* sur des tissus murins adultes dont la localisation pour les différents gènes à l'étude est bien connue. Les tissus contrôlés prélevés de souris gestantes sont le foie, le rein et l'intestin.

La figure 11A présente le résultat obtenu pour la validation de la spécificité de la sonde synthétisée pour la détection du messenger de l'apolipoprotéine A-I. Quelques équipes ont étudié les sites majeurs d'expression pour l'apoA-I ^{109, 110}. L'équipe de Lenich et al. ont identifié par Northern blot que l'intestin est un site majeur d'expression chez le rat, le lapin et l'humain. Le foie, un organe important pour le transport et le métabolisme des lipides, n'est pas un site de forte expression de l'apoA-I chez tous les mammifères, seulement chez l'humain. En effet, une étude antérieure réalisée au sein de notre laboratoire nous permet de constater que le foie murin est un site très faible d'expression pour l'apoA-I ⁶⁶. C'est pourquoi j'ai validé la spécificité de ma sonde apoA-I en effectuant une hybridation *in situ* sur des coupes d'intestin et de foie murins. Tel que

rapporté par l'équipe de Peng ¹⁰⁹, le marquage obtenu se retrouve dans les cellules épithéliales de l'intestin (figure 11A) tandis qu'aucun marquage n'a été détecté au niveau du foie (résultat non montré). Les résultats obtenus confirment donc la spécificité de la sonde pour l'apoA-I.

Le foie a été identifié par Northern blot comme étant un site important d'expression de l'apolipoprotéine A-II chez plusieurs espèces tels que le rat, le lapin et l'humain ¹¹⁰. Ce résultat fut validé chez la souris par notre laboratoire grâce à des expériences de QPCR ⁶⁶. L'équipe de Fu et al. ont identifié plus précisément les phénotypes cellulaires exprimant l'apoA-II. Ils ont démontré qu'au niveau du foie, plus la souris est jeune, plus forte est l'expression de l'apoA-II. Elle se localise plus précisément dans les hépatocytes et autour des vaisseaux ¹¹¹. Suite à mon hybridation *in situ*, j'observe le messager de l'apoA-II dans les cellules endothéliales et dans certaines hépatocytes (Figure 11B). Ce résultat confirme donc la spécificité de ma sonde pour l'apolipoprotéine A-II. De plus, une hybridation *in situ* faite sur une coupe d'intestin murin a été effectuée et aucun marquage n'a été détecté (figure 11C) validant ainsi les résultats de QPCR obtenus dans notre laboratoire ⁶⁶.

La figure 11D présente les résultats obtenus suite à une hybridation *in situ* réalisée dans le but de confirmer la spécificité de ma sonde pour l'apolipoprotéine C-II. Quelques études ont été réalisées dans le but de déterminer les sites majeurs d'expression de l'apoC-II. Le foie est un tissu de très forte expression chez la souris, le rat, le lapin et l'humain ^{66, 109, 110}. Comme plusieurs autres apolipoprotéines retrouvées dans le foie, les phénotypes cellulaires exprimant le messager de l'apoC-II sont quelques hépatocytes et les cellules endothéliales ¹¹⁰. Comme il est possible d'observer à la figure 11D, l'apoC-II se localise dans les cellules hépatiques et les cellules endothéliales, ceci confirmant la spécificité de ma sonde. De plus, un tissu exprimant très faiblement l'apoC-II, le rein ⁶⁶, a été ajouté à mon hybridation *in situ* et aucun marquage n'a été observé (résultat non montré).

La figure 11E présente les résultats obtenus suite à l'hybridation *in situ* à la DIG avec la sonde de l'apolipoprotéine H dans le foie murin adulte. Certaines études ont

permis de localiser l'apoH dans des tissus adultes de rat et de souris^{66, 112}. L'équipe de Rasuga et al. ont détecté par Northern blot et par hybridation *in situ* à la DIG le messenger de l'apoH dans plusieurs tissus adultes chez le rat. Leurs résultats de transfert Northern blot démontrent la présence de l'apoH principalement dans le foie, les reins, le cerveau, le cœur et l'intestin grêle. Une hybridation *in situ* a été effectuée afin de déterminer plus précisément les phénotypes cellulaires exprimant l'apoH. Dans le foie de rat, ils observent un marquage prédominant dans les cellules épithéliales du conduit biliaire, les cholangiocytes, et dans certaines hépatocytes¹¹². De plus, une étude antérieure dans notre laboratoire a permis de quantifier l'expression de l'apoH dans certains tissus murins. Dans cette étude, le foie est l'un des principaux sites d'expression de l'apoH mais une expression très faible est détecté au niveau du rein⁶⁶. J'ai donc utilisé le foie comme tissu positif dans la validation de la spécificité de ma sonde pour l'apoH. Comme on le constate à la figure 11E, on localise spécifiquement l'apoH dans les cellules autour du conduit biliaire et dans certaines hépatocytes, comme observé par Rasuga et al. De plus, on a inclus lors de l'hybridation *in situ* des coupes de reins où on n'observe aucun signal (résultat non montré), ce résultat étant en concordance avec l'étude menée par Provost et al⁶⁶. Ces deux résultats permettent de confirmer la spécificité de la sonde pour l'apoH.

