

**Université de Sherbrooke**

**ONTOGÉNÈSE ET MÉCANISMES DE RÉGULATION DE LA  
SYNTHÈSE DE LA LIPASE DANS L'ESTOMAC HUMAIN**

par

**Eric Tremblay**

Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
**philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire**

**octobre 1997**

© droits réservés de Eric Tremblay 1997.

**TABLE DES MATIÈRES**

<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	iii
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	viii
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS</b>	x
<b>RÉSUMÉ</b>	
<b>I. INTRODUCTION</b>	1
A) Sommaire	1
B) Morphogénèse de l'estomac foetal humain	2
C) Différenciation de l'épithélium gastrique humain	3
D) La lipase gastrique	6
1. Caractéristiques et rôles	6
2. Localisation et distribution de la lipase gastrique	8
3. Ontogénèse de l'activité de la lipase gastrique	9
4. Régulation de l'expression de la lipase gastrique	10
E) Le modèle de culture organotypique	11
F) Modulateurs du développement	12
1. Le facteur de croissance épidermique (EGF)	12
2. Le système des facteurs de croissance insuliniques	13
G) Plan expérimental de la thèse	16

<b>II. MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>18</b>
<b>A) Modèle utilisé: tissus foetaux</b>	<b>18</b>
1. Ontogénèse	18
2. Études in vitro	19
2.1 Culture organotypique	19
2.1.1 Préparation à la mise en culture	19
2.1.2 Mise en culture	19
<b>B) Immunolocalisation de la lipase gastrique</b>	<b>20</b>
1. Immunofluorescence indirecte	20
2. Immunocytochimie à l'or colloïdal	22
<b>C) Études des modulateurs du développement</b>	<b>23</b>
1. Paramètres étudiés	23
1.1 Immunolocalisation des récepteurs	23
1.2 Effets des modulateurs sur la synthèse d'ADN	24
1.2.1 Dosage des protéines	25
1.2.2 Concentrations des modulateurs utilisés	25
1.3 Autoradiographie	26
1.4 Effets des modulateurs sur la synthèse des glycoprotéines	27
1.5 Dosages des activités enzymatiques	27
1.5.1 La lipase gastrique	27
1.5.2 La pepsine	29

<b>D) Études par les techniques d'immunobuvardage</b>	<b>30</b>
1. Immunobuvardage avec ligand (FarWestern-Blot)	30
1.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide- dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE)	30
1.2 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	31
1.3 Immunodétection par chemiluminescence	32
2. Analyse par immunobuvardage	33
<b>E) Études sur la régulation de l'expression de la lipase gastrique</b>	<b>33</b>
1. Extraction de l'ARN	33
2. Synthèse d'ADN complémentaire (cDNA)	34
3. Amplification par PCR du cDNA de la lipase gastrique	35
4. Clonage du cDNA de la lipase gastrique	35
4.1 Isolation du produit d'amplification par PCR	35
4.2 Insertion du cDNA dans un vecteur d'expression et transformation des bactéries	36
4.3 Analyse des clones	37
4.4 Séquençage du cDNA de la lipase gastrique	39
4.5 Préparation de la sonde de cDNA	39
5. Analyse par hybridation de type Northern	40
5.1 Électrophorèse sur gel d'agarose-formaldéhyde	40
5.2 Transfert de l'ARN sur membrane de nylon	41
5.3 Hybridation de la sonde de DNA	41

---

<b>III. RÉSULTATS</b>	<b>42</b>
A) Immunolocalisation de la lipase gastrique	42
1. Spécificité de l'anticorps utilisé	42
2. Localisation de la lipase gastrique par immunofluorescence indirecte	42
3. Localisation subcellulaire de la lipase gastrique	46
B) Effet de EGF sur la modulation du développement	48
1. Localisation du récepteur EGF	48
2. Effet de EGF sur la synthèse d'ADN	50
3. Effet de EGF sur la synthèse des glycoprotéines	50
4. Effet de EGF sur les activités enzymatiques	53
C) Effets des IGFs et de l'insuline dans la modulation du développement	55
1. Localisation des récepteurs de IGF-1 et de l'insuline	55
2. Effets des IGFs et de l'insuline sur la synthèse d'ADN	57
3. Autoradiographie et index de marquage	57
4. Effets des IGFs et de l'insuline sur les activités enzymatiques	60
D) Synthèse et sécrétion des IGFs par l'estomac foetal humain	64
1. Synthèse et sécrétion des IGFs	64
2. Capacité de liaison des IGFs	66
E) Régulation de l'expression de la lipase gastrique humaine	69
1. Profil ontogénique de l'expression de la lipase	69
2. Régionalisation de l'expression de la lipase	74
3. Expression de la lipase en culture	76

4. Expression de la lipase gastrique en fonction du temps de culture	78
5. Effet de EGF sur l'expression de la lipase gastrique	78
<b>IV. DISCUSSION</b>	<b>82</b>
A) Localisation de la lipase gastrique	82
B) Effet de EGF sur la modulation du développement	83
C) Le système des IGFs dans la muqueuse gastrique	89
1. Effets des IGFs et de l'insuline dans la modulation du développement	89
2. Synthèse et sécrétion des IGFs	93
D) Régulation de l'expression de la lipase gastrique humaine	95
1. Profil ontogénique de l'expression de la lipase gastrique	95
2. Expression de la lipase gastrique en culture	97
3. Effet de EGF sur l'expression de la lipase gastrique	99
<b>V. CONCLUSIONS</b>	<b>102</b>
<b>VI. REMERCIEMENTS</b>	<b>110</b>
<b>VII. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>112</b>
<b>VIII. ANNEXE</b>	<b>130</b>
1. Liste des publications	
2. Liste des communications	

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: acide déoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ATP: adénosine triphosphate

BSA: ("bovine serum albumin") albumine sérique de boeuf

CK-18: cytokératine-18

cDNA: acide déoxyribonucléique complémentaire

Ci: Curie

°C: degré Celsius

CTP: cytosine triphosphate

EGF: (Epidermal growth factor) Facteur de croissance épidermique

FITC: fluorescéine isothiocyanate

GTP: guanosine triphosphate

h: heure

IGF: (insulin-like growth factor) facteur de croissance insulinique

IGFBP: (IGF binding protein) protéine liant les IGFs

M: molaire

min: minute

ml: millilitre

mM: millimolaire

mmol: millimoles

mg: milligramme

ng: nanogramme

nm: nanomètre

PCR: (polymerase chain reaction) réaction en chaîne par la polymérase

PBS: (Phosphate Buffered Saline) tampon phosphate salin

RT: transcriptase inverse

SDS: dodécylsulfate sodique

SDS-PAGE: gel d'électrophorèse sur gel polyacrylamide-dodécylsulfate sodique

TTP: thymidine triphosphate

μl: microlitre

μmol: micromole

U: unité

---

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Immunobuvardage contrôle de la lipase gastrique	45
Figure 2. Immunolocalisation de la lipase gastrique	47
Figure 3. Expression et distribution du récepteur EGF dans la muqueuse gastrique en développement	49
Figure 4. Effet de EGF sur la synthèse d'ADN	51
Figure 5. Effet de EGF sur la synthèse des glycoprotéines	52
Figure 6. Effet de EGF sur les fonctions gastriques	54
Figure 7. Expression et distribution des récepteurs IGF-1 et de l'insuline dans la muqueuse gastrique en développement	56
Figure 8. Effets des IGFs et de l'insuline sur la synthèse d'ADN	58
Figure 9. Autoradiographie de l'incorporation de thymidine tritiée induite par IGF-1 dans la muqueuse gastrique	59
Figure 10. Effets des IGFs sur l'activité de la lipase gastrique	61
Figure 11. Effets des IGFs sur l'activité de la pepsine	62
Figure 12. Profils de synthèse et de sécrétion des IGFs par l'estomac foetal en culture	63
Figure 13. Évaluation de la capacité de liaison des IGFs aux IGFs dans l'estomac	65
Figure 14. Amplification du cDNA de la lipase gastrique par RT-PCR	67

Figure 15. Évaluation de l'expression de la lipase gastrique par hybridation Northern	68
Figure 16. Profil ontogénique de l'expression de la lipase	70
Figure 17. Répartition topographique de l'expression de la lipase gastrique dans l'estomac	71
Figure 18. Expression de la lipase gastrique en culture	72
Figure 19. Expression de la lipase gastrique en fonction du temps en culture	73
Figure 20. Effet de EGF sur l'expression de la lipase en culture	75
Figure 21. Effet de EGF sur l'expression de la lipase en explantation directe	77
Figure 22. Effet de EGF sur l'activité de la lipase en explantation directe	79

**ONTOGÉNÈSE ET MÉCANISMES DE RÉGULATION DE LA SYNTHÈSE  
DE LA LIPASE DANS L'ESTOMAC HUMAIN**

par

**Eric Tremblay**

Thèse présentée à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec.

**RÉSUMÉ**

L'objectif global du présent travail était d'identifier des modulateurs et d'établir leurs mécanismes de régulation, tant au niveau cellulaire que moléculaire, du développement fonctionnel de la muqueuse gastrique foetale humaine, et en ce qui a trait plus particulièrement à la lipase gastrique. En effet, dès la naissance la lipase gastrique joue un rôle primordial dans la digestion des lipides, et ce dû à l'absence de la lipase pancréatique. Par conséquent, le développement normal des capacités digestives étant essentiel pour une digestion et une absorption normale des nutriments, il est important de bien comprendre la nature des mécanismes de régulation impliqués dans la modulation du développement des fonctions digestives lors de la différenciation de l'épithélium gastrique.

Dans un premier temps, nous avons analysé le patron de distribution de la lipase gastrique dans les différentes régions anatomiques de l'estomac

au cours du développement. Nous avons mis en évidence que le patron de distribution de l'enzyme que l'on retrouve chez l'adulte est déjà établi à la 13<sup>ème</sup> semaine de gestation dans la muqueuse gastrique foetale. Cette apparition précoce ainsi que ce patron d'expression adulte de la lipase supportent l'hypothèse de son rôle nutritionnel important à la naissance. De plus, nous avons montré que la lipase est localisée dans les granules de sécrétion des cellules principales de l'épithélium gastrique en développement.

Dans un second volet, nous avons établi la capacité de facteur de croissance épidermique (EGF) à moduler le développement de la muqueuse gastrique humaine. Nos résultats ont démontré que EGF module la prolifération cellulaire de l'épithélium gastrique ainsi que la synthèse des glycoprotéines et l'activité de la lipase. De plus, nous avons révélé que les effets de ce facteur de croissance sont médiés par la présence d'un récepteur spécifique à EGF localisé à la membrane basolatérale des cellules épithéliales. Par conséquent, ces observations ont montré que EGF est un modulateur important du développement fonctionnel de la muqueuse gastrique humaine.

Dans un troisième volet, nous nous sommes intéressés à l'insuline et aux facteurs de croissance insuliniques (IGFs) sur la modulation du développement de l'estomac. Nous avons observé la présence de récepteurs spécifiques à IGF-1 et à l'insuline qui sont localisés dans la portion basolatérale des cellules épithéliales gastriques. Nous avons établi

que les IGFs, mais non l'insuline, influencent le développement de la muqueuse gastrique. En effet, nous avons constaté que les IGFs modulent de façon similaire la lipase gastrique mais que seul IGF-1 stimule la prolifération cellulaire. Par ailleurs, nous avons démontré que la muqueuse gastrique foetale humaine est une source endogène de IGFBPs (Insulin-like Growth Factor Binding Proteins), et qu'elles possèdent la capacité de lier les IGFs, indiquant la possibilité d'interactions entre les IGFBPs et les IGFs dans la modulation du développement de la muqueuse gastrique.

Enfin, nous avons initié des études sur les mécanismes de régulation de la synthèse de la lipase gastrique, afin d'établir à quel niveau de contrôle l'expression de la lipase est soumise. Nous avons montré la présence d'une corrélation entre l'augmentation graduelle des niveaux d'expression de la protéine et de son messenger lors du développement, indiquant que l'expression de la lipase est régulée au niveau de l'ARNm dans l'épithélium gastrique. De plus, nous avons montré que EGF induit une diminution de l'expression de l'ARNm de la lipase en culture. Ces observations établissent que EGF est le premier facteur de croissance connu qui affecte l'expression de l'ARNm de la lipase gastrique.

Notre travail a permis d'identifier EGF, IGF-1 et IGF-2 comme des modulateurs importants du développement fonctionnel de l'estomac, et suggèrent une implication directe de ces derniers dans la maturation de l'épithélium gastrique humain in vivo.

## **I. INTRODUCTION**

### **A) Sommaire**

Une fonction digestive adéquate est essentielle pour une bonne croissance et un développement normal. Notre connaissance du développement de la capacité digestive du tractus gastrointestinal humain a progressé de façon significative au cours des dernières décennies. Toutefois les mécanismes de régulation du développement fonctionnel du système digestif humain demeurent à être précisés.

L'estomac joue un rôle important dans la digestion, et plus particulièrement dans la digestion des lipides grâce à la lipase gastrique (Hamosh, 1990). Cette fonction devient encore plus importante dans des conditions d'insuffisance pancréatique physiologique ou pathologique. Ces conditions se produisent normalement dans la période postnatale, lorsque la fonction exocrine du pancréas n'est pas encore bien développée (Lee et al., 1993), ou spécialement dans le cas de maladies qui affectent la fonction pancréatique telle la fibrose kystique ou l'alcoolisme chronique (Abrams et al., 1984 et 1987). Dans toutes ces conditions, la digestion des lipides est assumée principalement par l'activité de la lipase gastrique (Gargouri et al., 1986), d'où l'importance de bien comprendre les mécanismes de régulation de son développement et de son expression.

L'utilisation du modèle animal, particulièrement les rongeurs, a permis d'identifier des modulateurs du développement morphologique et fonctionnel de la muqueuse gastrique. Cependant pour étudier le développement de la lipase gastrique, ces modèles nous sont d'aucune utilité puisqu'ils ne possèdent pas de lipase gastrique mais une lipase d'origine linguale (Hamosh, 1990). La mise au point de la méthode de culture organotypique d'explants foetaux humains nous offre la possibilité d'étudier l'action de différents régulateurs sur le développement de l'estomac humain, et plus particulièrement l'étude des mécanismes de régulation spécifiques de la synthèse de la lipase gastrique.

#### B) Morphogénèse de l'estomac foetal humain

Le développement de la muqueuse gastrique humaine se produit très tôt au cours de la vie foetale contrairement aux rongeurs. A la 8<sup>ème</sup> semaines de gestation, l'épithélium gastrique humain est encore peu développé. Celui-ci est stratifié ou pseudo-stratifié et composé presque exclusivement de cellules indifférenciées (Salenius, 1962; Lipkin, 1985; Ménard et Arsenault, 1990). Une caractéristique de ces cellules indifférenciées est la quantité importante de glycogène occupant les régions infra- et supra-nucléaires. La morphogénèse des glandes gastriques est initiée à la 10-11<sup>ème</sup> semaine de gestation et se traduit par la mise en place d'un épithélium simple cylindrique et par l'apparition des premières structures glandulaires, soit les petits

bourgeoisements épithéliaux au sein du mésenchyme (Deren ,1971; Lipkin, 1985). Les glandes vont croître à partir des bourgeons épithéliaux pour atteindre le double de leur hauteur à la 16<sup>ème</sup> semaine. Cette augmentation de la croissance glandulaire est corrélée par une forte prolifération cellulaire épithéliale (Ménard et Arsenault, 1990).

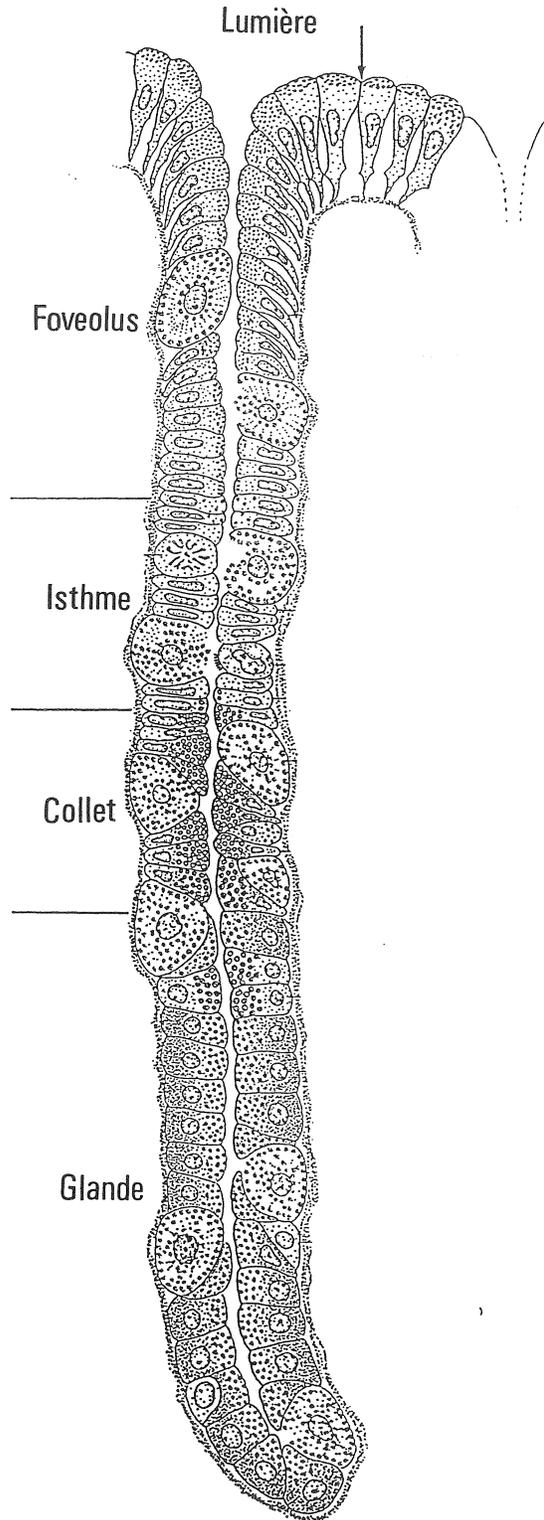
Chez l'adulte, la zone de prolifération cellulaire est confinée à une région spécifique de la glande gastrique, soit à la jonction de l'épithélium de surface et de l'épithélium glandulaire et est appelée l'isthme (Deren, 1971; Helander, 1981; Lipkin, 1985; Lehy, 1985). Au cours du développement, la zone de prolifération de la structure foveolus/glande est déjà localisée dans la région de l'isthme et du collet des glandes, tel qu'observé dans la muqueuse adulte (Ménard et Arsenault, 1990).

### C) Différenciation de l'épithélium gastrique humain

Chez l'adulte, la muqueuse gastrique est revêtue d'un épithélium simple qui se renouvelle et se différencie continuellement selon une séquence bien établie. Ce processus de renouvellement cellulaire est rapide ( $\approx 5$  jours chez l'humain) et s'effectue le long d'une unité morphologique particulière, soit l'axe foveolus/glande (Helander, 1981). Cette unité est divisée en cinq régions distinctes: l'épithélium de surface, le foveolus, l'isthme, le collet et la glande (voir schéma, page suivante). Parmi ces différentes régions, deux populations cellulaires sont retrouvées: a) les

cellules souches ainsi que les cellules prolifératrices et/ou immatures de l'isthme (Karam et Leblond, 1993a), et b) les cellules épithéliales différenciées que l'on retrouve dans les régions de l'épithélium de surface, du foveolus, et de la glande (Salenius, 1962; Rubin et al., 1968). Les cellules souches pluripotentes et indifférenciées sont localisées dans la région de l'isthme et constituent la source du renouvellement cellulaire de l'épithélium (Helander, 1981; Karam et Leblond, 1993a). Celles-ci prolifèrent et génèrent des cellules filles qui, par la suite vont migrer et se différencier le long de l'axe foveolus/glande. Contrairement à l'intestin, les cellules filles à la sortie de la zone de prolifération peuvent migrer dans deux directions, soit de façon ascendante ou descendante (Karam et Leblond, 1993b, c et d). L'une ou l'autre des voies de migration prises par la cellule a un impact direct sur la détermination de la différenciation. À la sortie de l'isthme, les cellules sont engagées dans les processus complexes de la différenciation menant au développement des divers types cellulaires épithéliaux de l'estomac (Karam et Leblond, 1993a à 1993e). Nous retrouvons plusieurs types cellulaires qui composent l'épithélium gastrique: a) les cellules à mucus de surface et/ou du collet, b) les cellules pariétales, qui sécrètent l'acide chlorhydrique, c) les cellules principales ou zymogènes, qui produisent la lipase et le pepsinogène, et enfin d) les cellules endocrines (Salenius, 1962; Rubin et al., 1968; Helander, 1981). Finalement, lorsque les cellules épithéliales matures pleinement différenciées arrivent à la surface ou dans le fonds des glandes, celles-ci montrent des signes de dégénérescence et sont exfoliées ou encore

Schéma : Glande gastrique



phagocytées (surtout dans le fonds des glandes), laissant ainsi la place aux cellules qui suivent (Karam et Leblond, 1993d et e). Par ailleurs, les processus dynamiques de prolifération, de migration, de différenciation et d'exfoliation observés à l'intérieur de l'unité fonctionnelle de l'estomac ont donné naissance à un modèle de "filiation cellulaire" lors du renouvellement de l'épithélium (Karam et Leblond, 1993e). Ce modèle de filiation cellulaire (cellule pluripotente → cellule partiellement différenciée → cellule pleinement différenciée) est défini par les diverses propriétés morphologiques et fonctionnelles typiques aux cellules épithéliales matures des foveolae et des glandes.

Cependant, un signe indéniable d'une cellule épithéliale gastrique mature pleinement différenciée est l'expression des propriétés fonctionnelles qui lui sont propres. Au niveau gastrique, il existe des hydrolases que l'on retrouve associées exclusivement aux granules de sécrétion des cellules principales (Moreau et al., 1989), soit le pepsinogène, responsable de l'hydrolyse de protéines, et la lipase gastrique, responsable de la digestion des triglycérides. Ces enzymes qui sont exprimées spécifiquement par les cellules principales en font des marqueurs de choix de la différenciation gastrique.

## D) La lipase gastrique

### 1. Caractéristiques et rôle

La lipase gastrique humaine est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 379 acides aminés possédant un poids moléculaire apparent de 49 000 daltons tel que déterminé par SDS-PAGE (Bodmer et al., 1987). Toutefois, le poids moléculaire estimé selon la séquence d'acides aminés déduite d'après le cDNA est d'environ 43 162 sans glycosylation (Bodmer et al., 1987). La lipase gastrique est active à un pH optimal situé entre 3.0 et 7.0 chez l'adulte, et entre 3.0 et 5.5 chez l'enfant (Hamosh et al., 1981). A ces pHs, la lipase pancréatique a une très faible activité (pH optimal 6.5 à 8.5). De plus, la lipase gastrique ne nécessite pas la présence de sels biliaires ou de co-facteurs pour fonctionner comparativement à la lipase pancréatique, ce qui est beaucoup plus avantageux pour la lipolyse gastrique (Hamosh, 1990). La lipase gastrique présente une spécificité de substrat. En effet, la lipase hydrolyse plus facilement les triglycérides à chaînes courtes que ceux à chaînes longues (Hamosh, 1990).

Le rôle de la lipase gastrique est d'initier l'hydrolyse des triglycérides dans l'estomac. En présence des fonctions pancréatiques normales, il a été démontré que les produits d'hydrolyse de la lipase gastrique (acides gras libres et monoglycérides) facilitent l'hydrolyse subséquente des triglycérides par la lipase pancréatique (Gargouri et al., 1986). Cependant, en conditions

d'insuffisance pancréatique dites physiologique (enfants nés prématurément ou à terme) et pathologique (fibrose kystique ou alcoolisme chronique), l'importance de la lipolyse gastrique devient cruciale et assume un rôle important dans la digestion des triglycérides de la diète (Abrams et al., 1987; Hamosh et al., 1981).

Prenons le cas d'un enfant nouveau-né dont la principale source énergétique est le lait maternel ou encore une formule substituée. La lipase pancréatique peut hydrolyser les triglycérides du lait, mais la présence de sels biliaires et d'un co-facteur sont nécessaires pour la dispersion des produits lipolytiques (Cohen et al., 1971). De plus, la membrane des globules du lait qui est composée de phospholipides, de cholestérol et de protéines est résistante à l'action de la lipase pancréatique (Cohen et al., 1971). L'hydrolyse de globules du lait est initiée par la lipase gastrique et facilite celle de la lipase pancréatique (Bernbäck et al., 1989, 1990). Cependant, au cours de la période foetale et néonatale la synthèse de sels biliaires ainsi que celle de la lipase pancréatique est très faible ou même inexistante (Watkins, 1975), d'où l'importance du rôle compensatoire de la lipase gastrique.

Dans d'autres cas comme la fibrose kystique et l'alcoolisme chronique nous retrouvons souvent comme symptômes l'insuffisance pancréatique (Abrams et al., 1984, 1987). Toutefois, malgré l'absence de lipase pancréatique, 50% des triglycérides sont absorbés. Cette lipolyse partielle

en absence de lipolyse pancréatique est attribuée à l'action de la lipase gastrique (Abrams et al., 1984; Gargouri et al., 1986; Moreau et al., 1987).

## 2. Localisation et distribution de la lipase gastrique

La localisation et la distribution de l'activité de la lipase gastrique dans l'estomac adulte ont été établies (Abrams et al., 1988; Moreau et al., 1988). Tout d'abord, l'activité de la lipase (dans des biopsies ou des spécimens chirurgicaux d'estomac humain) ne varie pas entre l'âge de 20 et 60 ans. Cependant une légère diminution de l'activité est détectée après 60 ans (Abrams et al., 1988). Dans cette même étude, les auteurs ont déterminé le patron de distribution de l'enzyme dans l'estomac et ont observé un gradient décroissant de l'activité lipolytique allant du fundus vers l'antrum pylorique. Parallèlement, un autre groupe a également établi que l'activité de la lipase déterminée dans des biopsies gastriques humaines ne varie pas entre l'âge de 3 mois à 26 ans (Moreau et al., 1988).

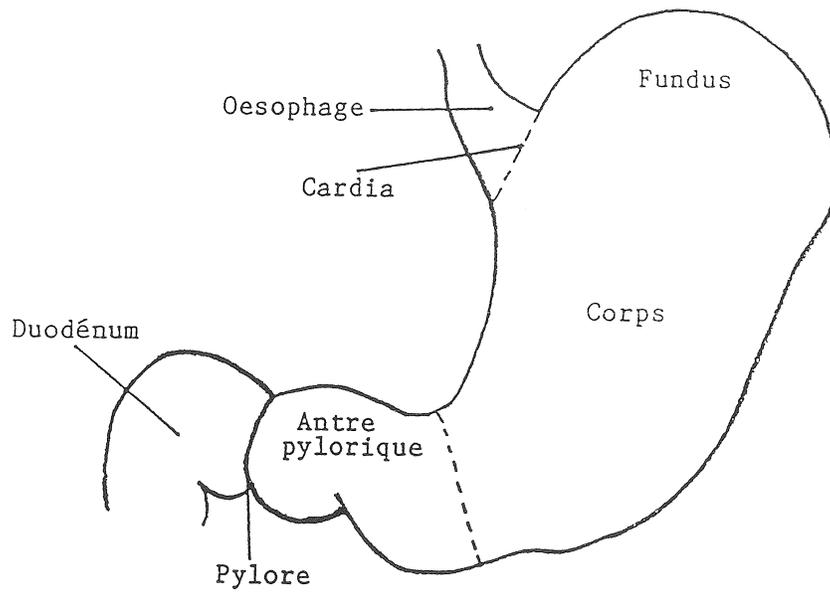
La localisation cellulaire de la lipase dans l'épithélium gastrique a été déterminée par l'équipe de Verger (Moreau et al., 1989) au moyen de l'immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la lipase gastrique humaine. Dans des tissus gastriques humains adultes, ce groupe a déterminé que la lipase est localisée dans la partie apicale des cellules principales (probablement dans les granules de sécrétion). Dans la même étude, ces auteurs ont également montré une colocalisation du

pepsinogène et de la lipase dans le cytoplasme des cellules principales, suggérant que les deux enzymes pourraient être emmagasinés dans les mêmes granules de sécrétion. Cependant, si la sécrétion de la lipase et de la pepsine sont soumis aux mêmes mécanismes de régulation demeurent inconnus.

### 3. Ontogénèse de l'activité de la lipase gastrique

Récemment, deux groupes se sont intéressés à la présence et à la distribution des activités de la pepsine et de la lipase durant l'ontogénèse de la muqueuse gastrique humaine (Lee et al., 1993; Ménard et al., 1995). Tout d'abord, Lee et al. (1993) ont montré qu'une activité lipolytique était présente dans les aspirats gastriques d'enfants nés prématurément entre 26 et 40 semaines de gestation. Toutefois, l'origine de cette activité présente dans l'estomac demeurait incertaine. L'autre étude menée par Ménard et al. (1995) est venue confirmer l'origine de l'activité lipolytique présente dans l'estomac, en plus d'établir les patrons de développement des activités de la lipase et de la pepsine. En effet, les auteurs ont démontré dans des estomacs foetaux humains que l'activité de la lipase gastrique est déjà présente à la 10<sup>ème</sup> semaine de gestation et qu'elle augmente progressivement jusqu'à la 20<sup>ème</sup> semaine atteignant 30% de la valeur moyenne de l'activité de la lipase chez l'adulte. De plus, le patron de distribution que l'on retrouve chez l'adulte, c'est-à-dire un gradient

Schéma 2 : Régions anatomiques de l'estomac



décroissant allant du fundus vers l'antrum pylorique, est déjà établie à la 16<sup>ème</sup> semaine. Parallèlement, l'activité de la pepsine est déjà présente aussi, mais ne varie pas au cours de la même période étudiée. Ces études ont démontré que l'activité lipolytique présente dans les aspirats gastriques était bel et bien d'origine gastrique. De plus, Ménard et al. (1995) ont montré, dans des explants gastriques foetaux humains cultivés pendant 24 heures, que l'activité totale de la lipase (tissu + milieu) augmentait considérablement. Les auteurs ont mis en évidence une très forte sécrétion de l'enzyme dans le milieu, mais une baisse de l'activité dans les tissus comparé aux tissus non cultivés. Ces résultats illustraient que l'activité lipolytique retrouvée dans les aspirats gastriques (Lee et al., 1993) n'était pas nécessairement représentative de l'activité présente dans les tissus.

#### 4. Régulation de l'expression de la lipase gastrique humaine

Plusieurs études sur les mécanismes de sécrétion de la lipase gastrique ont été réalisées chez le lapin (Fink et al., 1985), le chien (Carrière et al., 1992) et l'humain (DeNigris et al., 1985). Ces travaux ont permis d'identifier le cholécystokinine-8 et la carbamylcholine comme deux excellents sécrétagogues de la lipase. De plus chez l'humain, il a été démontré que les lipides de la diète augmentent l'activité de la lipase dans le jus gastrique (Armand et al., 1995). Toutefois, à notre connaissance, aucune

donnée n'existe sur les mécanismes de régulation de l'expression de la lipase gastrique. Même après le clonage du cDNA de la lipase gastrique par Bodmer et al. (1987), aucune étude sur des modulateurs possibles de la synthèse de la lipase n'est rapportée dans la littérature.

#### E) Le modèle de culture organotypique

Pour des raisons évidentes d'éthique, les études portant sur la caractérisation des modulateurs impliqués dans le développement doivent s'effectuer *in vitro* chez l'humain. Le problème majeur de la culture organotypique avec des biopsies d'estomac adulte est la sécrétion de HCl. Cette production de HCl nuit à la viabilité, l'intégrité et à la stabilité fonctionnelle du tissu qui ne survit que de 6 à 24 h en culture (Donaldson et Kapadia, 1980).

Toutefois, le problème de la sécrétion de HCl ne s'applique pas chez le fœtus humain. En effet, bien que les cellules pariétales contiennent très tôt du HCl (Nomura, 1965; Salenius, 1962) celui-ci ne sera sécrété qu'après la naissance (Grand et al., 1976). La méthode de culture organotypique pour des explants gastriques fœtaux humains a été mise au point par Ménard et al. (1993) et a permis la préservation morphologique et physiologique des explants jusqu'à 15 jours. Avec cette méthode de culture, l'architecture glandulaire, la morphologie et l'ultrastructure des différents types cellulaires, la prolifération cellulaire et les fonctions physiologiques générales (synthèse

protéique et glycoprotéique) sont maintenues pendant 15 jours. L'avantage de cette technique est l'utilisation d'un milieu de culture Leibovitz L-15 qui ne nécessite pas l'emploi de sérum, donc qui est complètement défini et permet d'étudier l'effet d'hormones et de facteurs de croissance spécifiques.

## F) Modulateurs du développement

### 1. Le facteur de croissance épidermique (EGF)

Notre compréhension des mécanismes de régulation de la différenciation épithéliale gastrique origile principalement d'études ayant été effectuées chez les rongeurs (Johnson, 1985). Sur la base d'expériences *in vivo* et *in vitro*, plusieurs hormones et facteurs de croissance, tels les glucocorticoïdes (Neville et al., 1976), la thyroxine (Kumegawa et al., 1978) et l'EGF (Dembinski et Johnson, 1985; Arsenault et Ménard, 1987) ont été proposés pour être impliqués dans le développement gastrique. En effet, il a été démontré que les glucocorticoïdes inhibent la prolifération des cellules épithéliales gastriques (Tsukada et al., 1994), alors que EGF stimule la synthèse d'ADN dans l'estomac (Dembinski et Johnson, 1985; Arsenault et Ménard, 1987). De plus, d'autres travaux ont montré que la thyroxine (Kumegawa et al., 1978) et l'hydrocortisone (Tsukada et al., 1994) augmentent l'activité du pepsinogène chez les rongeurs. Cependant, l'implication possible de ces hormones ou facteurs de croissance dans le

mécanisme régulateur du développement de l'estomac humain demeure à être établie.

L'EGF, un des facteurs de croissance le mieux caractérisé depuis sa découverte par Cohen (1960), est connu pour son implication dans la physiologie gastrique. En effet, EGF est impliqué dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse gastrique par ses effets sur la protection (Olsen et al., 1984), sur les processus de réparation et de guérison (Konturek et al., 1991) ainsi que sur l'inhibition de la sécrétion d'acide gastrique (Konturek et al., 1989; Finke et al., 1985). Il a été montré que EGF stimule la prolifération cellulaire dans la muqueuse gastrique de rat (Dembinski et Johnson, 1985) et de souris (Arsenault et Ménard, 1987), suggérant qu'il pourrait être un acteur important dans le développement foetal gastrique. De plus, l'expression du récepteur EGF a été rapportée dans la muqueuse gastrique foetale humaine par des études immunocytochimiques (Hormi et Lehy, 1994). Cependant, son rôle au niveau de la muqueuse gastrique foetale humaine n'est pas connu.

## 2. Le système des facteurs de croissance insuliniques ("IGFsystem")

Les IGFs (IGF-1 et IGF-2) sont des polypeptides qui partagent une grande homologie avec la proinsuline en regard de leur séquence d'acides aminés, leur structure et leur activité biologique (Humbel, 1990; Rotwein, 1991; Cohick et Clemmons, 1993; Jones et Clemmons, 1995). Les IGFs qui

sont largement exprimés dans les tissus foetaux et embryonnaires (Stewart et Rotwein, 1996) sont également de puissants mitogènes et des facteurs de croissance stimulant la différenciation. L'importance de leurs rôles dans la régulation de la croissance foetale et le développement a été fortement mise en évidence par la démonstration du retard de croissance foetale avec ou sans léthalité néonatale chez les souris portant des mutations défectives des gènes de IGF-1, IGF-2 ou du récepteur de IGF-1 (Liu et al., 1993; Baker et al., 1993). Dans la circulation comme dans les fluides extracellulaires, les IGFs sont liés aux "*IGF binding proteins*" (IGFBPs), une famille constituée de 7 protéines distinctes, nommées IGFBP-1 à -7, qui ne possèdent aucune homologie de séquence avec les récepteurs des IGFs (Oh et al., 1996; Rechler, 1993). On reconnaît plusieurs rôles aux IGFBPs: a) augmentation du temps de demi-vie des IGFs, b) acheminement des IGFs aux tissus cibles et c) modulation des actions biologiques des IGFs (Rechler, 1993; Baxter, 1994) qui est probablement la fonction la plus importante.

En plus de se lier aux IGFBPs, les IGFs se lient à deux récepteurs spécifiques, soit le récepteur de type I (que nous désignerons le récepteur IGF-1) et le récepteur de type II (désigné le récepteur IGF-2). Le récepteur IGF-1 s'est révélé être relié au récepteur de l'insuline; les deux sont des protéines hétérotétramériques comprenant deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  reliés par des ponts disulfures qui contiennent un domaine intracellulaire tyrosine kinase (DeMeyts, 1994). L'affinité du récepteur IGF-1 pour IGF-2 est de 2 à 15 fois plus faible que pour IGF-1, dépendant du type cellulaire étudié et des

conditions de l'essai de liaison (Steele et al., 1988; Germain et al., 1992). Le récepteur IGF-2 est identique au récepteur du mannose-6-phosphate cation-dépendant, impliqué dans le transport des enzymes lysosomiaux au compartiment endosomal (Morgan et al., 1987). Quoiqu'il y ait deux récepteurs distincts pour les IGFs, on pense que les actions biologiques des IGFs sont médiées seulement via le récepteur IGF-1 (Jones et Clemmons, 1995).

Plusieurs évidences suggèrent que le système des IGFs et l'insuline pourraient être impliqués dans le développement foetal gastrique. En effet, il a été rapporté que dans le foetus humain, les cellules mésenchymateuses gastriques synthétisent les ARN messagers des IGFs (Han et al., 1987, 1988), alors que les cellules épithéliales expriment ceux des IGFBP-2 à -6 (Han et al., 1996). De plus, les deux récepteurs spécifiques de IGF-1 et de l'insuline ont été mis en évidence au niveau épithélial tout le long du tube digestif chez les rongeurs (Sodoyez-Goffaux et al., 1985; Laburthe et al., 1988; Termanini et al., 1990; Heinz-Erian et al., 1991). De plus, des études sur des cellules épithéliales gastriques de chien ont montré que IGF-1 et l'insuline sont des facteurs mitogéniques pour ces cellules (Chen et al., 1991). Toutes ces observations suggèrent que les IGFs et l'insuline pourraient être impliqués dans le développement de la muqueuse gastrique foetale humaine.

### G) Plan expérimental de la thèse

Dans le but d'établir les mécanismes de régulation du développement fonctionnel de la muqueuse gastrique foetale humaine, nous nous sommes engagés dans l'analyse des effets potentiels de différents facteurs de croissance sur le développement fonctionnel de l'estomac foetal humain à l'aide du modèle de culture organotypique, avec une emphase particulière sur la synthèse de la lipase gastrique au cours du développement.

Dans un premier volet, nous avons déterminé la localisation cellulaire et la distribution de la lipase gastrique au cours du développement (13 à 20 semaines de gestation) afin de corrélérer l'expression de la protéine avec les niveaux d'activités dans les différentes régions de l'estomac précédemment rapportés (Ménard et al., 1995).

Dans un second temps, nous avons vérifié l'hypothèse de l'implication de l'EGF dans le développement fonctionnel de la muqueuse gastrique humaine suite aux effets rapportés chez les rongeurs. Tout d'abord nous avons déterminé si la muqueuse gastrique exprimait les récepteurs de EGF, et par la suite nous avons étudié l'influence de EGF sur la synthèse d'ADN, la synthèse des glycoprotéines et les activités enzymatiques (lipase/pepsine) dans des explants gastriques foetaux en culture.

Dans un troisième volet, nous avons vérifié notre hypothèse du rôle possible des IGFs et de l'insuline dans la modulation du développement fonctionnel de l'estomac foetal. Premièrement, nous avons déterminé la

présence et la localisation des récepteurs IGF-1 et de l'insuline dans la muqueuse gastrique. Deuxièmement, l'influence de ces facteurs sur la synthèse d'ADN et sur les activités des enzymes digestifs a été étudiée dans des explants gastriques en culture organotypique. Troisièmement, nous avons vérifié si la muqueuse gastrique foetale possédait la capacité de synthétiser et de sécréter les IGFBPs. Enfin, nous avons déterminé si ces dernières pouvaient lier les IGFs.

Finalement, nous avons cloné le cDNA de la lipase gastrique humaine afin de pouvoir analyser l'expression des ARN messagers de la lipase au cours du développement de l'estomac. Par la suite, nous avons analysé les niveaux d'expression des ARNm, de la protéine (lipase) et de l'activité lipolytique lors du développement, et au cours de la culture organotypique, afin d'établir à quel niveau le contrôle de l'expression du gène de la lipase se situe.

## **II. MATÉRIELS ET MÉTHODES.**

### **A) Modèle utilisé: tissus foetaux**

#### **1. Ontogénèse**

Les estomacs ont été obtenus à partir de foetus humains dont l'âge varie entre 12 à 20 semaines de gestation (post-fertilisation: les âges foetaux ont été déterminés selon la méthode de Streeter (1920) ) suite à une cessation de grossesse normale élective. Aucun tissu recueilli ne provenait de cas associés à une anomalie foetale connue ou à une mort foetale. Toutes les recherches qui ont été effectuées ont reçu l'approbation du comité de déontologie sur l'utilisation des tissus humains du Centre Universitaire de Santé de l'Estrie.

Les estomacs sont prélevés et immergés dans le milieu de culture Leibovitz L-15 à température ambiante (23°). Ce milieu de culture ne contient pas de sérum, donc complètement défini, auquel sont ajoutés 40 µg/ml de gentamycine (Novopharm Ltd, Toronto, Canada) et 40 µg/ml de nystatin (Gibco BRL, Burlington, Canada). La période de temps écoulée entre le prélèvement et l'utilisation du tissu n'excède pas 30 minutes. De manière générale, les estomacs sont ouverts longitudinalement le long de la grande et de la petite courbure et la portion contenant l'antré pylorique est retirée. Cependant si la méthodologie l'exige, l'estomac est découpé en trois régions

distinctes: le fundus, le corps ainsi que l'antré pylorique (voir schéma, page suivante).

## 2. Études *in vitro*

### 2.1 Culture organotypique

#### 2.1.1 Préparation à la mise en culture

L'estomac réservé à la culture organotypique est âgé entre 15 et 20 semaines de gestation. Après avoir exclus l'antré pylorique, l'estomac est découpé en explants de 3 mm par 3 mm. Une certaine quantité de ces explants est conservée et assure les valeurs contrôles ( $T_0$ ) aux expériences en culture organotypique et correspond à un stade donné de développement "*in utero*".

#### 2.1.2 Mise en culture

La culture des explants se fait dans des pétris de type Falcon (Falcon Plastics, LA, CA). Le puits central contient le milieu de culture. Un anneau de papier cartonné est placé dans le pourtour du pétri et est saturé en eau bidistillée contenant des concentrations de 40  $\mu\text{g/ml}$  de gentamycine et de nystatin. Un papier lentille reposant sur un treillis métallique est posé dans le

puits. Les explants sont déposés sur le papier lentille et le niveau de milieu de culture est ajouté de manière à humecter le tissu à demie hauteur. Les pétris sont placés dans un incubateur (Nu-aire) où la température est à 37°C, l'air à 100% d'humidité et l'atmosphère à 95% air- 5% CO<sub>2</sub>.

Après un premier 4 h de stabilisation, le milieu de culture est changé. Les milieux de culture sont par la suite changés après 48 h lorsque l'expérience l'exige (culture de 5 jours). Une fois retirés, les milieux sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C pour analyses ultérieures. A la fin des périodes de culture, les explants sont éponnés, pesés, congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C pour des analyses ultérieures. Ce modèle de culture a servi pour les études des effets de divers modulateurs.

## B) Immunolocalisation de la lipase gastrique

### 1. Immunofluorescence indirecte

Les estomacs sont découpés selon chaque région (fundus, corps et antrum pylorique) et les morceaux de tissus plongés directement dans de l'OCT (Optimum Cutting Temperature embedded compound; Tissue Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN) et congelés dans de l'azote liquide. Par la suite, des coupes en congélation de 2 à 3 µm d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un cryostat (Jung Frigocut 2800N; Leica Canada, Saint-Laurent, Québec, Canada). Ces coupes sont déposées sur des lames de verre, et

ensuite séchées à l'air libre pendant 1 h à température ambiante (22°C) avant de les ranger à -80°C. Les sections de tissus sont fixées pendant 45 min dans une solution de formaldéhyde 1% diluée dans un tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7.4, et sont lavées trois fois 5 min avec du PBS. Les coupes de tissus sont incubées pendant 1 h à 4°C dans un tampon 100 mM glycine dans du PBS, afin de neutraliser les groupements aldéhydes, et sont lavées deux fois 10 min avec du PBS. Par la suite, les sections sont incubées pendant 1 h dans une solution PBS contenant 0.1% gélatine de poisson pour bloquer les sites de liaison non-spécifiques. Le processus de marquage avec l'anticorps est effectué à température ambiante dans une chambre à humidité. Les coupes sont incubées pendant 1 h avec un anticorps polyclonal dirigé contre la lipase gastrique humaine (Moreau et al., 1989) dilué dans du PBS contenant 2% BSA (dilution 1:4 000), et sont lavées deux fois 10 min avec du PBS. Par la suite, les coupes sont incubées 30 min avec un anticorps secondaire (anticorps de chèvre anti-IgG de lapin; Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec) à une dilution de 1:30 dans du PBS contenant 2% BSA, et lavées 1 fois 10 min avec du PBS. Les sections sont colorées avec une solution 0.01% Bleu d'Evans dans du PBS préalablement filtrée. Les préparations sont montées dans une solution glycérol-PBS (9:1) contenant 0.1% paraphénylène diamine et sont visualisées avec un microscope Reichert Polyvar 2 (Leica Canada) équipé d'un système d'épifluorescence muni d'objectifs X25, X40 et X100. Pour les observations d'immunolocalisation, la fluorescence du FITC (fluorescein

isothiocyanate) est excitée avec une lampe Osram HBO 100 w/2 filtrée par un module Leica B1 (filtre excitation, 450-495 nm; miroir dichroïque DS 510; filtre barrière, LP 520). Les photographies sont prises sur un film noir et blanc Kodak TX-400. En aucun cas nous avons observé un marquage spécifique lorsque l'anticorps primaire avait été omis ou remplacé par le sérum non immun approprié.