Plusieurs études ont permis de localiser l'expression de la lipoprotéine lipase dans des tissus adultes de plusieurs mammifères. L'équipe de Camps et al. ont mesuré l'activité lipolytique de la LPL dans différents tissus du cochon d'inde. Ils ont démontré une forte activité de la LPL dans les tissus adipeux, le cœur, les poumons, le foie et la rate. Des expériences d'hybridation *in situ* ont été pratiquées sur des coupes de foie de cobaye et de rat, permettant ainsi de localiser le messenger de la LPL dans les hépatocytes et les cellules endothéliales^{75, 113}. Comme vous pouvez le constater à la figure 11F, on a localisé spécifiquement l'expression de la LPL dans les cellules endothéliales et certaines hépatocytes. Ces résultats confirment alors la spécificité de la sonde pour la lipoprotéine lipase. La figure 11G présente le résultat du contrôle de la sonde pour la LPL (sonde sens). De plus, la coupe de l'intestin grêle lors de mes manipulations ne présente aucun marquage pour la LPL (résultat non montré). Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par l'étude de QPCR de notre laboratoire⁶⁶.

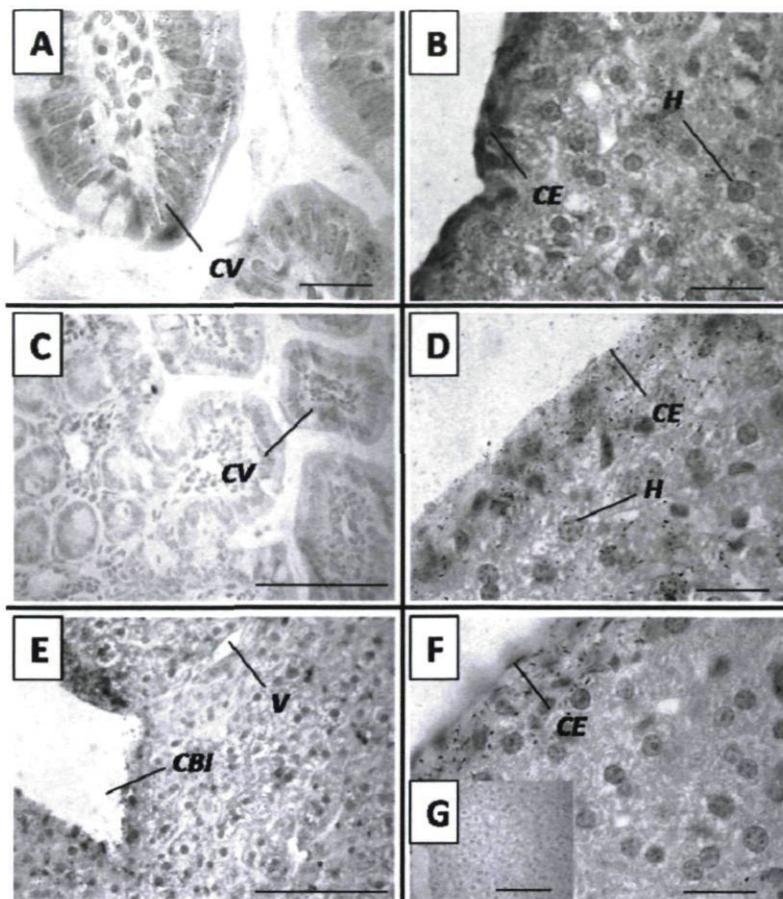


Figure 10 : Distribution des messagers de l'apolipoprotéine A-I, A-II, C-II, H et la lipoprotéine lipase sur des coupes de foie, de rein et de l'intestin grêle de souris adulte. A) ApoA-I sur une coupe d'intestin grêle B) ApoA-II sur une coupe de foie C) ApoA-II sur une coupe d'intestin grêle D) ApoC-II sur une coupe de foie E) ApoH sur une coupe de foie F) LPL sur une coupe de foie avec G) son contrôle négatif (sonde sens). Le marquage positif (bleu). Un grossissement, 400X (C, E et G) avec une barre d'erreur de 100 μm ou de 1000X (A, B, C, D et F) avec une barre d'erreur de 20 μm . **CBI** : conduit biliaire, **CE** : cellule endothéliale, **CV** : core de villi, **H** : hépatocyte et **V** : vaisseau.