## 2. Immunocytochimie à l'or colloïdal

Les estomacs sont découpés et fixés avec 1.25% glutaraldéhyde et 1.5% paraformaldéhyde dans un tampon phosphate 0.1M, pH 7.4, 3 min à 37°C. Après la fixation, les spécimens sont incubés dans du PBS contenant 0.15 M glycine pH 7.2, pendant 45 min à 4°C. Par la suite, les spécimens sont déshydratés par des incubations successives dans du méthanol (méthanol 30%, 5 min à 4°C; 50%, 5 min à 4°C; 75%, 5 min à -20°C; 90%, 30 min à -20°C). Les spécimens sont ensuite infiltrés avec le Lowicryl K4M en quatre étapes, toutes les étapes étant effectuées à -20°C; a) incubation de 1 h dans méthanol 90%:Lowicryl (1:1), b) 1 h dans méthanol 90%:Lowicryl (1:2), c) 1 h dans Lowicryl pur, et d) 18 h dans Lowicryl pur sous rayonnement U.V. pour permettre la polymérisation. Les particules d'or de 10 nm sont préparées tel que décrit par Slot and Geuze (1985). Le couplage des particules d'or à la protéine A (Pharmacia, Uppsala, Suède) a été effectué selon la méthode de Ghitescu and Bendayan (1990). Des sections

de 1µm sont effectuées et montées sur des grilles d'or (200-mesh) avec un film Formvar recouvert de carbone. Les sections sont déposées sur une goutte de 1% ovalbumine-PBS et ensuite incubées pendant 2.5 h avec un anticorps dirigé contre la lipase gastrique humaine dilué 1:200 dans 1% PBS-BSA à la température ambiante. Après un lavage avec PBS, les grilles sont transférées dans du PBS-ovalbumine pendant 15 min. Les sections sont ensuite traitées avec le complexe Protéine A-or (à une dilution de OD 520 = 0.15 dans le PBS) pendant 25 min, lavées avec PBS, rincées à l'eau, et colorées avec d'acétate d'uranyle et du citrate de plomb.

### C) Études des modulateurs du développement

#### 1. Paramètres étudiés

##### 1.1 Immunolocalisation des récepteurs

La localisation des récepteurs a été effectuée selon la technique d'immunofluorescence indirecte décrite dans le paragraphe B, section 1. Pour le récepteur EGF, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur EGF humain (Upstate Biotechnology, Boston, MA) a été utilisé à une dilution de 1:150 dans du PBS-BSA 2%. Dans le cas des récepteurs IGF-1 et de l'insuline, deux anticorps monoclonaux (IGF-1, clone  $\alpha$ IR3; insuline, clone cII 25.3: Oncogene Science, Cambridge, MA) dirigés contre les récepteurs

humains ont été utilisés à des dilutions de 1:100 dans du PBS-BSA 2%. L'anticorps secondaire (anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à la fluoresceine; Boehringer Manheim Canada, Laval, Québec) a été utilisé à une dilution de 1:30.

## 1.2 Effets des modulateurs sur la synthèse d'ADN

Grâce à la culture organotypique, les dosages protéiques et de l'ADN ainsi que la détermination de la synthèse de l'ADN, nous avons pu évaluer les effets des différents modulateurs étudiés. La synthèse de l'ADN se fait en mesurant l'incorporation de [3H]-thymidine (73.6 Ci/mmol; New England Nuclear, Boston, MA) dans l'ADN. Les explants sont cultivés en présence de 2 µCi [3H]-thymidine par ml de milieu de culture pendant les 6 dernières h de culture à 37°C. A la fin de la période d'incubation, l'ADN est extrait par précipitations successives à l'acide trichloroacétique: 20, 10 et 5% (Arsenault, 1988) et le contenu en ADN est déterminé sur la fraction enrichie à l'aide de la méthode de Burton (1956) modifiée par Giles et Myers (1965). La courbe standard est faite avec de l'ADN de thymus de veau. Les D.O. sont mesurées par spectrométrie à 700 et 595 nm. Le contenu (µg) est exprimé par mg de tissu frais.

L'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN est déterminée en mesurant la radioactivité incorporée dans 0.5 ml de la fraction contenant l'ADN soluble

avec un compteur à scintillation Beckman. Les résultats sont exprimés en désintégrations/min/mg de tissu.

### 1.2.1 Dosage des protéines

Après la décongélation sur glace, les tissus sont dilués à une concentration maximale de 100 mg par ml de tampon de dosage. L'homogénéisation se fait avec un appareil de type Polytron, 1 minute à 16 000 rpm avec une tige de 7 mm (Brinkmann Instruments, Rexdale, Ontario). La quantité de protéines est évaluée selon la technique de Lowry et al. (1951). L'albumine sérique de boeuf à diverses concentrations permet d'établir la courbe standard. Les lectures de densité optique (D.O.) sont faites à 750 nm par spectrométrie, et les calculs sont faits en fonction de la courbe standard. Le contenu protéique est exprimé par mg de tissu.

### 1.2.2 Concentrations des modulateurs utilisés

Les modulateurs sont ajoutés au milieu de culture Leibovitz L-15 à des concentrations précises pour des temps déterminés de culture et ce, après la période de stabilisation. L'EGF humain (Collaborative Research) est utilisé à des concentrations de 1, 10 et 100 ng/ml, alors que IGF-1 et IGF-2 humains (Collaborative Research) sont utilisés à des concentrations de 50 et 100 ng/ml respectivement. La concentration d'insuline (Novo Nordisk Canada

Inc, Mississauga, Ontario) utilisée est de 30  $\mu$ U/ml. Ces concentrations sont représentatives de celles retrouvées dans le sérum foetal dans le dernier mois de grossesse (Spellacy et al., 1973; Bennett et al., 1983).

### 1.3 Autoradiographie

Des études par autoradiographie ont été réalisées afin de déterminer la localisation de l'incorporation de [3H]-thymidine. Après l'incubation avec le précurseur radioactif, les explants sont fixés dans 2.8% glutaraldéhyde refroidie sur glace dans un tampon 0.1 M cacodylate pendant 16 à 24 h à 4°C. Les explants sont rincés deux fois 10 min dans un tampon 0.1 M cacodylate, fixés de nouveau pendant 30 min dans 2% acide tétraosmique dans un tampon 0.1 M cacodylate, deshydratés avec du méthanol, et enrobés dans de l'Epon. Par la suite, des sections de 1  $\mu$ m d'épaisseur sont montées sur des lames de verre et colorées avec de la fuchsine aldéhyde. Les lames sont trempées dans de l'émulsion Kodak NTB<sub>2</sub> (Eastman Kodak, Rochester, NY) et exposées pour une période de 6 semaines (Kopriwa et Leblond, 1962). L'index de marquage de la [3H]-thymidine est établi au niveau épithélial. Pour chaque foetus, deux ou trois explants sont analysés, et 1000 noyaux sont comptés par explant. L'index de marquage est calculé en exprimant le nombre de noyaux marqués (5 grains et plus recouvrant le noyau) en pourcentage du nombre total de noyaux comptés dans l'épithélium entier.

## 1.4 Effet des modulateurs sur la synthèse des glycoprotéines

Pour évaluer l'effet des modulateurs sur la synthèse des glycoprotéines, nous avons mesuré l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-glucosamine (31 Ci/mmol; New England Nuclear, Boston, MA) dans les glycoprotéines suite à une incubation du précurseur radioactif durant les 6 dernières h de la période de culture (24 h et 5 jours). Après l'incubation, les protéines sont extraites des tissus, et l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-glucosamine dans les protéines est déterminée en comptant un échantillon de 0.5 ml du filtrat contenant les protéines dans du liquide à scintillation de Beckman (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA). Les résultats sont exprimés en désintégrations/min/mg de tissu, et reportés en pourcentage par rapport aux valeurs contrôles.

## 1.5 Dosages des activités enzymatiques

### 1.5.1 Lipase gastrique

L'activité lipolytique est mesurée en utilisant comme substrat un triglycéride à longues chaînes: le glycérol-[1-<sup>14</sup>C] trioléate (Amersham Canada, Oakville, Ontario). Le substrat est préparé juste avant son utilisation. Il est constitué des éléments suivants:

<b><u>Produits</u></b>	<b><u>Quantité/ml de substrat total</u></b>	<b><u>Fournisseurs</u></b>
glycérol-[1- <sup>14</sup> C] trioléate	38 µl (stock: 250µCi par 2.5 ml)	Amersham
trioléine	75 mg	Sigma
triton X100 1%	90 µl	Sigma
albumine bovine sans acide gras	100 mg	Sigma
tampon citrate- phosphate pH 6.0	1 ml	

Le trioléate est dilué dans de l'heptane et doit être évaporé sous atmosphère d'azote. La trioléine qui est très visqueuse est mesurée au poids. La valeur de la pesée doit être soigneusement notée car elle fait partie du calcul de l'activité enzymatique. La préparation est mélangée au vortex puis solubilisée par sonication pour obtenir une émulsion laiteuse. L'essai est réalisé en mélangeant 100 µl d'homogénat ou de milieu de culture avec 100 µl de substrat, qui sont incubés pendant 1 h à 37°C avec agitation dans un bain Dunderf. La réaction est arrêtée par l'addition de 3.25 ml d'un mélange méthanol:chloroforme:heptane (1.41:1.25:1) d'après la méthode de Belfrage et Vaughan (1969). L'extraction des acides gras libres est effectuée après une centrifugation de 20 min à 3000 RPM suite à l'ajout de 1.05 ml de tampon carbonate-borate pH 10.5. Les acides gras libres sont recueillis dans la phase supérieure. Une portion de cette phase (1 ml) est transférée dans un vial contenant 10 ml de liquide à scintillation (ReadyGel, Beckman)

et la radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation (Beckman). Le résultat est multiplié par un facteur de correction tenant compte de l'extraction incomplète des acides gras libres. L'activité est exprimée en  $\mu\text{moles d'acides gras libres/min/g}$  de tissu.

### 1.5.2 La pepsine

L'activité du pepsinogène présent dans le tissu ainsi que dans le milieu est déterminé par une modification de la méthode de Anson et Mirsky (1932). Brièvement, 100  $\mu\text{l}$  d'homogénat et/ou de milieu est soumis à une préincubation de 18 minutes à température ambiante dans 900  $\mu\text{l}$  de tampon glycine-HCl pH 2.0, et 2 minutes à 37°C. Cette préincubation a pour but d'activer le pepsinogène en pepsine. Par la suite, 1 ml d'une solution d'hémoglobine bovine 2%, ayant été préalablement dialysée toute la nuit contre un gradient de HCl 0.1 N, est ajouté comme substrat. La réaction est poursuivie pendant 10 min et arrêtée par l'ajout de 2 ml d'acide trichloroacétique 6.2%. Les tubes sont gardés 1 h sur la glace avant d'être centrifugés à 13 000 X g pendant 20 min. Les produits d'acides aminés libres générés dans le surnageant par l'activité pepsine sont quantifiés par spectrométrie à 280 nm, en utilisant une courbe standard de tyrosine. L'activité est reporté en U de pepsine; une unité de pepsine est définie comme la quantité d'enzyme requise pour produire 0.1  $\mu\text{mol}$  de peptide

contenant de la tyrosine à 37°C en 10 minutes à un pH 1.8 provenant d'une solution d'hémoglobine 2%.

#### D) Études par les techniques d'immunobuvardage

##### 1. La technique d'immunobuvardage du ligand

Cette technique est utilisée pour l'étude sur la capacité de liaison des IGFBPs aux IGFs. Cette technique est connue sous le nom de "*Farwestern-Blot*".

##### 1.1 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les protéines provenant des tissus et des cultures pour l'étude par immunobuvardage par ligand sont séparées par électrophorèse en conditions non-réductrice (afin de que les IGFBPs ne perdent pas leur capacité de lier les IGFs) et dénaturante (Thomas et Kornberg, 1975) en utilisant comme gel séparateur une concentration d'acrylamide de 15%, pH 8.8 (ratio acrylamide/bis: 30:0.15). Le gel d'entassement utilisé est composé d'acrylamide 4%, pH 6.8. Les protéines totales extraites d'homogénats d'estomac entier ainsi que d'explants gastriques cultivés (homogénéisés dans un tampon 20 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8) sont dénaturées dans le tampon d'échantillon 2X (125 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8; 4% SDS; 20% glycérol; 0.08%

bleu bromophénol) à 90°C pendant 10 min. Les protéines totales des milieux de culture sont concentrées  $\approx$ 30-50 fois par ultrafiltration à l'aide des concentrateurs Centricon-10 (Amicon), et sont ensuite mélangées avec le tampon d'échantillon 2X. Les échantillons sont déposés au fond des puits respectifs. L'électrophorèse est effectuée pendant 1 h à 70 Volts et 3-4 h à 170 Volts à la température de la pièce, à l'aide d'une chambre d'électrophorèse (Vertical Gel Electrophoresis Apparatus, model V16; Gibco BRL), dans un tampon d'électrophorèse contenant 1% SDS, 25 mM Tris et 0.192 M glycine. Les marqueurs "*prestained Low range Standards*" (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) et "*Biotinylated Proteins Standards*" (Tropix Inc., Bedford, MA) ont été utilisés comme indicateurs de poids moléculaires.

#### 1.1.1 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Les protéines séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide sont électrotransférées à 100 Volts pour 1 h à 4°C sur membrane de nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) dans un tampon de transfert contenant 25 mM Tris, 0.192 M glycine, pH 8.3 et 20% méthanol (Towbin et al., 1979). Les résultats présentés ici ont été obtenus en utilisant un système de détection utilisant la chemiluminescence (Bradd et al., 1993).

### 1.1.2 Immunodétection par chemiluminescence

Après le transfert des protéines sur nitrocellulose, les membranes sont bloquées pendant 18-24 h à 4°C dans du PBS contenant 0.2% de caséine hautement purifiée (Tropix). Par la suite, les membranes sont incubées en présence du ligand étudié (IGF-1 à une concentration de 200 ng/ml dilué dans la solution de blocage) et sont lavées deux fois 5 min avec du PBS contenant 0.05% Tween-20. Après les lavages, les membranes sont incubées pendant 1 h à la température ambiante avec un anticorps monoclonal dirigé contre le ligand [IGF-1 humain, clone  $\alpha$ IR3 (Oncogene Science) à une concentration de 1  $\mu$ g/ml dilué dans la solution de blocage], lavées deux 5 min avec du PBS-Tween. Par la suite, les membranes sont incubées 30 min en présence de l'anticorps secondaire biotinylé respectif, soit l'anticorps de chèvre anti-IgG (Fc) de souris couplé à la biotine (1:20 000), lavées deux fois 5 min, et incubées de nouveau avec une solution de streptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline (1:20 000) pendant 20 min. Finalement, les protéines immunoréactives sont révélées avec le système de détection Western-Light Plus (Tropix) en exposant les membranes sur un film XAR-5 (Kodak). Les autoradiogrammes sont quantifiés par analyse densitométrique avec un LKB XL Ultroscan (Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec, Canada).

## 1.2 Analyse par immunobuvardage

Les étapes de l'immunobuvardage ressemblent en tout point à celles décrites pour l'immunobuvardage par ligand, à l'exception qu'il n'y a pas d'incubation avec le ligand, mais seulement une incubation avec un anticorps primaire, toutes les autres étapes étant identiques. Pour la détection des IGFBPs, une batterie d'anticorps polyclonaux dirigés contre les IGFBP-1 à -5 (Upstate Biotechnology) ont été utilisés à différentes dilutions (IGFBP-1, 1:1 000; IGFBP-2, 1:2 000; IGFBP-3, 1:800; IGFBP-4, 1:1 000; IGFBP-5, 1:750). Les anticorps sont incubés 1 h à 37°C et 18-24 h à 4°C. Pour la détection de la lipase gastrique humaine, l'anticorps utilisé est le même qu'en immunofluorescence indirecte, à une dilution de 1:2 000, une h à la température ambiante. Les protéines immunoréactives sont révélées par chemiluminescence.

### E) Études sur la régulation de l'expression de la lipase gastrique

#### 1. Extraction de l'ARN

L'ARN total gastrique est extrait avec le réactif TRIzol (Gibco BRL), selon la méthode décrite par Chomczynski et Sacchi (1987). Les tissus sont homogénéisés directement dans le TRIzol sur glace (1 ml de TRIzol/50-100 mg de tissus). Les homogénats sont incubés 5 min à température ambiante,

et 0.2 ml de chloroforme est ajouté par ml de TRIzol, mélangés par vortex, et incubés 2-3 min à température ambiante. Les tubes sont centrifugés (12 000 X g, 15 min, 4°C) et la phase aqueuse est recueillie et transférée dans un autre tube. Par la suite, l'ARN est précipité en ajoutant 0.5 ml d'isopropanol par ml de TRIzol. Les tubes sont incubés 10 min à température ambiante, centrifugés (12 000 X g, 10 min, 4°C). Le culot recueilli est lavé avec de l'éthanol 75% (1 ml/ml de TRIzol), vortexé et centrifugé (5 min, 7 500 X g, 4°C). Le culot est ensuite redissous dans 20 µl d'eau bidistillée stérile et quantifié par spectrométrie à 280 nm.

## 2. Synthèse de DNA complémentaire (cDNA)

Un échantillon d'ARN total (1-2 µg) isolé d'un estomac foetal humain de 17 semaines de gestation a été utilisé pour la synthèse du cDNA. L'échantillon d'ARN auquel est ajouté de l'oligo(dT)<sub>12-18</sub> (500 µg/ml) est chauffé à 70°C pendant 10 min, refroidi 5 min sur glace et mélangé avec le tampon de la réaction (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 1 mM ATP, TTP, GTP, CTP; 20 U RNAsin). La réaction est incubée 2 min à 37°C, et 2.5 U/µl de SuperScript RT Rnase H<sup>-</sup> Transcriptase (Gibco BRL) est ajouté au milieu réactionnel et incubé à 37°C pendant 1 h. Après l'incubation, l'échantillon est incubé à 99°C pendant 5 min et avant d'être déposé sur la glace. L'échantillon de cDNA qui a été préparé est utilisé directement pour l'amplification par PCR tel que décrit dans le paragraphe suivant.

### 3. Amplification par PCR du cDNA de la lipase gastrique humaine.

Deux amorces complémentaires à la séquence de cDNA de la lipase gastrique humaine déjà connue (Bodmer et al., 1987) ont été synthétisées et utilisées pour l'amplification par PCR. Les deux amorces sont: l'amorce sens LIP-1 5'-CTGAGGAAACTGCAGGTCCA-3', et l'amorce anti-sens LIP-2 5'-AGAAGCACTGCATGTCAAAC-3'. Le milieu réactionnel d'amplification est ajouté directement à l'échantillon de cDNA préalablement synthétisé et est composé comme suit: 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 pmol LIP-1, 100 pmol LIP-2, 2.5 U Taq polymérase (Perkin-Elmer-Cetus), 5 mM KCl, et 10 mM Tris-HCl. Le cDNA est soumis à 25 cycles de dénaturation (1 min à 94°C), d'hybridation (1 min à 53°C) et d'extension (1 min à 72°C) dans un cycleur thermique (Perkin-elmer DNA thermal cycler model 480).

### 4. Clonage du cDNA de la lipase gastrique humaine

#### 4.1 Isolation du produit d'amplification par PCR

Une fraction du produit d'amplification par PCR est migrée sur un gel d'agarose à faible point de fusion 1% pendant 30 min à 100 Volts dans un tampon d'électrophorèse (0.04 M Tris-HCl, 5 mM acétate de sodium, 1 mM EDTA). Le gel est coloré avec le bromure d'éthidium. Après la migration, le gel est photographié et la taille du produit d'amplification est évaluée à partir

des marqueurs de poids moléculaire de DNA. L'amplification par PCR a produit un fragment de cDNA d'environ 1 300 paires de base. Ce fragment est extrait du gel et purifié à l'aide du système *Wizard PCR preps DNA purification* (Promega Corporation). Brièvement, la portion d'agarose retirée du gel est transférée dans un tube à microcentrifuge 1.5 ml et incubée à 70°C jusqu'à ce que l'agarose soit totalement fondue. Par la suite, 1 ml de résine (*PCR Preps DNA Purification Resin*, Promega) est ajoutée à l'agarose et mélangée vigoureusement pendant 20 sec. Le mélange cDNA/résine est filtré sur une mini-colonne (*Wizard Minicolumns*, Promega), et lavé avec 2 ml isopropanol 80%. La mini-colonne est centrifugée pendant 20 sec à 12 000 X g pour la faire sécher. L'élution du cDNA est effectuée par centrifugation (12 000 X g, 20 sec) suite à un ajout de 50 µl d'eau stérile. Le cDNA purifié est gardé à -20°C.

#### 4.2 Insertion du cDNA dans un vecteur et transformation des bactéries

Le clonage du cDNA de la lipase gastrique humaine dans le vecteur pGEM-5Zf (+) est effectué à l'aide du *pGEM-T Vector System I* (Promega Corporation). Brièvement, le produit d'amplification est ajouté au milieu réactionnel (30 mM Tris -HCl, pH 7.8; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 0.5 mM ATP; vecteur pGEM-T 50 ng; 1 µl T4 DNA ligase) et incubé 3 h à 15°C, et par la suite la réaction est placée dans un bain préalablement chauffé à 70-72°C pour 10 min, et refroidie à la température ambiante.

Nous avons utilisé la souche de bactéries *Escherichia Coli* JM109 pour réaliser la transformation. Le vecteur contenant l'insert est ajouté aux bactéries (2 µl insert pour 50 µl de bactéries) et placé sur la glace pendant 20 min. Un traitement-choc à la chaleur est effectué pendant 45-50 sec à 42°C, et remis immédiatement sur la glace pour 2 min. Un volume de 450 µl de milieu LB-Broth est ajouté aux cellules, mélangé par inversion et incubé 1 h à 37°C. Par la suite, une fraction de ces cellules (50 µl) est étendue sur un pétri d'agar (1.5% Agar dans LB-Broth; 1 mg/ml ampicilline; 200 mg/ml IPTG; 20 mg/ml X-GAL) et incubé 16-18 h à 37°C. La sélection des bactéries est réalisée à l'aide du système IPTG/X-GAL. Ce système colore en bleu les bactéries contenant le vecteur sans l'insert, et celles contenant le vecteur et l'insert demeurent de couleur blanche. Le lendemain, les colonies de couleur blanche sont sélectionnées et cultivées toute la nuit à 37°C dans le milieu LB-Broth contenant de l'ampicilline.

#### 4.3 Analyses des clones

Afin de pouvoir analyser les différents clones obtenus, le vecteur contenant l'insert doit être purifié. La purification du plasmide est effectuée avec l'aide du *Magic Minipreps DNA Purification System* (Promega Corporation). Un aliquot de 1-3 ml de cellules transformées est centrifugé afin de former un culot. Le culot de cellules est resuspendu dans 200 µl de solution de resuspension (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM EDTA; 100 µg/ml

Rnase A). Les cellules sont lysées en ajoutant 200 µl de solution de lyse cellulaire (0.2 M NaOH; 1% SDS) et en mélangeant par inversion plusieurs fois. Le tube est centrifugé à 12 000 X g pendant 5 min et le surnageant est décanté dans un nouveau tube. Ensuite, 1 ml de résine (*Magic Minipreps DNA Purification Resin*, Promega) est ajouté au surnageant et mélangé par inversion. Le mélange est passé sur une mini-colonne (*Magic Minicolumn*, Promega), lavé avec 2 ml de solution de lavage (100 mM NaCl; 2 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.5 mM EDTA) et centrifugé 20 sec à 12 000 X g pendant 20 sec. Le plasmide est élué en ajoutant 50 µl d'eau stérile et en centrifugeant à 12 000 X g pendant 20 sec. Le plasmide est gardé à -20°C.

Afin de déterminer si le cDNA de la lipase gastrique a été cloné, les différents clones obtenus ont été analysés suite à des digestions par des enzymes de restriction. Selon les enzymes utilisés, la taille des fragments attendue a été déterminée selon la carte de restriction du cDNA de la lipase gastrique, et comparé à celle obtenue sur gel d'agarose. Plusieurs enzymes de restriction ont été utilisés dont: *Apal*, *Sall*, *EcoRV*, *PstI*, *HindIII* et *BstXI*. Toutes les réactions ont été effectuées à 37°C pendant 1 h dans leur tampon de réaction respectif (*One-Phor-All Buffer Plus*, Pharmacia). Les produits de la digestion ont été migrés sur gel d'agarose 1%, photographiés et la taille des fragments obtenus analysé.

#### 4.4 Séquençage du cDNA de la lipase gastrique

Après avoir déterminé le clone possédant le cDNA de la taille attendue, ce dernier a été expédié au Centre de Recherche Louis-Charles Simard de l'Institut du Cancer de Montréal pour séquençage. Les 350 premières paires de base ont été séquencées dans les deux directions du vecteur pGEM-T à l'aide d'un séquenceur automatisé de DNA A.L.F. (Pharmacia) en utilisant la méthode de séquençage didéoxy de Sanger et al. (1977). Les résultats obtenus ont montré une homologie de séquence de 100% avec la séquence publiée antérieurement par Bodmer et al. (1987), démontrant que le cDNA de la lipase gastrique humaine a bel et bien été cloné.

#### 4.5 Préparation de la sonde de cDNA

Le marquage au  $^{32}\text{P}$  du cDNA de la lipase gastrique est effectué par amorçage aléatoire ou "*random priming*" à l'aide du *Megaprime DNA Labeling System* (Amersham, Oakville, Ontario, Canada). Le cDNA purifié est diluée à une concentration de 2-25  $\mu\text{g/ml}$  dans de l'eau stérile, dénaturé en chauffant à 95-100°C pendant 2 min et placé immédiatement sur la glace. Par la suite les réactifs fournis par le manufacturier sont ajoutés: *multiprime buffer solution* (dATP, dGTP et dTTP dans un tampon Tris-HCl, pH 7.8,  $\text{MgCl}_2$ ), *primer solution* (hexanucléotides aléatoires), *solution enzyme* (DNA

polymerase I fragment "Klenow" dans 50 mM potassium phosphate, pH 6.5, 10 mM 2-mercaptoéthanol et 50% glycérol), [ $\alpha$ - $^{32}$ P]d-CTP ( $\approx$ 3 000 Ci/mmol). Les réactifs sont mélangés et centrifugés légèrement. Après 1 h d'incubation à 37°C, le mélange réactionnel est déposé sur une colonne de Séphadex AG-50, centrifugé 2 X 2 min à 3 000 RPM et l'éluat est jeté. Le cDNA marqué est récupéré à la troisième centrifugation et gardé à -20°C.

## 5. Analyse par hybridation Northern

### 5.1 Électrophorèse sur gel d'agarose-formaldéhyde

Les ARN totaux gastriques sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1%, contenant 6% formaldéhyde et 1.5% MOPS. Les échantillons sont préparés dans un tampon d'échantillon, dénaturés en les incubant à 65°C pendant 15 min, déposés au fond du puits respectif. L'électrophorèse est effectuée à 100 Volts pendant  $\approx$ 3 h dans le tampon d'électrophorèse 1X MOPS (20 mM MOPS acide, 5 mM acétate de sodium, 1 mM EDTA, pH 7.0, 1 mg/ml bromure d'éthidium) dans une chambre d'électrophorèse (Sub-Cell GT Submarine Electrophoresis System, Bio-Rad Laboratories).

## 5.2 Transfert de l'ARN sur membrane

Après l'électrophorèse, le gel est pré-équilibré dans un tampon 20X SSC (3 M NaCl, 300 mM citrate de sodium, pH 7.0) pendant 10 min pour enlever la formaldéhyde. Par la suite, l'ARN est transféré par capillarité sur une membrane de nylon (Hybond-N, Amersham) dans le tampon 20X SSC pendant 3 h (minimum). Les acides nucléiques sont fixés sur la membrane par un "cross-linking" aux rayons U.V. de courte durée. La membrane est ensuite lavée dans de l'eau stérile et séchée à l'air libre.

## 5.3 Hybridation de la sonde de DNA

La membrane est scellée dans un sac de plastique contenant la solution d'hybridation (120 mM Tris-HCl, pH 7.4, 600 mM NaCl, 8 mM EDTA, 0.1% pyrophosphate de sodium, 0.2% SDS, 0.1 mg/ml héparine (Sigma Chemical Co., St-Louis. MO)) et incubée à 68°C pendant une h. Entretemps, la sonde est dénaturée pendant 5 min à 100°C et immédiatement mise sur la glace. Après la pré-hybridation, la membrane est incubée dans la solution d'hybridation contenant cette fois, 0.625 mg/ml héparine, 10% dextran sulfate et la sonde marquée ( $5-10 \times 10^6$  cpm). La membrane est incubée toute la nuit à 68°C. Après la période d'hybridation, la membrane est rincée dans un tampon 2X SSC, lavée 1 fois 20 min dans 2X SSC + 1% SDS à la température ambiante, lavée 1 fois 30 min dans 2X SSC+ 1% SDS à 65°C,

une fois 30 min dans 0.1X SSC + 0.2% SDS à 65°C, et enfin 1 fois 30 min dans 0.1X SSC + 0.1% SDS à 50°C. Après les lavages, la membrane sondée est enveloppée dans du cellophane et exposée sur un film Biomax-MS (Kodak) à -80°C jusqu'à l'obtention de l'intensité désirée. Les autoradiogrammes obtenus sont quantifiés par analyse densitométrique à l'aide du LKB XL Ultrosan (Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec, Canada).

### III. RÉSULTATS

#### A) Immunolocalisation de la lipase gastrique

##### 1. Spécificité de l'anticorps utilisé

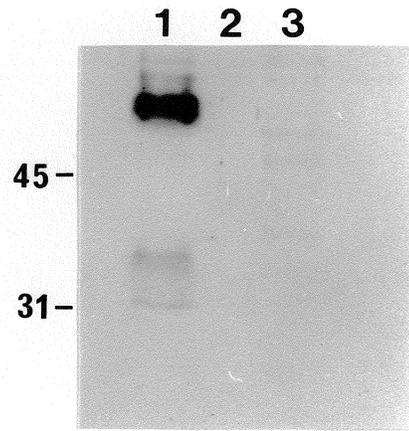
La spécificité de l'anticorps (anti-HGL) a été évaluée par immunobuvardage avec les protéines totales d'homogénats foetaux gastriques âgés entre 17 et 20 semaines de gestation. L'anticorps anti-HGL a détecté une bande majeure (Figure 1, couloir 1) de 49 kDa, tel que prévu pour cette enzyme (Moreau et al., 1988), tandis que le sérum non-immun contrôle s'est avéré négatif (Figure 1, couloir 3). De plus, aucune immunoréactivité n'a été observée avec la lipase pancréatique de porc (Figure 1, couloir 2). Les analyses par immunobuvardage de protéines totales d'estomac foetal avec cet antisérum ont clairement confirmé la présence d'une lipase gastrique dans cet organe (Figure 1, couloir 1).

##### 2. Localisation de la lipase gastrique par immunofluorescence indirecte

L'expression de la lipase dans la muqueuse gastrique foetale a été étudiée au moyen de l'immunofluorescence indirecte dans les différentes régions de l'estomac foetal (fundus, corps et l'antra pylorique) entre 13 et 20

**Figure 1. Immunobuvardage contrôle de la lipase gastrique.**

Les protéines totales gastriques foetales humaines (couloirs 1 et 3) et de lipase pancréatique de porc (couloir 2) ont été séparées par SDS-PAGE suivi d'un électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose. L'anticorps de lapin dirigé contre la lipase gastrique humaine a réagi avec une bande majeure de 49 kDa correspondant au poids moléculaire de la lipase, et avec deux bandes mineures (couloir 1), mais aucunement avec la lipase pancréatique de porc (couloir 2), alors que le sérum de lapin non immun est demeuré négatif (couloir 3). Les nombres sur le côté gauche de la membrane indiquent la position des standards de protéines.



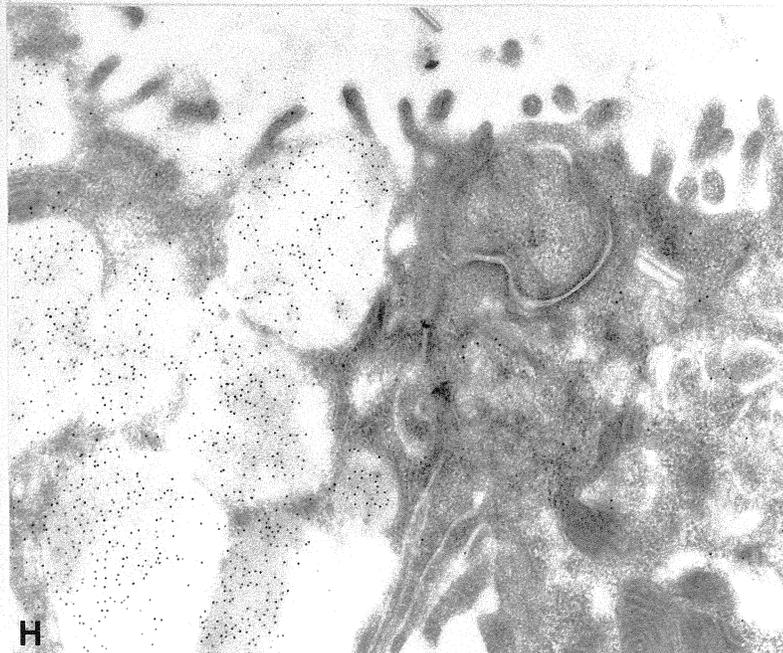
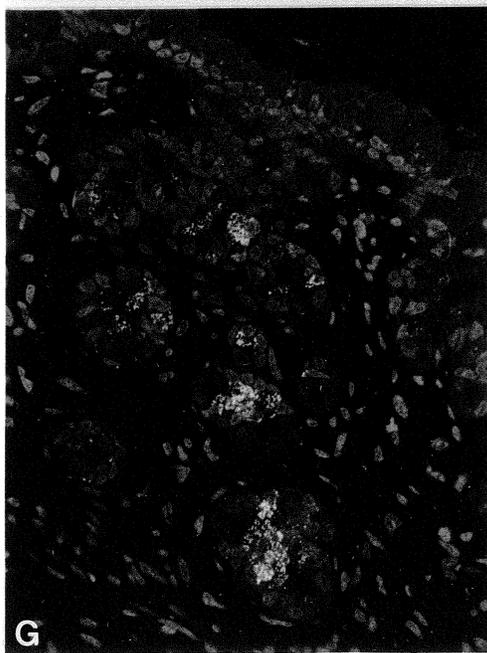
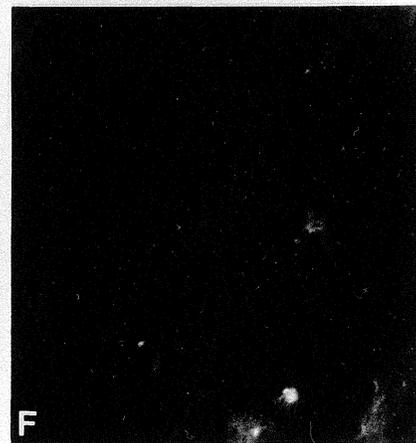
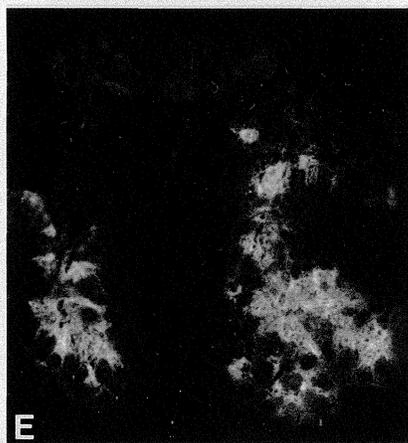
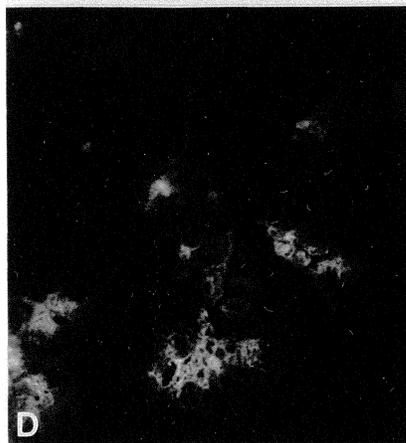
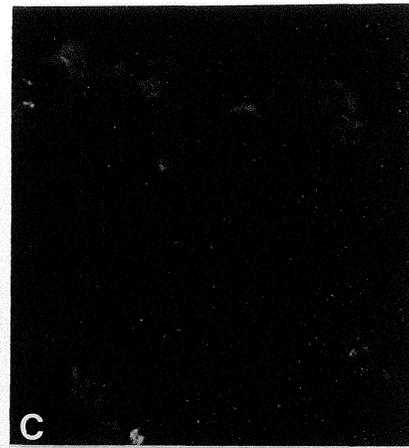
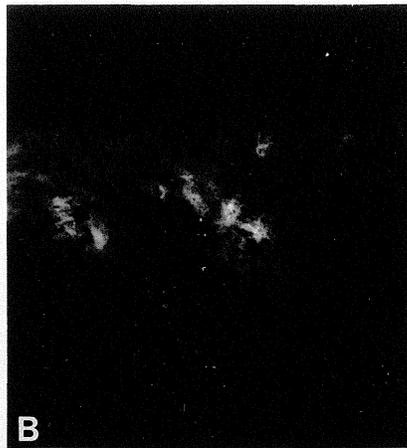
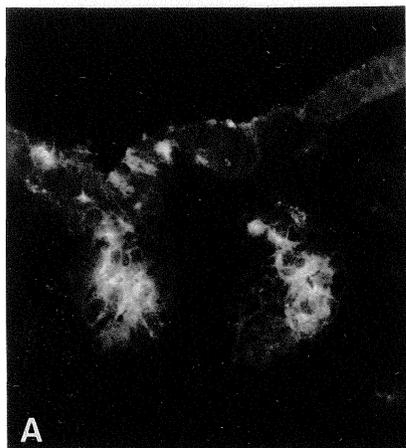
semaines de gestation (Figure 2A-2F). De 13 à 20 semaines, l'immunoréactivité de la lipase est détectée uniformément dans la région apicale des cellules épithéliales localisées dans les glandes en formation (Figure 2A, 2B, 2D et 2E) sous l'épithélium de surface. Au cours de la même période, un gradient décroissant du marquage de la lipase a été observé allant du fundus vers le pylore, avec un très faible niveau (ou même absence) d'expression de la lipase dans l'antrum pylorique (Figure 2C et 2F). Par des études d'immunocytochimie sur des coupes semi-fines en Lowicryl, nous avons observé de petits granules immunoréactifs localisés dans la partie apicale du cytoplasme de cellules épithéliales le long de la lumière des glandes gastriques en formation (Figure 2G), indiquant que la lipase gastrique serait localisée dans les granules de sécrétion des cellules principales.

### 3. Localisation subcellulaire de la lipase gastrique

Afin de vérifier la localisation subcellulaire de la lipase dans l'épithélium gastrique, un marquage à l'or colloïdal par immunocytochimie en microscopie électronique a été effectué sur 4 spécimens différents de la région du corps d'estomacs âgés entre 17 et 20 semaines de gestation. Tel que montré dans la Figure 2H, le marquage de la lipase a été détecté dans les granules de sécrétion des cellules principales de glandes en formation. Par ailleurs, quelques uns des granules de sécrétion paraissaient être en exocytose. Les

## **Figure 2. Immunolocalisation de la lipase gastrique.**

Localisation de la lipase gastrique dans les régions du fundus (A, D), du corps (B, E) et l'antra pylorique (C, F) de l'estomac lors du développement. Les sections en congélation d'estomac foetal agés de 13 et 20 semaines de gestation ont été marquées par immunofluorescence indirecte. Entre 13 et 20 semaines de gestation, un gradient décroissant de la lipase a été observé allant du fundus vers l'antra pylorique. G) Immunofluorescence indirecte sur une section de 1  $\mu$ m provenant de la région du corps d'un estomac agé de 17 semaines inclus dans le Lowicryl. De petits granules immunoréactifs ont été localisés dans le cytoplasme apical des cellules épithéliales. H) Micrographie en microscopie électronique du cytoplasme apical d'une cellule principale (gauche) et d'une cellule pariétale (droite). Le marquage de la lipase a été détecté uniquement dans les granules de sécrétion des cellules principales. (Grossissement original)



granules contenant la lipase ont été localisés dans la partie apicale des cellules. Les cellules pariétales tout comme les cellules à mucus n'ont pas été marquées par l'anti-HGL. Dans les cellules contenant la lipase, aucun marquage a été observé dans le noyau, mitochondries ou le réticulum endoplasmique rugueux. De plus, aucune des expériences contrôles effectuées avec le sérum non-immun sur les échantillons ont montré du marquage (résultats non présentés).

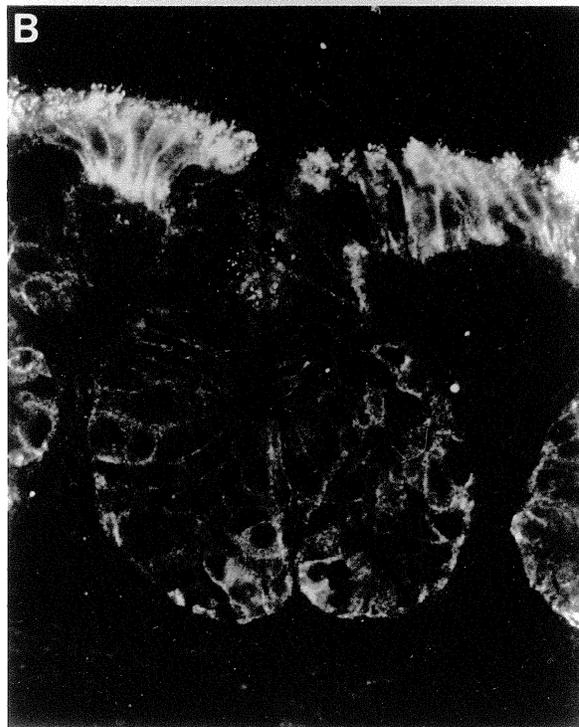
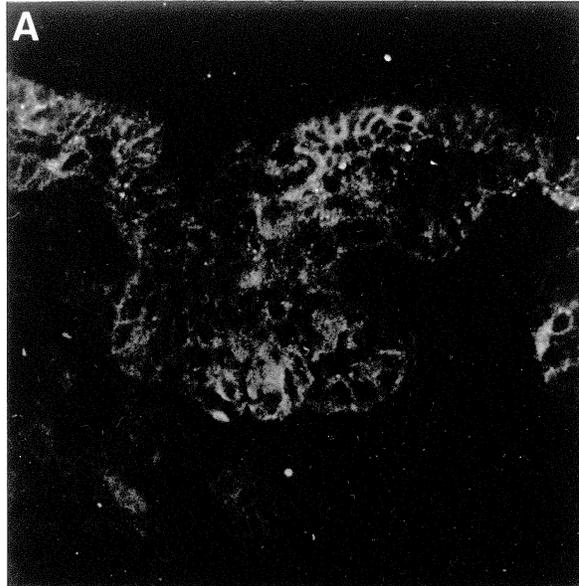
## B) Effet de EGF sur la modulation du développement

### 1. Localisation du récepteur de EGF

L'expression de récepteurs spécifiques est un prérequis pour l'action possible du EGF sur les fonctions gastriques. La localisation par immunofluorescence indirecte du récepteur de EGF a été effectuée sur des spécimens âgés de 12 à 20 semaines de gestation (Figure 3). Les récepteurs de EGF sont déjà présents à la 12<sup>ème</sup> semaine au niveau des membranes basolatérales de toutes les cellules épithéliales de la muqueuse gastrique (Figure 3A). Au cours de la période étudiée, la distribution cellulaire des récepteurs demeure principalement inchangée, quoique les glandes se sont développées et que l'épithélium de surface s'est différencié (Figure 3B). Il est à noter que le marquage intense observé à la portion basolatérale des cellules à

**Figure 3. Expression et distribution du récepteur EGF dans la muqueuse gastrique en développement.**

Micrographie en immunofluorescence indirecte de coupes en congélation des régions du corps d'estomac foetal à 12 (A) et 20 (B) semaines de gestation marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur EGF. De 12 à 20 semaines, le récepteur EGF a été localisé à la membrane basolatérale de toutes les cellules des épithéliums de surface et glandulaire (agrandissement original 136 X).



mucus de surface reflète une distribution hautement polarisée des récepteurs de EGF.

## 2. Effet de EGF sur la synthèse d'ADN

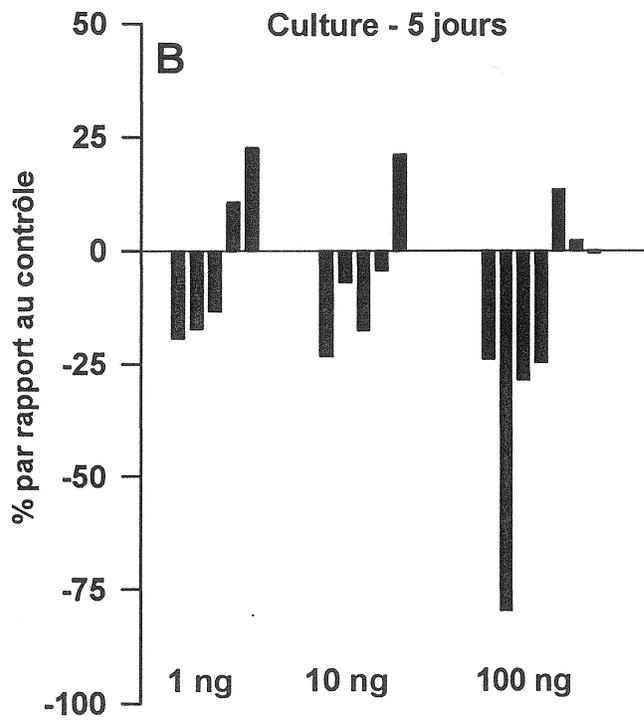
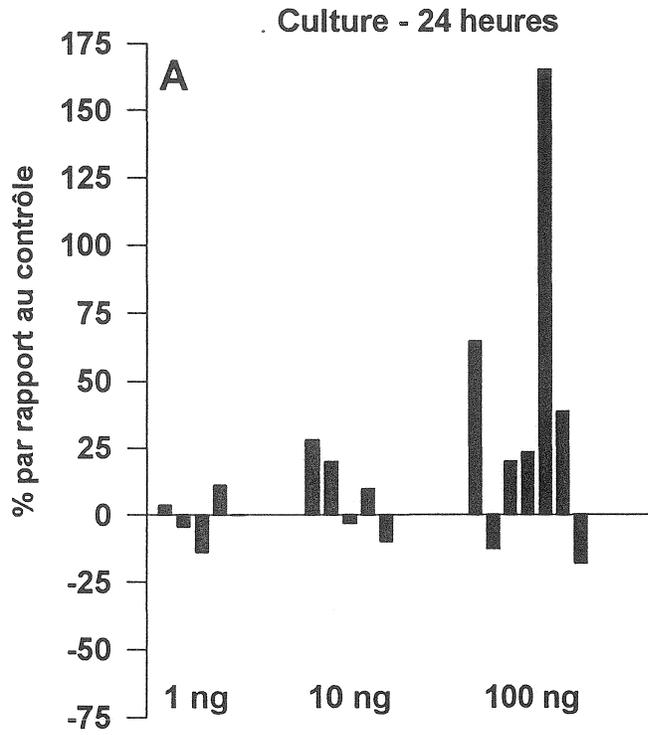
Nous avons déterminé l'influence de EGF sur la synthèse d'ADN en utilisant le modèle de culture organotypique. L'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN total a été effectuée durant les 6 dernières h de culture dans les explants contrôles ainsi que dans les explants traités avec 1, 10 et 100 ng/ml de EGF. Durant 24 h de culture (Figure 4A), la présence de 1 ng/ml de EGF n'a pas affecté la synthèse d'ADN. Cependant, l'addition de 10 et 100 ng/ml a induit une augmentation de l'incorporation du précurseur radioactif dans l'ADN dans 3 des 5 cultures et dans 5 des 7 cultures (36.2%;  $p < 0.05$ ), respectivement, lorsque comparées à leurs contrôles. En présence continue de EGF sur une période de 5 jours (Figure 4B), la synthèse d'ADN a été principalement diminuée dans toutes les cultures à toutes les concentrations utilisées.

## 3. Effet de EGF sur la synthèse des glycoprotéines

L'influence de EGF sur la synthèse des glycoprotéines a été déterminée par l'incorporation de glucosamine tritiée durant les 6 dernières h de culture

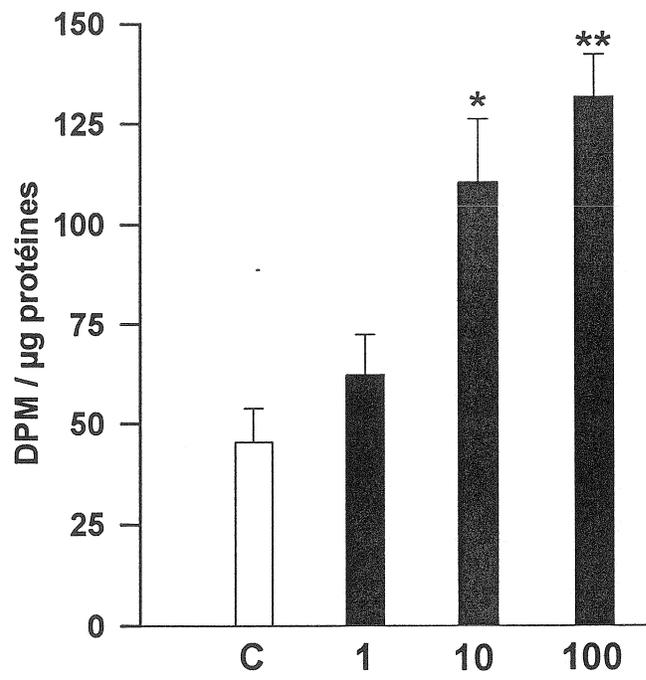
**Figure 4. Effet de EGF sur la synthèse d'ADN.**

Incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN durant les 6 dernières heures de culture, dans des cultures de 24 heures (A) et de 5 jours (B) en absence et en présence de EGF (1, 10 et 100 ng/ml). Pour chaque culture, l'incorporation est exprimée en désintégrations par minute/microgramme d'ADN et illustrée en pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport au contrôle respectif.



**Figure 5. Effet de EGF sur la synthèse des glycoprotéines.**

L'incorporation de glucosamine tritiée dans les glycoprotéines durant les 6 dernières heures de culture de 24 heures en absence (C, contrôle) et en présence de EGF (1, 10 et 100 ng/ml). Les valeurs sont exprimées en désintégrations par minute/ $\mu$ g de protéines  $\pm$  écart-type à la moyenne (n=6). \* P < 0.02, \*\* P < 0.002.



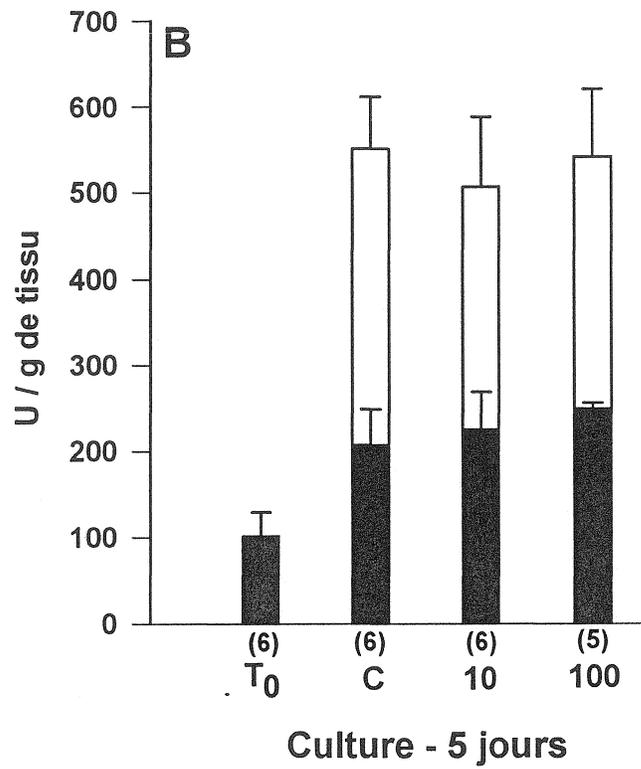
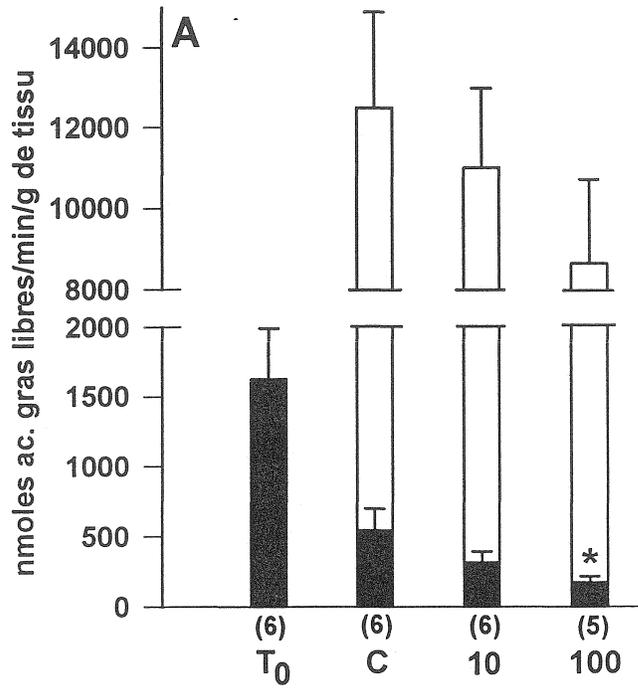
dans les explants contrôles ainsi que dans les explants traités avec 1, 10 et 100 ng/ml de EGF (Figure 5). Après 24 h de culture, de fortes augmentations significatives dans l'incorporation du précurseur radioactif ont été notées en présence de 10 et 100 ng/ml de EGF (143.3% et 190.1% respectivement) comparées aux valeurs contrôles.

#### 4. Effet de EGF sur les activités enzymatiques

Des explants gastriques foetaux humains ont été cultivés jusqu'à 5 jours en absence ou en présence de 1, 10 et 100 ng/ml de EGF, et les activités de la lipase et de la pepsine ont été déterminées dans les explants ainsi que dans les milieux de culture (Figure 6A et 6B). Dans les explants contrôles, l'activité totale (tissu + milieu) pour les deux enzymes augmente significativement (7.4 fois pour la lipase et 5.4 fois pour la pepsine) durant la culture lorsque comparée au tissu au début de la culture. L'addition de 100 ng/ml de EGF a induit une diminution significative (73%) de l'activité tissulaire de la lipase après 5 jours de culture en comparaison aux explants contrôles (Figure 6A) alors que l'activité est demeurée stable dans le milieu. Cependant, aucune variation significative de l'activité pepsine a été observée après l'ajout de EGF (Figure 6B) tant dans le tissu que dans le milieu. La diminution de l'activité tissulaire de la lipase induite par EGF s'est produite entre le deuxième et le cinquième jour de culture puisque

**Figure 6. Effet de EGF sur les fonctions digestives.**

Les activités de la lipase (A) et de la pepsine (B) dans les explants gastriques (■) et les milieux de culture (□), au début de la culture (T<sub>0</sub>) et après 5 jours de culture en absence (C, contrôle) et en présence de EGF (10 et 100 ng/ml). Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'expériences. Les résultats sont exprimés comme étant la moyenne ± écart-type à la moyenne. \* P < 0.05.



l'activité de la lipase est demeurée constante dans les explants contrôles cultivés pendant 24 h (résultats non présentés).

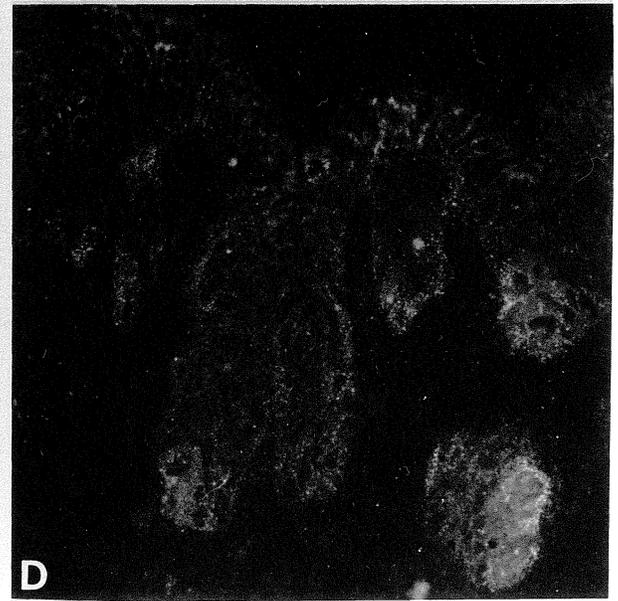
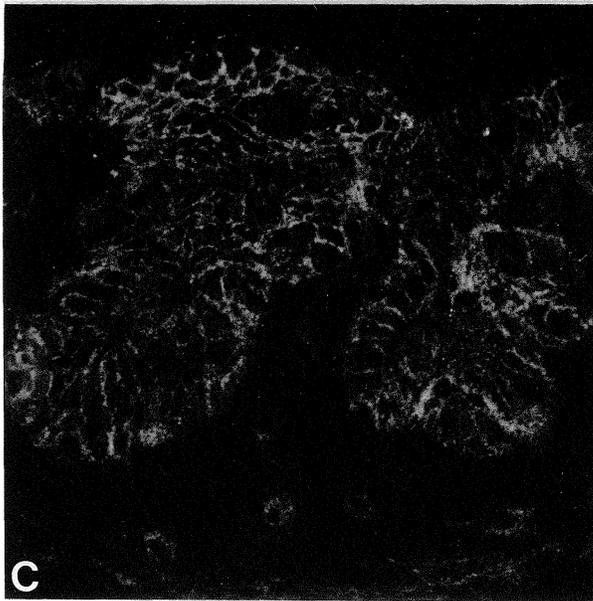
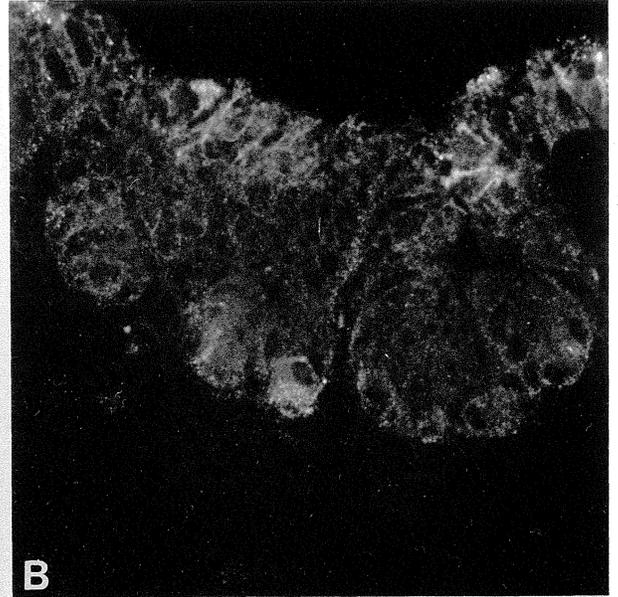
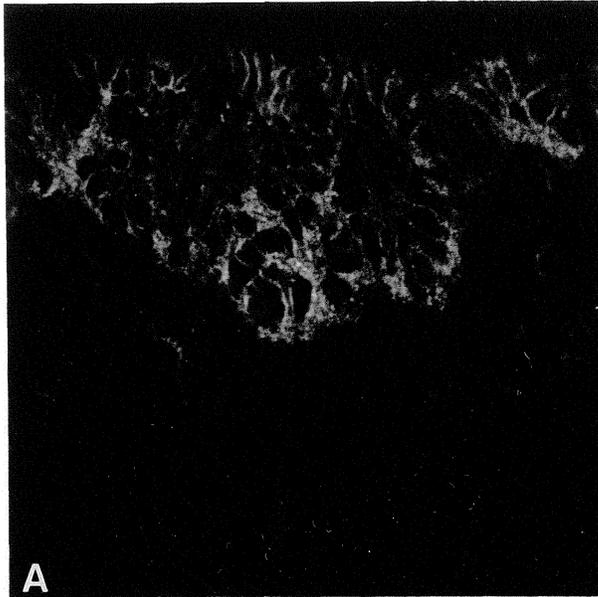
### C) Effet des IGFs et de l'insuline dans la modulation du développement

#### 1. Localisation des récepteurs de IGF-1 et de l'insuline

Tout comme pour EGF, l'expression de récepteurs spécifiques est essentielle pour que les modulateurs puissent agir sur les fonctions digestives. La localisation par immunofluorescence des récepteurs de IGF-1 (Figure 7A, 7C) et de l'insuline (Figure 7B, 7D) a été effectuée sur des spécimens âgés de 16 et 20 semaines de gestation. A la 16<sup>ème</sup> semaine, les récepteurs de IGF-1 (Figure 7A) et de l'insuline (Figure 7B) sont présents dans les membranes basolatérales de cellules épithéliales de la muqueuse gastrique. Au cours de la période étudiée, la distribution cellulaire des deux récepteurs demeure largement inchangée même si la structure glandulaire s'est développée et que l'épithélium muqueux de surface s'est différencié (Figure 7B, 7D).

**Figure 7. Expression et distribution des récepteurs IGF-1 et de l'insuline dans la muqueuse gastrique en développement.**

Micrographie en immunofluorescence indirecte de coupes en congélation des régions du corps d'estomac foetal à 16 (A-B) et 20 (C-D) semaines de gestation marquées avec des anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs IGF-1 et de l'insuline. De 16 à 20 semaines, les deux récepteurs ont été localisés à la membrane basolatérale de toutes les cellules des épithéliums de surface et glandulaire (agrandissement original 188 X pour A à D).



## 2. Effets des IGFs et de l'insuline sur la synthèse d'ADN

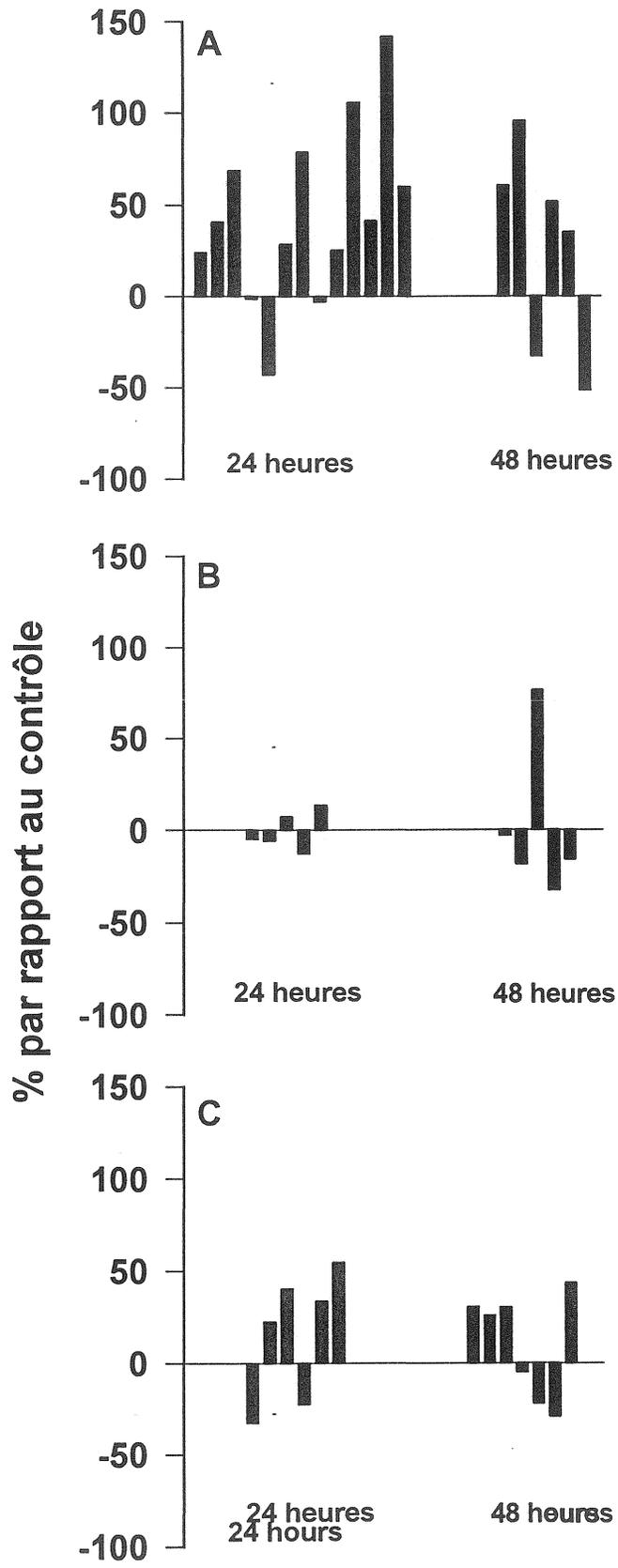
Les effets de IGFs et de l'insuline sur la synthèse d'ADN ont été déterminés par l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN total durant les 6 dernières h de culture dans les explants contrôles ainsi que dans les explants cultivés en présence de 50 ng/ml de IGF-1 (Figure 8A), 100 ng/ml de IGF-2 (Figure 8B) ou 30  $\mu$ U/ml d'insuline (Figure 8C). Après 24 h de culture, la présence de 50 ng/ml de IGF-1 a augmenté significativement l'incorporation du précurseur radioactif dans l'ADN dans 10 des 13 cultures comparativement aux contrôles respectifs. Aucune variation significative de la synthèse d'ADN a été observée en présence soit de 100 ng/ml de IGF-2 ou de 30  $\mu$ U/ml d'insuline. Après 48 h de culture en présence de IGF-1, la synthèse d'ADN augmentée est maintenue dans 4 des 6 cultures.

## 3. Autoradiographie et index de marquage

Afin de déterminer les sites de l'incorporation de la thymidine tritiée dans l'épithélium, des explants de 3 spécimens différents ont été préparés pour l'autoradiographie. L'intégrité morphologique des explants a toujours été préservée en culture et non affectée par la présence de IGF-1. L'autoradiographie a révélée que les noyaux marqués sont principalement retrouvés dans la région du collet des glandes gastriques en formation (Figure

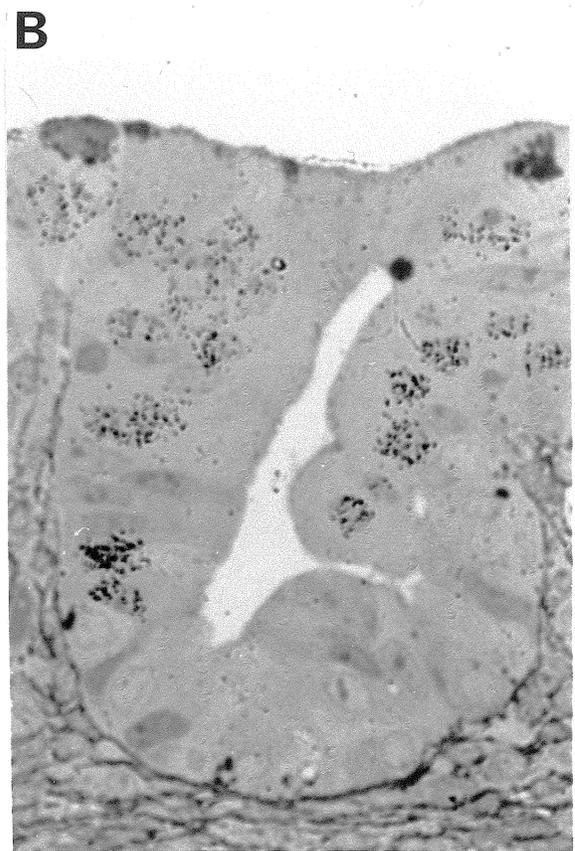
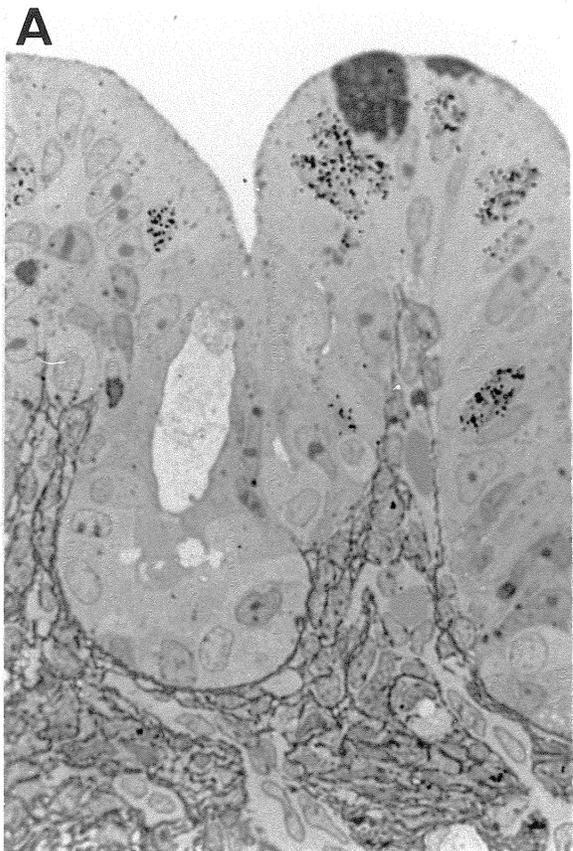
**Figure 8. Effets des IGFs et de l'insuline sur la synthèse d'ADN.**

L'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN durant les 6 dernières heures de culture, dans des cultures de 24 et 48 heures en absence et en présence de IGF-1 (A), IGF-2 (B) et d'insuline (C) (50 ng, 100 ng et 30  $\mu$ U/ml, respectivement). Pour chaque culture, l'incorporation est exprimée en désintégrations par minute/ $\mu$ g d'ADN et illustrée en pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport au contrôle respectif.



**Figure 9. Autoradiographie de l'incorporation de thymidine tritiée induite par IGF-1 dans la muqueuse gastrique.**

Autoradiographie d'explants gastriques cultivés pendant 24 heures en absence (A) et en présence de 50 ng/ml de IGF-1 (B). La thymidine tritiée a été ajoutée durant les 6 dernières heures de culture. La présence de IGF-1 a augmenté les noyaux marqués (42%) exclusivement au niveau de l'épithélium gastrique. Agrandissement 300 X pour A, 235 X pour B.



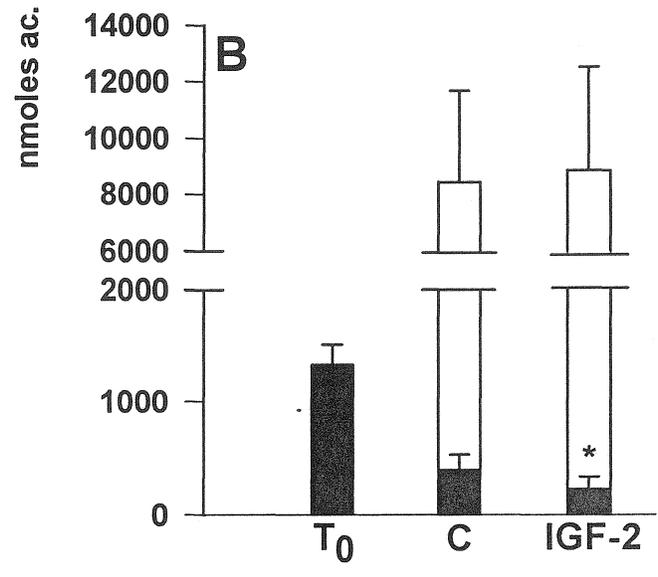
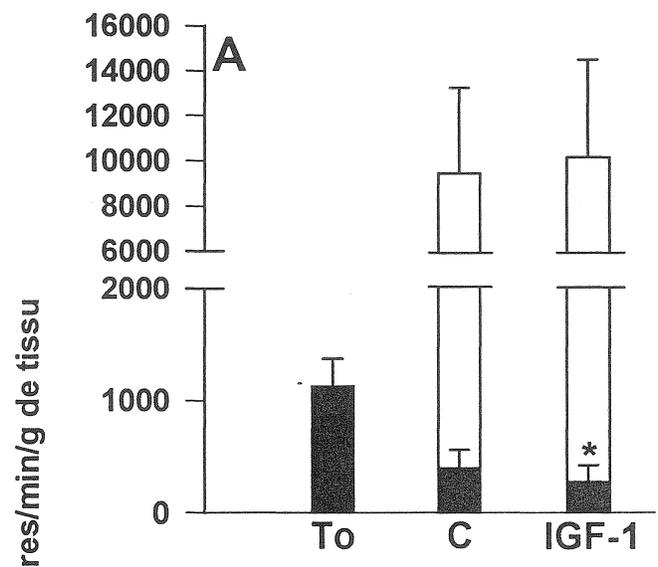
9B). L'addition de IGF-1 aux explants gastriques a induit une augmentation significative (42%) de l'index de marquage des cellules épithéliales comparativement aux explants non traités (Figure 9A) (contrôle: 17.9%; IGF-1: 25.6%;  $p < 0.005$ )

#### 4. Effets des IGFs et de l'insuline sur les activités enzymatiques

Des explants gastriques ont été cultivés jusqu'à 5 jours en absence ou en présence de 50 ng/ml de IGF-1, 100 ng/ml de IGF-2 ou 30  $\mu$ U/ml d'insuline, et les activités enzymatiques ont été déterminées dans les explants ainsi que dans les milieux de culture (Figure 10 et 11). Dans les explants contrôles, l'activité totale (tissu + milieu) des deux enzymes a augmenté significativement (7.4 fois pour la lipase et 8.1 fois pour la pepsine) durant la culture comparativement au tissu en début de culture. Après 48 h de culture, aucune variation des activités enzymatiques a été observé en présence de l'un des facteurs (résultats non présentés). D'autre part, après 5 jours de culture, une diminution de l'activité tissulaire de la lipase a été observée en présence continue de IGF-1 (31.8%; Figure 10A) ainsi que IGF-2 (42.3%; Figure 10B). Cependant, les activités de la pepsine n'ont pas été influencées par la présence de ces deux facteurs (Figure 11A et 11B). L'insuline n'a pas affecté ni l'activité de la lipase ni celle de la pepsine durant les mêmes périodes de culture (résultats non présentés).

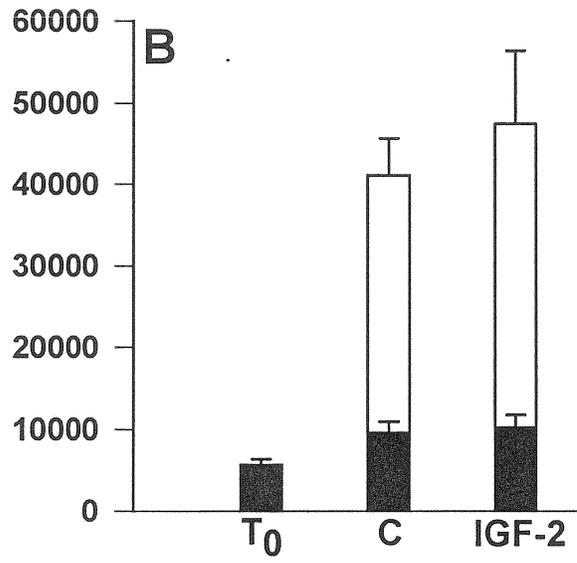
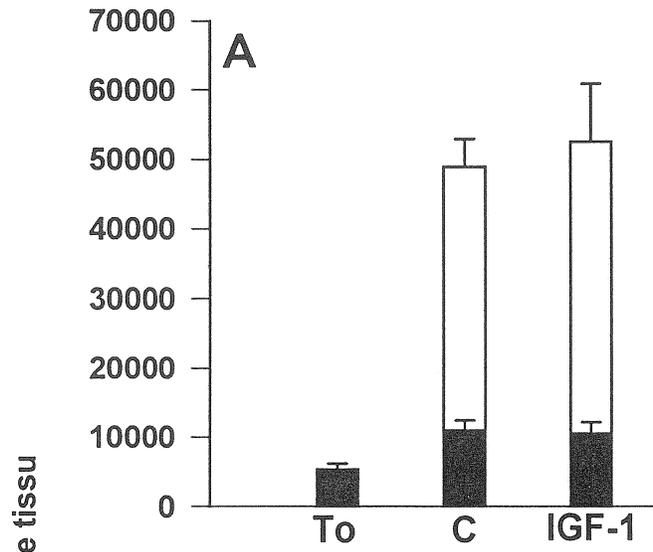
**Figure 10. Effets des IGFs sur l'activité de la lipase gastrique.**

L'activité de la lipase dans les explants gastriques (■) et les milieux de culture (□), au début de la culture (T<sub>0</sub>) et après 5 jours de culture en absence (C, contrôle) et en présence de IGF-1 (A) et de IGF-2 (B) (50 et 100 ng/ml, respectivement). Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'expériences. Les résultats sont exprimés comme étant la moyenne ± écart-type à la moyenne. \* P < 0.025.



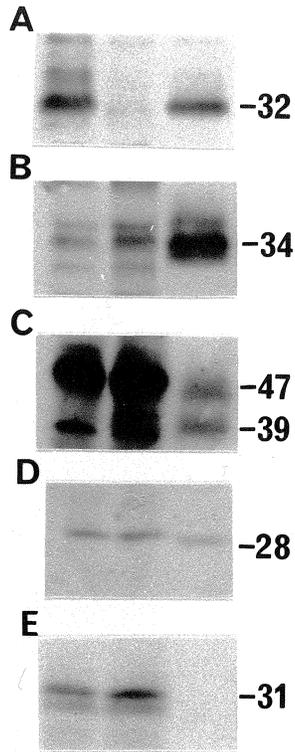
**Figure 11. Effets des IGFs sur l'activité de la pepsine.**

L'activité de la pepsine dans les explants gastriques (■) et les milieux de culture (□), au début de la culture ( $T_0$ ) et après 5 jours de culture en absence (C, contrôle) et en présence de IGF-1 (A) et de IGF-2 (B) (50 et 100 ng/ml, respectivement). Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'expériences. Les résultats sont exprimés comme étant la moyenne  $\pm$  écart-type à la moyenne.

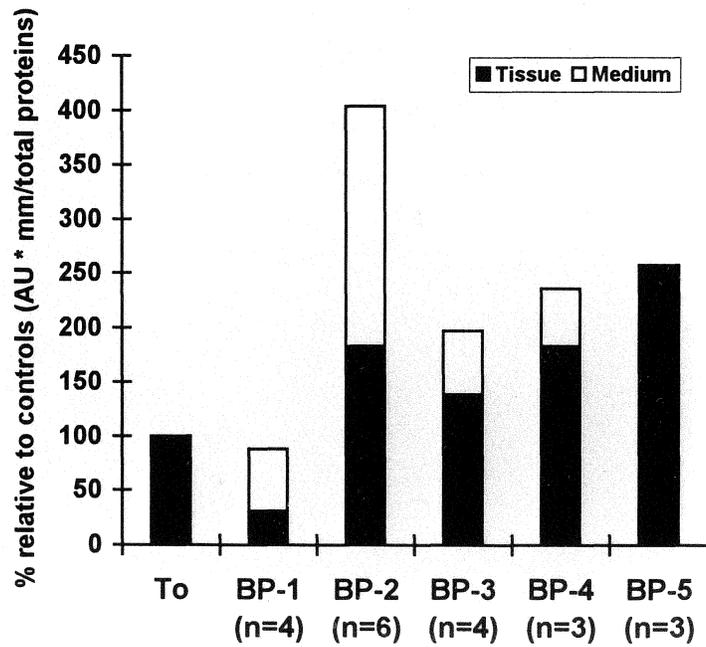


**Figure 12. Profils de synthèse et de sécrétion des IGFBPs dans l'estomac foetal en culture.**

Analyse par immunobuvardage représentative de l'expression de IGFBP-1 (A), -2 (B), -3 (C), -4 (D) et -5 (E) dans des explants gastriques au début de la culture ( $T_0$ ; couloir de gauche) et cultivés pendant 24 heures ( $T_C$ ; couloir du centre), ainsi que dans les milieux de culture ( $M_C$ ; couloir de droite). La quantité de protéines a été mesurée et ensuite les protéines totales (180-200  $\mu\text{g/puits}$ ) ont été séparées par SDS-PAGE, électrotransférées sur membrane de nitrocellulose, et par la suite sondées avec les anticorps respectifs. Les résultats ont montré que différents patrons de synthèse et de sécrétion des IGFBPs dans la muqueuse gastrique en développement. F) niveaux relatifs de protéines des IGFBPs dans les explants gastriques (■) et les milieux de culture (□).  $T_0$  représente les niveaux de protéines dans les explants gastriques non cultivés. Les niveaux relatifs de protéines ont été mesurés en unités arbitraire ( $\text{AU} \cdot \text{mm}^{-1}$ ) par les valeurs des analyses densitométriques des autoradiogrammes des expériences d'immunobuvardage, et ensuite normalisés à la quantité totale de protéines (pour l'immunobuvardage, les valeurs sont rapportées en  $\text{AU} \cdot \text{mm}^{-1}$  par protéines totales/mg de tissu) et exprimées en pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport à la valeur contrôle respective ( $T_0 = 100\%$ ). Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'expériences.



**F**



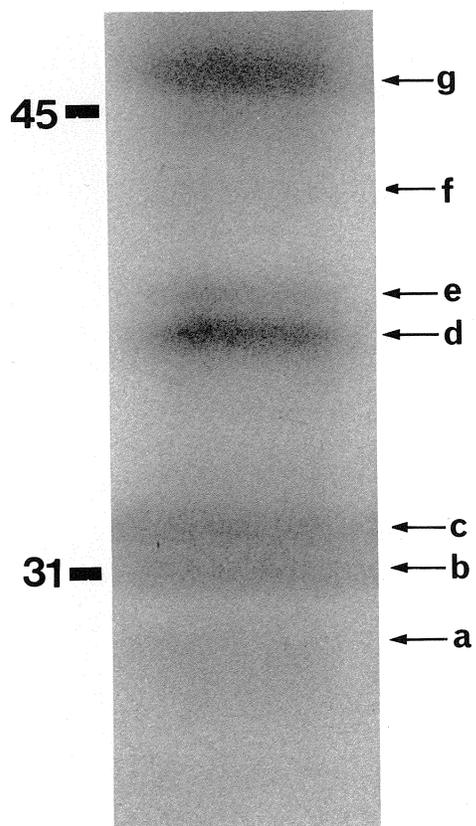
## D) Synthèse et sécrétion des IGFs

### 1. Synthèse et sécrétion des IGFs

A la lumière des résultats obtenus avec les IGFs sur la prolifération cellulaire, c'est-à-dire que IGF-1 stimule la synthèse d'ADN après 24 h de culture alors que IGF-2 demeure sans effet, nous nous sommes intéressés à savoir si cet effet et/ou ce non-effet des IGFs pouvaient être le résultat d'une modulation par les IGFs. Tout d'abord, la présence et les quantités relatives des IGFs ont été déterminées par immunobuvardage dans des explants gastriques cultivés pendant 24 h ainsi que dans les milieux de cultures respectifs. Les analyses par immunobuvardage à l'aide de 5 anticorps polyclonaux ont révélées que les IGFs-1 à -5 sont présentes dans l'estomac foetal humain (Figure 12A-12E). De plus, des comportements différents ont été observés en culture (voir Figure 12F). Les quantités totales relatives (tissu + milieu) de toutes les IGFs ont augmenté comparées à leurs  $T_0$  respectifs à l'exception de IGFs-1 (32 kDa; Figure 12A). En effet, les niveaux de IGFs-1 (tissu + milieu) sont demeurés similaires au  $T_0$  suggérant que la production de IGFs-1 n'est pas augmentée en culture ou que celle-ci ne provient peut-être pas de l'estomac mais de la circulation. Une autre observation intéressante est que IGFs-5 ( $\approx 31$  kDa; Figure 12E) n'a pas été sécrétée ou relâchée dans le milieu de culture comparativement aux autres IGFs. Pour les IGFs-2, -3 et -4 (32, 47 et 39, 28 kDa respectivement; Figure 12 B-12D), une augmentation

**Figure 13. Évaluation de la capacité de liaison des IGFBPs aux IGFs dans l'estomac.**

Analyse par immunobuvardage par ligand représentative de la liaison de IGF-1 aux IGFBPs présentes dans un tissu foetal gastrique âgé de 17 semaines de gestation. Les protéines totales ont été séparées par SDS-PAGE en conditions non-réductrices, électrotransférées sur membrane de nitrocellulose, puis incubées en présence de IGF-1 (200 ng/ml) et finalement sondée avec l'anticorps dirigé contre le peptide. La présence de six IGFBPs pouvant lier les IGFs a été détectée dans la muqueuse gastrique foetale humaine.



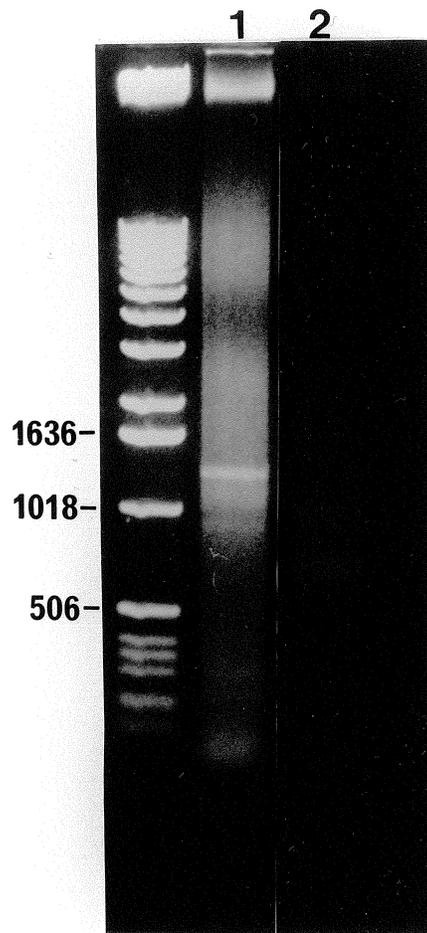
des niveaux de protéines totales (tissu + milieu) a été observée, et elles ont toutes été sécrétées ou relâchées dans le milieu. Parmi toutes les IGFbps, la plus forte augmentation des niveaux de protéines a été celle de IGFbp-2. Ces résultats démontrent que l'estomac foetal humain peut être une source de IGFbps et suggère une interaction possible de ces IGFbps avec les IGFs.

## 2. Capacité de liaison des IGFbps

Afin de déterminer si les IGFbps ont la capacité de lier les IGFs, des analyses par immunobuvardage par ligand ont été effectuées sur des protéines totales de tissus gastriques âgés entre 15 et 17 semaines de gestation. Tel que présenté à la Figure 13, IGF-1 s'est lié à plusieurs protéines de poids moléculaires différents. L'analyse de ces différentes protéines a révélé que les poids moléculaires correspondaient avec ceux des IGFbps. En effet, l'analyse par immunobuvardage par ligand a révélé six bandes majeures: 28, 30, 31, 34, 36 et un doublet à 39 et 47 kDa. Ces poids moléculaires correspondent à ceux observés précédemment par immunobuvardage à la Figure 12. La bande à 36 kDa correspond au poids moléculaire de IGFbp-6 qui a déjà été rapporté (Remacle-Bonnet et al., 1995). D'après ces résultats, les IGFbps ont la capacité de se lier aux IGFs dans la muqueuse gastrique humaine en développement. Les mêmes résultats ont été obtenus lorsque IGF-2 a été utilisé à la place de IGF-1 (résultats non présentés).

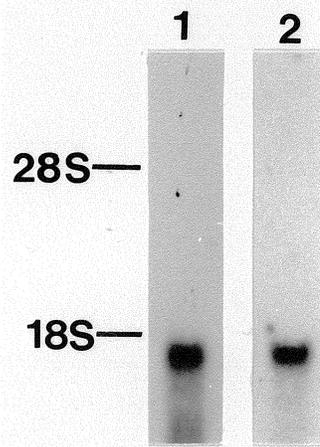
**Figure 14. Amplification du cDNA de la lipase gastrique par RT-PCR.**

Un seul fragment d'ADN de 1311-bp du gène de la lipase gastrique a été amplifié en utilisant l'ARN total d'un spécimen d'estomac foetal humain de 17 semaines (couloir 1) par RT-PCR. Le produit amplifié a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose et visualisé avec le bromure d'éthidium. Dans le couloir 2, la transcriptase inverse a été omise dans la procédure d'amplification.



**Figure 15. Évaluation de l'expression de la lipase gastrique par hybridation Northern.**

Les ARN poly(A<sup>+</sup>) (couloir 1; 1 µg) et total (couloir 2; 20 µg) extraits d'un estomac foetal de 18 semaines ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1%-formaldéhyde 2.2 M, transférés sur une membrane de nylon et hybridés avec la sonde de cDNA de la lipase gastrique marquée au <sup>32</sup>P. L'hybridation Northern a permis d'identifier un seul transcrit d'environ 1.6 kb et ce dans les deux cas.



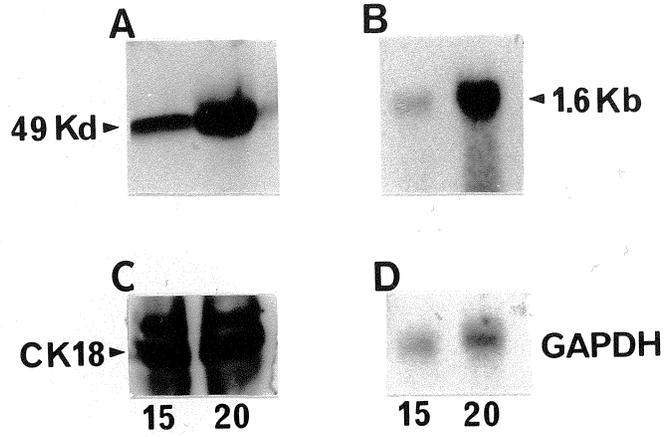
## E) Régulation de l'expression de la lipase gastrique humaine

### 1. Profil ontogénique de l'expression de la lipase

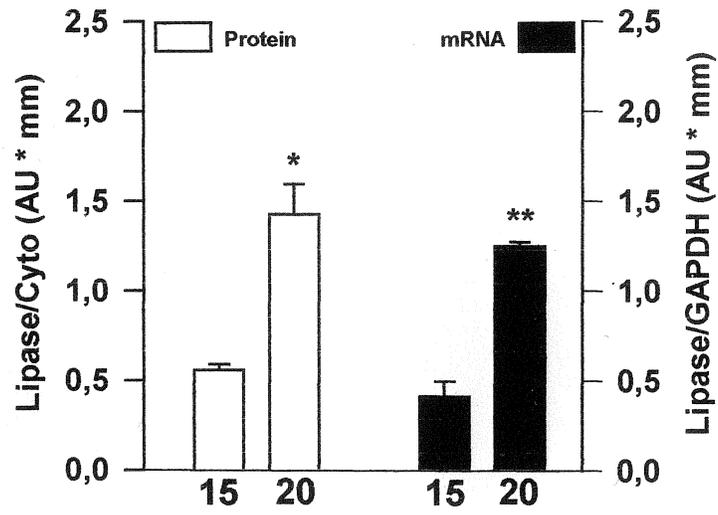
L'expression de la lipase au cours du développement a été étudiée aux niveaux de la protéine et de l'ARNm. Premièrement, l'amplification du cDNA par PCR de l'ARN extrait d'un estomac foetal de 17 semaines en utilisant les amorces spécifiques a généré le fragment de cDNA de 1311 bp (Figure 14). L'analyse de la séquence nucléotidique dans la banque de données EMBL/Genbank a permis de vérifier que les 700 bp du produit d'amplification par PCR étaient homologues à 100% à la lipase gastrique humaine (numéro ID: A12714). De plus, les digestions par HindIII et BstX1 du fragment cloné ont résulté dans les fragments prévus de 938 et 376 bp, 236 et 1078 bp, respectivement (résultats non présentés), confirmant que le fragment spécifique de cDNA a bel et bien été amplifié. Deuxièmement, la présence d'ARN messagers de la lipase a été démontré par hybridation Northern sur de l'ARNm poly(A)<sup>+</sup> et total purifié d'un estomac foetal de 20 semaines en utilisant une sonde DNA préparé à partir du fragment de 1.3 kb obtenu par l'amplification par PCR. Un seul transcrit d'environ 1.6 kb a été identifié dans les deux cas (Figure 15, couloir 1: ARNm poly(A)<sup>+</sup>; couloir 2: ARNm total). En effet, Bodmer et al. (1987) ont rapporté la même taille pour le transcrit de la lipase gastrique humaine en utilisant une sonde provenant du cDNA de la lipase linguale de rat sur des tissus gastriques humains.

**Figure 16. Profil ontogénique de l'expression de la lipase.**

**A et C:** analyse par immunobuvardage représentative de l'expression de la lipase gastrique (A) et de la cytokératine-18 (C) dans des tissus gastriques âgés de 15 et 20 semaines de gestation. Les protéines totales ont été séparées par SDS-PAGE et électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose, et ensuite sondées avec l'anti-HGL et l'anticorps monoclonal CY-90, lesquels ont révélé la lipase gastrique et la cytokératine-18. **B et D:** analyse par hybridation Northern représentative de l'expression de l'ARNm de la lipase (B) et du GAPDH (D) dans des tissus gastriques foetaux âgés de 15 et 20 semaines de gestation. L'ARN total (20 µg/puits) a été premièrement dénaturé et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant 2.2 M formaldéhyde, puis transféré sur une membrane de nylon et finalement hybridé avec les sondes de cDNA de la lipase et du GAPDH. **E:** niveaux relatifs de protéines et de l'ARNm de la lipase lors du développement. Les niveaux de protéines et d'ARNm de la lipase sont exprimés en unités arbitraire (AU) par les valeurs des analyses densitométriques des autoradiogrammes des expériences d'immunobuvardage et d'hybridation, après normalisation aux signaux de la cytokératine et du GAPDH, respectivement. Les valeurs représentent les moyennes ± écart-type à la moyenne de 5 (protéines) et 3 (ARNm) spécimens de chaque âge respectivement. Les différences statistiques significatives entre les spécimens âgés de 20 semaines comparée à ceux de 15 semaines sont indiquées. (\*  $P < 0.005$  , \*\*  $P < 0.01$ ).

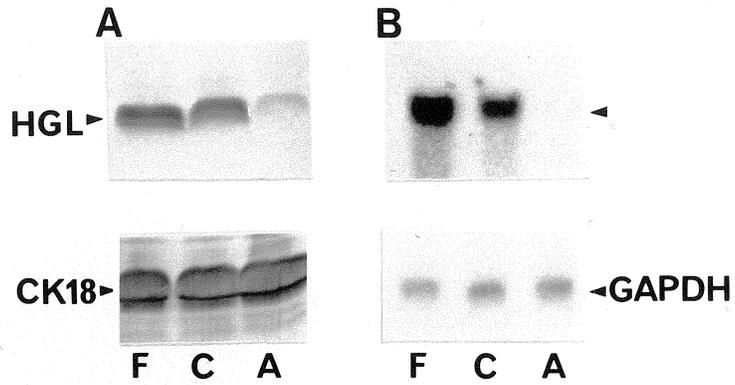


**E**

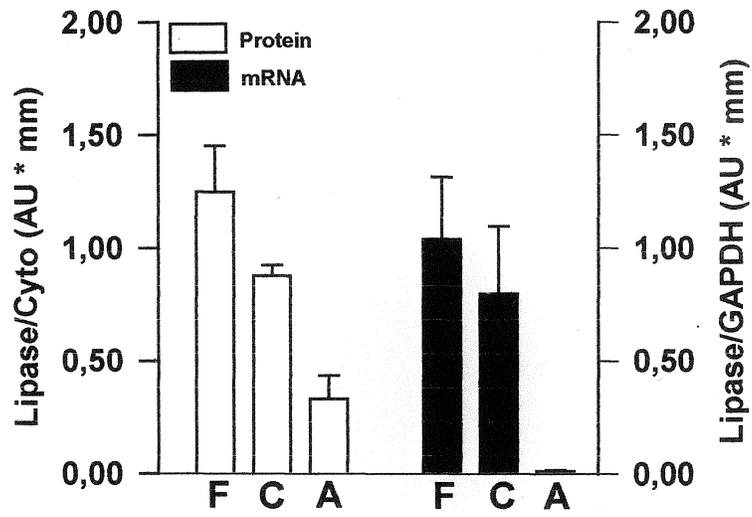


**Figure 17. Répartition topographique de l'expression de la lipase gastrique dans l'estomac.**

**A:** analyse par immunobuvardage représentative de l'expression de la lipase gastrique et de la cytokératine-18 dans le fundus (F), le corps (C) et l'antrum pylorique (A) de l'estomac foetal humain. Les protéines totales ont été séparées par SDS-PAGE et électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose, et ensuite sondées avec l'anti-HGL et l'anticorps monoclonal CY-90, lesquels ont révélé la lipase gastrique et la cytokératine-18. **B:** analyse par hybridation Northern représentative de l'expression de l'ARNm de la lipase (B) et du GAPDH (D) dans le fundus (F), le corps (C) et l'antrum pylorique (A) de l'estomac foetal humain. L'ARN total (20 µg/puits) a été premièrement dénaturé et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant 2.2 M formaldéhyde, puis transféré sur une membrane de nylon et finalement hybridé avec les sondes de cDNA de la lipase et du GAPDH. **C:** niveaux relatifs de protéines et de l'ARNm de la lipase dans les différentes régions (fundus, corps et l'antrum pylorique) de l'estomac foetal. Les niveaux de protéines et d'ARNm de la lipase sont exprimés en unités arbitraire (AU) par les valeurs des analyses densitométriques des autoradiogrammes des expériences d'immunobuvardage et d'hybridation, après normalisation aux signaux de la cytokératine et du GAPDH, respectivement. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type à la moyenne de 4 spécimens indépendants et séparés (protéines et ARNm).



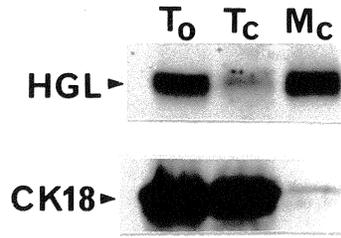
**C**



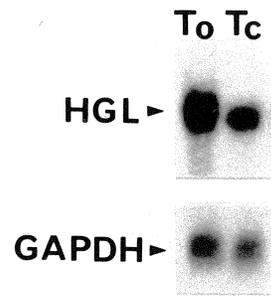
**Figure 18. Expression de la lipase gastrique en culture.**

A: analyse par immunobuvardage représentative de l'expression de la lipase gastrique et de la cytokératine-18 dans des explants gastriques au début de la culture ( $T_0$ ), après 24 heures de culture ( $T_c$ ) et dans le milieu de culture ( $M_c$ ). Les protéines totales ont séparées par SDS-PAGE et électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose, et ensuite sondées avec l'anti-HGL et l'anticorps monoclonal CY-90, lesquels ont révélé la lipase gastrique et la cytokératine-18. B: analyse par hybridation Northern représentative de l'expression de l'ARNm de la lipase et du GAPDH dans des explants gastriques foetaux au début de la culture ( $T_0$ ), après 24 heures de culture ( $T_c$ ). L'ARN total (20  $\mu$ g/puits) a été premièrement dénaturé et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant 2.2 M formaldéhyde, puis transféré sur une membrane de nylon et finalement hybridé avec les sondes de cDNA de la lipase et du GAPDH. C: niveaux relatifs de protéines et de l'ARNm de la lipase dans les explants gastriques foetaux au début de la culture ( $T_0$ ), après 24 heures de culture ( $T_c$ ) et dans le milieu de culture ( $M_c$ ; protéines seulement). Les niveaux de protéines et d'ARNm de la lipase sont exprimés en unités arbitraire (AU) par les valeurs des analyses densitométriques des autoradiogrammes des expériences d'immunobuvardage et d'hybridation, après normalisation aux signaux de la cytokératine et du GAPDH, respectivement. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type à la moyenne de 3 cultures indépendantes et séparées aussi bien pour les protéines que l'ARNm.

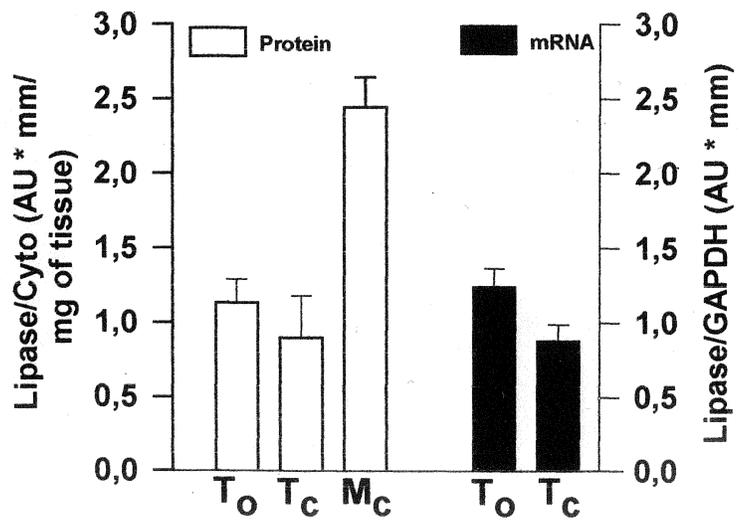
**A**



**B**



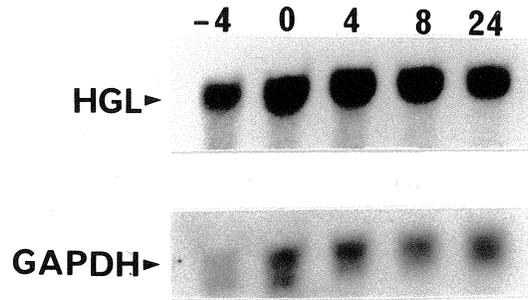
**C**



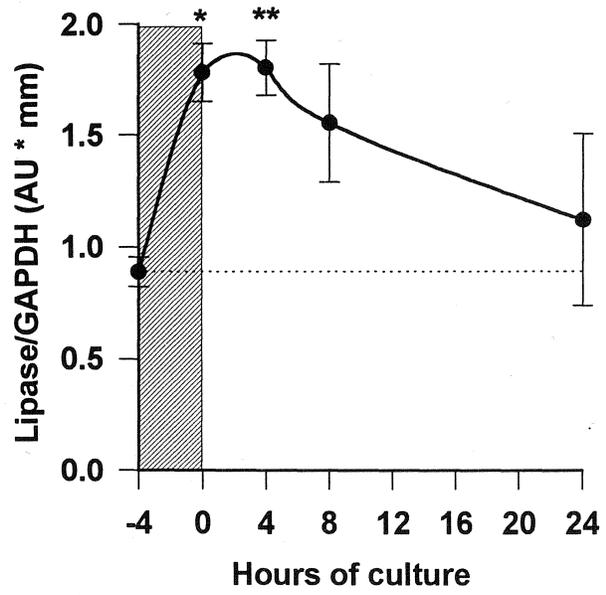
**Figure 19. Expression en fonction du temps de la lipase gastrique en culture.**

**A:** analyse par hybridation Northern représentative de l'expression de l'ARNm de la lipase et du GAPDH dans des explants gastriques à différents temps de culture (La zone hachurée en gris représente la période de stabilisation allouée aux explants gastriques). L'ARN total (20 µg/puits) a été premièrement dénaturé et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant 2.2 M formaldéhyde, puis transféré sur une membrane de nylon et finalement hybridé avec les sondes de cDNA de la lipase et du GAPDH. **B:** niveaux relatifs de l'ARNm de la lipase dans les explants gastriques foetaux lors des différents temps de culture. Les niveaux d'ARNm de la lipase sont exprimés en unités arbitraire (AU) par les valeurs des analyses densitométriques des autoradiogrammes des expériences par hybridation Northern, après normalisation au signal du GAPDH. Les valeurs représentent les moyennes ± écart-type à la moyenne de 3 cultures indépendantes et séparées.

**A**



**B**



Pour étudier le profil ontogénique d'expression de la lipase gastrique, des analyses par immunobuvardage et hybridation Northern ont été effectuées sur les protéines et ARNm totaux de tissus gastriques foetaux âgés de 15 et 20 semaines de gestation. Tel qu'illustré dans la Figure 16A, les niveaux d'expression de la protéine augmentent significativement d'environ 3 fois durant le développement. Au cours de la même période, une augmentation similaire a été observée pour les niveaux d'ARNm de la lipase (Figure 16B), détectée par la sonde de cDNA marquée au  $^{32}\text{P}$ . Les quantités relatives des protéines et des ARNm (Figure 16E) ont été mesurées par densitométrie au laser comparées aux niveaux de cytokératine-18 (Figure 16C) et du GAPDH (Figure 16D), respectivement, et ont confirmé l'augmentation graduelle de l'expression de la lipase au cours du développement.

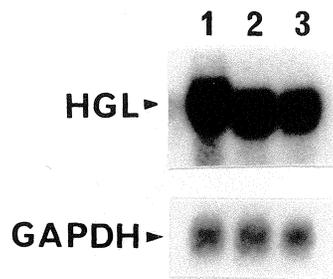
## 2. Régionalisation de l'expression de la lipase

Afin de mieux caractériser l'expression de la lipase, les quantités relatives de protéine et d'ARNm de la lipase ont été évaluées par immunobuvardage et par hybridation Northern dans les différentes régions de l'estomac entre 16 et 20 semaines de gestation (Figure 17). A tous les niveaux, protéine (Figure 17A) et ARNm (Figure 17B), un gradient décroissant d'expression a été noté allant du fundus jusqu'à l'antrum pylorique, avec un très faible niveau d'expression de la lipase dans l'antrum. Tel qu'illustré à la Figure 17C, nous pouvons observer une

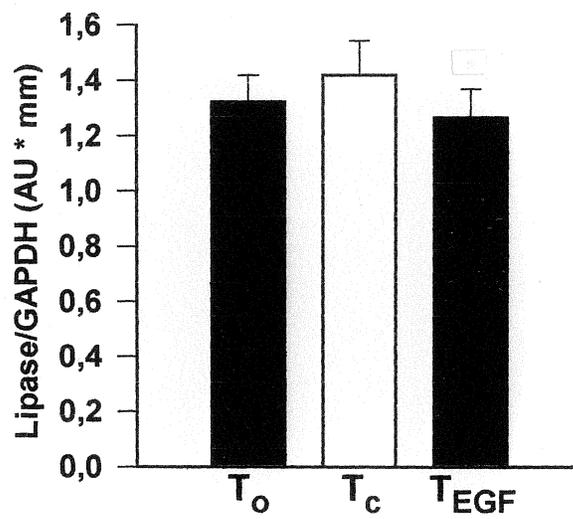
**Figure 20. Effet de EGF sur l'expression de la lipase en culture.**

A: analyse par hybridation Northern représentative de l'expression de l'ARNm de la lipase et du GAPDH dans des explants gastriques au début de la culture ( $T_0$ ; couloir 1), après 24 heures de culture en absence de EGF ( $T_c$ ; couloir 2) et en présence de 100 ng/ml EGF ( $T_{EGF}$ ; couloir 3), après une période de stabilisation de 4 heures. L'ARN total (20  $\mu$ g/puits) a été premièrement dénaturé et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant 2.2 M formaldéhyde, puis transféré sur une membrane de nylon et finalement hybridé avec les sondes de cDNA de la lipase et du GAPDH. B: niveaux relatifs de l'ARNm de la lipase dans les explants gastriques foetaux au début de la culture ( $T_0$ ), après 24 heures de culture en absence de EGF ( $T_c$ ) et en présence de 100 ng/ml EGF ( $T_{EGF}$ ). Les niveaux d'ARNm de la lipase sont exprimés en unités arbitraire (AU) par les valeurs des analyses densitométriques des autoradiogrammes des expériences par hybridation Northern, après normalisation au signal du GAPDH. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type à la moyenne de 3 cultures indépendantes et séparées.

**A**



**B**



excellente corrélation entre les niveaux protéiques et ceux des messagers de la lipase.

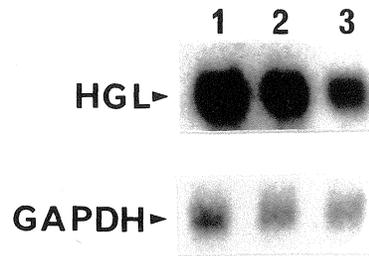
### 3. Expression de la lipase gastrique en culture

Afin de déterminer le comportement de l'activité lipase en culture organotypique, des explants gastriques ont été cultivés pendant 24 h dans un milieu sans sérum, et les quantités relatives de protéines et des messagers de la lipase ont été évaluées par immunobuvardage et par hybridation Northern (Figure 18). Au niveau protéique (Figure 18A), une augmentation significative ( $\approx 2.2$  fois) a été observée dans les niveaux totaux [quantités relatives du tissu ( $T_c$ ) + celles du milieu ( $M_c$ )] comparées au  $T_0$ . De plus, les analyses par immunobuvardage ont révélé qu'une grande quantité (41%) de lipase gastrique est sécrétée et accumulée dans le milieu de culture (Figure 18A et 18C). Les analyses par hybridation Northern ont révélé une diminution significative (29%;  $p < 0.02$ ) des niveaux d'ARNm de la lipase dans les tissus cultivés ( $T_c$ ) comparativement aux tissus non cultivés ( $T_0$ ) (Figure 18B).

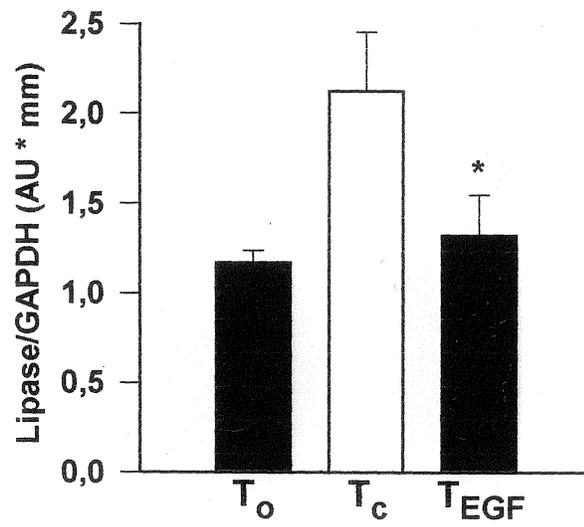
**Figure 21. Effet de EGF sur l'expression de la lipase en explantation directe.**

**A:** analyse par hybridation Northern représentative de l'expression de l'ARNm de la lipase et du GAPDH dans des explants gastriques au début de la culture ( $T_0$ ; couloir 1), après 8 heures de culture en absence de EGF ( $T_C$ ; couloir 2) et en présence de 100 ng/ml EGF ( $T_{EGF}$ ; couloir 3), sans période de stabilisation de 4 heures. L'ARN total (20  $\mu$ g/puits) a été premièrement dénaturé et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant 2.2 M formaldéhyde, puis transféré sur une membrane de nylon et finalement hybridé avec les sondes de cDNA de la lipase et du GAPDH. **B:** niveaux relatifs de l'ARNm de la lipase dans les explants gastriques foetaux au début de la culture ( $T_0$ ), après 8 heures de culture en absence de EGF ( $T_C$ ) et en présence de 100 ng/ml EGF ( $T_{EGF}$ ). Les niveaux d'ARNm de la lipase sont exprimés en unités arbitraire (AU) par les valeurs des analyses densitométriques des autoradiogrammes des expériences par hybridation Northern, après normalisation au signal du GAPDH. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type à la moyenne de 3 cultures indépendantes et séparées. (\*  $P < 0.025$ )

**A**



**B**



#### 4. Expression de la lipase gastrique en fonction du temps de culture

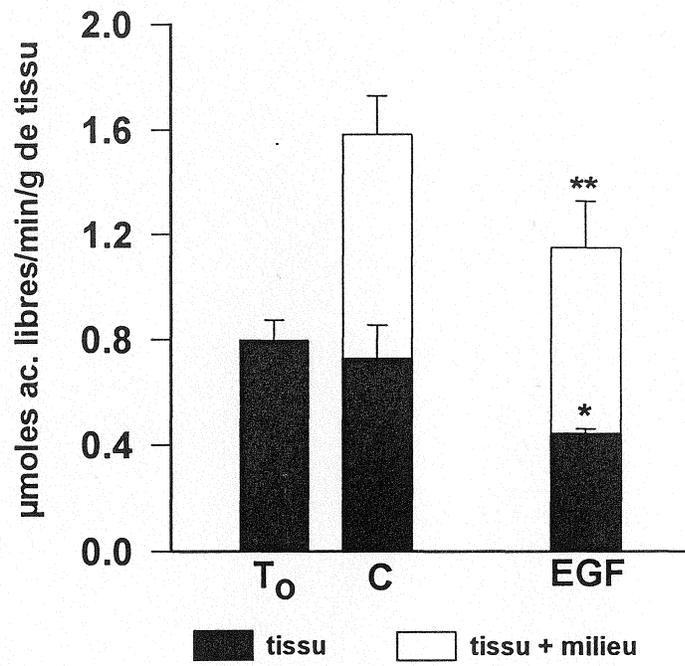
Afin de mieux caractériser l'expression de la lipase gastrique au cours de la période de culture, les quantités relatives de l'enzyme ont été déterminées par hybridation Northern à différents temps de culture. Tel qu'illustré dans la figure 19, les niveaux d'ARNm de la lipase augmentent rapidement durant les 4 premières h de culture (rectangle gris hachuré: -4 à 0). Ce laps de temps représente la période de stabilisation pour les explants gastriques. A ce moment, l'expression d'ARNm de la lipase a déjà atteint son plateau ( $\approx 2$  fois), mais 8 h plus tard les niveaux ont commencé à diminuer graduellement pour retourner au niveau de base après 24 h. Cette augmentation transitoire de l'expression de l'ARNm de la lipase au cours des premières h de culture semblent être en corrélation avec les niveaux de protéines, indiquant que l'expression de la lipase pourrait être régulée au niveau de l'ARNm.

#### 5. Effet de EGF sur l'expression de la lipase gastrique

Nous avons rapporté précédemment (paragraphe B, section 4) que EGF est capable de moduler l'activité de la lipase gastrique au cours du développement. Afin de déterminer à quel niveau EGF affecte l'expression de la lipase, les quantités relatives de l'ARNm de la lipase ont été mesurées dans des explants gastriques cultivés pendant 24 h avec ou sans EGF (100 ng/ml) dans

**Figure 22. Effet de EGF sur l'activité de la lipase en explantation directe.**

Les activités de la lipase dans les explants gastriques (■) et les milieux de culture (□), au début de la culture ( $T_0$ ), après 24 heures de culture en absence ( $T_C$ ) et en présence de 100 ng/ml EGF ( $T_{EGF}$ ), de 3 cultures indépendantes et séparées. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart-type à la moyenne de 3 cultures indépendantes et séparées. (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.007$ ).



un milieu sans sérum. Dans un premier temps, EGF a été ajouté aux explants après une période de stabilisation de 4 h, comme dans les expériences précédentes. Tel qu'illustré dans la Figure 20A, EGF a affecté modérément l'expression de la lipase, comparé au tissu contrôle, en diminuant les niveaux d'ARNm de 10% dans les tissus gastriques (Figure 20B). Cependant, cette régulation à la baisse de l'expression de la lipase après 24 h n'a pas été mesurée au niveau de l'activité tel que nous l'avions rapporté antérieurement dans les mêmes conditions.

Afin de préciser davantage le mécanisme d'action de EGF dans la modulation de l'expression de la lipase, les niveaux d'ARNm de la lipase ont été mesurés dans des explants gastriques cultivés pendant 8 h avec ou sans EGF 100 ng/ml appliqué directement au début de la culture (sans période de stabilisation), afin de déterminer si EGF était capable de bloquer l'augmentation transitoire de l'expression de la lipase. Tel qu'illustré dans la Figure 21A, l'augmentation transitoire des niveaux d'ARNm de la lipase qui s'est produite dans les tissus contrôles a complètement été inhibée par EGF, les niveaux d'ARNm de la lipase demeurant similaires à ceux du  $T_0$  (Figure 21B).

Afin de vérifier si la diminution des niveaux d'expression du messenger de la lipase induite par EGF a également affecté l'activité de la lipase, les niveaux d'activité ont été mesurés dans des explants ainsi que les milieux de culture après 24 h avec ou sans EGF 100 ng/ml sans période de stabilisation (Figure 22). Après 24 h de culture, l'activité totale de la lipase (tissu + milieu) a augmenté de  $\approx 2$  fois dans la culture contrôle, corrélant l'augmentation des

niveaux de protéines tel que mesuré par immunobuvardage (Figure 18C). En présence de EGF, une diminution significative (40%;  $p < 0.025$ ) de l'activité tissulaire de la lipase a été observée comparativement au tissu contrôle ( $T_c$ ). De plus, l'activité totale de la lipase a aussi diminué (27.5%;  $p < 0.05$ ) en présence de EGF, bien qu'aucune variation significative n'ait été détectée dans le milieu de culture.

## **IV. DISCUSSION**

### **A) Localisation de la lipase gastrique**

Dans ce premier volet, nous avons analysé la localisation au niveau cellulaire ainsi que subcellulaire de la lipase au cours du développement de la muqueuse gastrique humaine. Dans la muqueuse fundique adulte humaine, la lipase gastrique a été localisée exclusivement au niveau des cellules principales (Moreau et al., 1989). La spécificité de notre anticorps a été confirmée par l'identification d'une seule bande majeure de 49 kDa tel que prévue par des études antérieures (Moreau et al., 1989). Nos travaux ont montré que la lipase gastrique est présente dès la 13<sup>ème</sup> semaine de gestation dans les cellules épithéliales des glandes gastriques en formation, excepté dans la muqueuse de l'antra pylorique. L'absence de lipase dans la muqueuse de l'antra pylorique à ce stade du développement suggère que le patron de distribution dans les différentes régions anatomiques de l'estomac est établi plus précocement que nous l'avions rapporté précédemment (Ménard et al., 1995). Jusqu'à la 20<sup>ème</sup> semaine, les glandes gastriques continuent de croître, mais aucune variation dans les patrons d'expression de la lipase n'a été observée. Au niveau subcellulaire, les analyses ont révélé que la lipase gastrique est toujours détectée exclusivement dans les granules de sécrétion des cellules principales des glandes en formation, alors que les

cellules pariétales et à mucus ont toujours été négatives. Cette localisation cellulaire de la lipase gastrique est en accord avec celle rapportée dans les cellules principales de la muqueuse fundique adulte humaine (Moreau et al., 1989). Toutefois, la localisation cellulaire de la lipase diffère selon les espèces étudiées. En effet, chez le lapin, la lipase gastrique est localisée dans des cellules principales différentes de celles produisant la pepsine (Moreau et al., 1990), alors que chez le chien la lipase est produite par les cellules à mucus des foveolae (Carrière et al., 1992). Finalement, ce volet de l'étude a permis de corrélérer l'expression de la protéine avec les niveaux d'activité dans les différentes régions de l'estomac, et par le fait même d'établir que le patron de distribution de la lipase retrouvé chez l'adulte est déjà en place très tôt au cours du développement. De plus, cette étude apporte la preuve définitive que l'activité lipolytique mesurée dans des aspirats gastriques chez les enfants prématurés et à terme (Lee et al., 1993) origine bien de la muqueuse gastrique elle-même.

#### B) Effet de EGF sur la modulation du développement

Depuis la première étude sur l'effet biologique de EGF sur la maturation fonctionnelle de l'intestin de souris nouveau-née (Malo et Ménard, 1982), une attention considérable a été donnée quant aux implications possibles de EGF dans le développement foetal et postnatal du tractus

gastrointestinal chez les rongeurs (Johnson, 1985; Ménard et Calvert, 1991). Dans ces modèles, il a été montré que EGF stimule la synthèse d'ADN non seulement dans l'intestin mais aussi dans la muqueuse gastrique (Scheving et al., 1979; Dembinski et Johnson, 1985; Arsenault et Ménard, 1987; Kuwayama et al., 1994). Jusqu'à tout récemment, l'extrapolation de ces données à l'intestin humain en développement était matière à spéculation. L'application de la technique de culture organotypique sans sérum à l'intestin (Arsenault et Ménard, 1985; Ménard et al., 1988) et au côlon (Ménard et al., 1990) foetaux humains a permis la démonstration que EGF est capable de moduler la prolifération cellulaire et les fonctions digestives dans les deux segments immatures (intestin et côlon), quoique ceux-ci répondent différemment. Quant à savoir si EGF était aussi capable d'influencer le développement de la muqueuse gastrique humaine demeurait sans réponse. L'application avec succès de la culture organotypique sans sérum à la muqueuse gastrique foetale humaine (Ménard et al., 1993) nous offrait l'outil indispensable pour répondre à cette question.

L'expression de récepteurs spécifiques est un prérequis pour une action possible de EGF sur les fonctions gastriques. La présence de récepteurs EGF dans la muqueuse gastrique adulte humaine est bien établie (Beauchamp et al., 1989; Bennet et al., 1989; Pfeiffer et al., 1990). Récemment, la localisation exacte des récepteurs EGF parmi les différents types cellulaires de l'épithélium gastrique humain a été rapportée dans le cytoplasme basal et le long des membranes basolatérales des cellules

épithéliales de surface, des cellules des foveolae, des cellules à mucus du collet, et des cellules pariétales (Orsini et al., 1993). Des études par hybridation in situ ont aussi montré que tous les types cellulaires exprimaient le transcrit de l'ARNm du récepteur EGF. Dans notre étude nous avons utilisé une approche différente pour montrer la présence des récepteurs EGF dans la muqueuse gastrique humaine en développement. Les études par immunofluorescence ont montré que le récepteur EGF apparaît très tôt dans le développement (12<sup>ème</sup> semaine de gestation) et qu'ils sont largement distribués dans l'épithélium gastrique de surface et glandulaire en développement. Une localisation similaire des récepteurs EGF a été rapportée dans la muqueuse gastrique foetale humaine à l'aide de techniques par immunoperoxidase (Hormi et Lehy, 1994). Notre localisation par immunofluorescence du récepteur EGF montre clairement leur présence dans la partie basolatérale des cellules épithéliales. Cette localisation basolatérale des récepteurs EGF dans les cellules épithéliales gastriques est très similaire à celle rapportée dans l'intestin et le côlon foetal humain (Pothier et Ménard, 1988).

L'addition de EGF au milieu de culture a augmenté l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN total gastrique après 24 h de culture. En présence continue du facteur de croissance, la synthèse d'ADN a diminué après 5 jours. Une stimulation rapide de la prolifération cellulaire avait aussi été notée après l'addition de EGF à des explants de côlon foetal humain (Ménard et al., 1990). Cependant, une diminution de la prolifération cellulaire

s'était produite dans la même période de temps dans le jéjunum foetal (Ménard et al., 1988). Quoique les réponses différentes qui ont été rapportées dans l'intestin comparativement à celles du côlon et de l'estomac demeurent inexplicées, tous ces segments gastrointestinaux ont montré des diminutions similaires de la synthèse d'ADN après une exposition prolongée *in vitro* au EGF. L'effet de stimulation de EGF sur la synthèse d'ADN dans la muqueuse gastrique foetale humaine corrèle la synthèse d'ADN augmentée après une administration intrapéritonéale ou entérale de EGF chez les rongeurs adultes (Dembinski et Johnson, 1985) ou en période d'allaitement (Arsenault et Ménard, 1987). Ces résultats semblent suggérer que la prolifération de la muqueuse gastrique demeure sensible au EGF tout au long de la vie. Cependant, l'effet de stimulation de EGF sur la prolifération cellulaire dans la muqueuse gastrique adulte n'est pas encore documenté.

La présence de récepteurs EGF dans les types cellulaires dotés de différentes fonctions physiologiques nous a incité à étudier les effets du facteur de croissance sur la synthèse des glycoprotéines du mucus des cellules de l'épithélium de surface ainsi que sur les activités de la lipase et de la pepsine des cellules principales. Dans une étude antérieure, il avait été établi que la glucosamine tritiée est principalement incorporée au niveau épithélial, spécialement dans les régions apicales des cellules muqueuses de surface (Ménard et al., 1993). Dans le tissu foetal gastrique humain, EGF a augmenté significativement la synthèse des glycoprotéines d'une manière dose-dépendante, ce qui est en accord avec la démonstration que EGF

stimule la synthèse et la sécrétion des glycoprotéines du mucus dans la muqueuse gastrique adulte (Kelly et Hunter, 1990) aussi bien que dans les cellules à mucus fundiques de lapin en culture (Yoshida et al., 1987). Par conséquent, nos résultats indiquent clairement que la production de mucus stimulée par EGF est un processus acquis très tôt au cours de l'ontogénèse de la muqueuse gastrique humaine.

La présence d'une lipase spécifique à l'estomac humain adulte est maintenant bien établie (Moreau et al., 1988; Abrams et al., 1988; Hamosh, 1990) et son activité peut être détectée aussi tôt qu'à 12 semaines de gestation (Ménard et al., 1995). Cependant le ou les mécanismes de régulation impliqués dans la modulation de la synthèse et de la sécrétion de la lipase gastrique au cours du développement demeurent encore inconnus. L'addition de EGF a diminué l'activité lipolytique tissulaire sans affecter la sécrétion de la lipase dans le milieu. Notre observation que la sécrétion de la lipase n'a pas été affectée par EGF nous amène à émettre l'hypothèse que EGF pourrait affecter la synthèse et/ou la dégradation de l'enzyme. En effet, un phénomène similaire est observé dans l'intestin foetal humain (Ménard et al., 1988) ainsi que dans le côlon (Ménard et al., 1990), dans lequel EGF inhibait l'accumulation tissulaire de plusieurs enzymes de la bordure en brosse. De plus, il a été rapporté que EGF inhibe l'apparition de l'activité sucrase dans les cellules Caco-2 (Cross et Quaroni, 1991), suggérant que EGF est capable d'influencer l'expression de plusieurs enzymes hydrolytiques dans tout le tube digestif. Quoique EGF diminue l'activité de la

lipase gastrique, il n'affecte pas l'activité de la pepsine, suggérant que les deux enzymes sont soumis à différents mécanismes de régulation. Les observations que EGF augmente significativement le poids de l'estomac total et le contenu d'ADN de la muqueuse gastrique chez les rats non sevrés, mais n'a aucun effet sur la sécrétion de pepsine et le contenu en pepsinogène (Dembinski et Johnson, 1985), ont conduit à la conclusion que EGF stimulait la croissance de la muqueuse gastrique mais n'était pas impliqué dans le développement fonctionnel. Quoique nos données confirment que EGF n'influence pas la sécrétion de pepsine et ni le contenu en pepsinogène dans la muqueuse gastrique, un concept additionnel émerge sur le rôle de EGF. Contrairement aux espèces ne possédant pas de lipase gastrique (rongeurs) (Hamosh, 1990), chez l'humain, EGF stimule la prolifération cellulaire de la muqueuse et module son développement fonctionnel, tel que mis en évidence par la synthèse des glycoprotéines et l'activité lipolytique tissulaire. À notre connaissance, EGF est le premier facteur de croissance connu pour influencer l'activité de la lipase gastrique au cours du développement.

## C) Le système des IGFs dans la muqueuse gastrique

### 1. Effets des IGFs et de l'insuline dans la modulation du développement

Au cours de la dernière décennie, plusieurs évidences ont suggéré un rôle important des IGFs et de l'insuline dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaires de l'épithélium gastrointestinal. Chez les rongeurs, la présence de récepteurs distincts de IGF-1 (Laburthe et al., 1988; Termanini et al., 1990; Heinz-Erian et al., 1991) et de l'insuline (Sodoyezgoffaux et al., 1985) a été révélée dans le tube digestif, principalement par des études de liaison. De plus, des analyses par hybridation Northern et *in situ* ont révélé la présence d'ARNm encodant les IGFs dans la lamina propria gastrointestinale (Han et al., 1987, 1988), indiquant que la muqueuse gastrointestinale est un site de synthèse des IGFs. Quoiqu'il y ait plusieurs études des rôles potentiels des IGFs et de l'insuline dans la croissance foetale et embryonnaire (Baker et al., 1993), aucune donnée n'existe sur l'influence directe de ces facteurs sur le développement de la muqueuse gastrique en général et plus spécifiquement chez l'humain. Nous avons utilisé la méthode de culture organotypique sans sérum, qui nous a permis de démontrer que EGF influence le développement fonctionnel de l'estomac humain, pour vérifier si les IGFs et l'insuline étaient directement impliqués dans la modulation du développement fonctionnel de la muqueuse gastrique.

Avant de débiter l'étude sur les actions biologiques potentielles des IGFs et l'insuline sur le développement des fonctions gastriques, nous nous sommes assurés si la muqueuse gastrique foetale exprimait les récepteurs de ces polypeptides. L'immunofluorescence a été utilisée pour identifier la localisation des récepteurs IGF-1 et de l'insuline dans la muqueuse gastrique. Nos études ont montré que les récepteurs IGF-1 et de l'insuline sont déjà présents à la 16<sup>ème</sup> semaine de gestation et qu'ils sont largement distribués dans les épithéliums de surface et glandulaire. Une analyse détaillée de la localisation cellulaire de ces deux récepteurs a clairement révélé leur présence au niveau de la portion basolatérale des cellules épithéliales gastriques. Cette localisation basolatérale des récepteurs IGF-1 est en accord avec celle rapportée dans les cellules épithéliales intestinales (Remacle-Bonnet et al., 1995). En effet, ces auteurs ont démontré que les cellules HT29-D4-Gal fortement polarisées exprimaient les récepteurs IGF-1 à la surface basolatérale. Nous avons précédemment établi une localisation similaire pour les récepteurs EGF.

L'addition de IGF-1 au milieu de culture a augmenté l'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN gastrique total après 24 h. L'indice de marquage épithélial élevé dans ces explants a confirmé que les cellules épithéliales gastriques sont les cibles principales de l'action de IGF-1 dans les tissus gastriques. Nos résultats sont en accord avec la synthèse d'ADN augmentée induite par IGF-1 dans les cellules épithéliales fundiques de chien maintenues en culture primaire (Chen et al., 1991) et dans les cellules

cancéreuses gastriques humaines, AGS (Guo et al., 1993). Dans nos expériences avec les explants gastriques, l'augmentation de la synthèse d'ADN observée avec l'insuline n'est pas d'ordre significatif, même si 4 des 6 cultures ont répondu positivement après 24 h. Des effets similaires de l'insuline sur la synthèse d'ADN dans les cellules épithéliales fundiques de chien ont été observés (Chen et al., 1991). Ces auteurs ont suggéré que le plus grand potentiel de IGF-1 à stimuler la synthèse d'ADN comparativement à l'insuline est probablement médié par les récepteurs IGF-1. IGF-2, contrairement à IGF-1, n'a pas induit une augmentation de la prolifération cellulaire suggérant que IGF-2 n'est pas impliqué dans la modulation de la prolifération cellulaire épithéliale gastrique. Cette absence d'effet de IGF-2 pourrait être aussi interprétée de plusieurs façons. Par exemple, IGF-2 ayant une plus faible affinité pour le récepteur IGF-1, se lierait de préférence à son récepteur IGF-2. Une autre possibilité serait que des IGFBPs endogènes, liant de préférence IGF-2 tel IGFBP-2, -5 et -6 (Jones et Clemmons, 1995), peuvent être présentes dans le milieu et/ou dans le tissu inhibant l'action potentiel de IGF-2. Cette dernière hypothèse serait plus plausible considérant que plusieurs lignées cellulaires gastrointestinales, tel AGS (Guo et al., 1993), HT29-D4 (Remacle-Bonnet et al., 1995) et les cellules Caco-2 (Oguchi et al., 1994) sont toutes connues pour synthétiser et sécréter différentes IGFBPs.

Nous avons analysé par la suite les effets des IGFs et de l'insuline sur le développement des fonctions digestives. Notre étude indique que les deux

facteurs insuliniques, IGF-1 et IGF-2, mais non l'insuline, induisent des effets biologiques comparables à ceux de EGF sur l'activité de la lipase. En effet, l'activité lipolytique dans les explants cultivés pendant 5 jours a diminué en présence de ces facteurs, alors que le relâchement de la lipase dans le milieu n'a pas changé. Nous avons observé le même phénomène avec EGF, suggérant que les IGFs pourraient eux aussi affecter la synthèse et/ou la dégradation de l'enzyme dans l'estomac foetal humain en développement. Il a déjà été démontré que les IGFs peuvent moduler l'activité et/ou la synthèse d'autres enzymes digestives. En effet, Ohneda et al. (1997) ont observé une diminution de l'activité de la lactase dans l'intestin de souris transgéniques surexprimant un transgène de IGF-1 humain. De plus, un phénomène similaire a été rapporté dans la lignée cellulaire intestinale humaine Caco-2 dans laquelle une expression constitutive de IGF-2 a produit une inhibition de l'expression de l'ARNm de la sucrase-isomaltase (Zarilli et al., 1996). Il est à noter que pendant que les IGFs diminuent l'activité de la lipase gastrique, ils n'ont pas affecté l'activité de la pepsine suggérant que ces deux enzymes gastriques sont soumis à des mécanismes de régulation différents. Par conséquent, IGF-1 et IGF-2, avec EGF, sont les seuls facteurs de croissance connus pour influencer l'activité de la lipase gastrique au cours du développement de la muqueuse gastrique foetale humaine.

## 2. Synthèse et sécrétion des IGFbps

Dans cet autre volet de l'étude, nous avons établi que la muqueuse gastrique foetale humaine exprime et sécrète la majorité des IGFbps, ce qui fait de l'estomac une excellente source endogène de IGFbps. Nos résultats ont également précisé que les IGFbps exhibent des comportements différents en culture. En effet, nous avons observé que toutes les IGFbps sont sécrétées dans le milieu de culture, à l'exception de IGFBP-5. Même si les niveaux tissulaires de IGFBP-5 augmentent en culture, celle-ci n'a jamais été détectée dans le milieu, suggérant que la protéine est demeurée séquestrée dans le tissu. Incidemment, cette protéine est connue pour sa capacité à se lier à certains constituants de la matrice extracellulaire (Parker et al., 1996), notamment les protéoglycans, ce qui pourrait expliquer son absence dans le milieu de culture. Par ailleurs, nous avons constaté que le niveau d'une seule de ces protéines, soit IGFBP-1 n'a pas augmenté en culture. En effet, le niveau total (tissu + milieu) de IGFBP-1 est demeuré similairement le même que celui mesuré au début de la culture, suggérant que cette protéine n'a pas été synthétisée par la muqueuse gastrique durant la culture et/ou qu'elle n'origine pas de l'estomac. De récentes observations ont montré que l'estomac foetal humain n'exprimait pas l'ARNm de IGFBP-1, celui-ci étant uniquement exprimé par le foie foetal (Han et al., 1996). De plus, il a été démontré que plusieurs lignées cellulaires épithéliales gastrointestinales humaines et de rongeurs n'expriment pas IGFBP-1 (Singh

et al., 1994). La plus forte augmentation du niveau de protéines que nous avons mesurée est celle de IGFBP-2, dont la production a augmenté d'un peu plus de 4 fois en 24 h de culture. Cette observation concorde avec les études qui ont montré que les niveaux d'expression de l'ARNm de IGFBP-2 étaient les plus élevés dans l'estomac foetal humain (Han et al., 1996), ainsi que chez le rat foetal (Ooi et al., 1990). Par ailleurs, nos résultats ont révélé que les patrons d'expression et de sécrétion de IGFBP-3 et -4 étaient très similaires comparativement aux autres IGFBPs. L'ensemble de nos résultats a permis de constater que les patrons d'expression et les profils de sécrétion des IGFBPs diffèrent dans la muqueuse gastrique foetale humaine. Toutefois, l'estomac foetal humain n'est pas unique, puisqu'il a été démontré que les patrons d'expression ainsi que les profils de sécrétion des IGFBPs dans les cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2 sont modifiés avec le stade de différenciation (Oguchi et al., 1994).

Il est maintenant bien connu que les IGFBPs modulent les actions biologiques des IGFs (Jones et Clemmons, 1995). La présence des IGFBPs dans la muqueuse gastrique humaine suggère que ces dernières pourraient interagir avec les IGFs et moduler les effets des IGFs, soit de façon négative ou bien positive. Cependant, la liaison des IGFs aux IGFBPs dans la muqueuse gastrique foetale humaine devait être démontrée. C'est cet aspect de la question que nous avons traité dans la deuxième partie de ce volet. Pour ce faire, nous avons adapté la technique d'immunobuvardage par ligand, mieux connue sous le nom de "FarWestern-Blot" et déterminé si les

IGFBPs gastriques possèdent la capacité de lier les IGFs. Nous avons observé que IGF-1 et IGF-2 se sont liés à six protéines majeures dans la muqueuse gastrique, dont les poids moléculaires correspondent en tout point aux poids moléculaires respectifs des différentes IGFBPs. De plus, ces études nous ont suggéré qu'une sixième IGFBP, probablement IGFBP-6 d'après son poids moléculaire, serait présente dans l'estomac foetal humain, ce qui augmente encore plus la complexité des mécanismes de modulation des IGFs. Nous avons donc montré que les IGFBPs gastriques ont la capacité de lier les IGFs suggérant ainsi une interaction potentielle des IGFBPs avec les IGFs et la modulation de l'action des IGFs par les IGFBPs sur le développement de la muqueuse gastrique foetale humaine. Cette hypothèse demeure bien sûr à être confirmée.

#### D) Régulation de l'expression de la lipase gastrique humaine

##### 1. Profil ontogénique de l'expression de la lipase gastrique

Afin de préciser les mécanismes de régulation de la synthèse de la lipase gastrique, nous avons analysé les niveaux d'expression de la protéine et de l'ARNm de l'enzyme dans la muqueuse gastrique.

Par immunobuvardage, nous avons observé une augmentation graduelle des niveaux relatifs de la lipase au cours de la période étudiée (15

à 20 semaines de gestation). Parallèlement, les niveaux relatifs d'ARNm de la lipase observés par hybridation Northern augmentent de manière similaire. Ces résultats sont cohérents avec nos études précédentes (Ménard et al., 1995) qui ont montré que l'activité de la lipase augmente graduellement au cours du développement de la muqueuse gastrique humaine et suggèrent que l'expression de la lipase gastrique est régulée à la hausse ("up-regulated") lors du développement. Il est pertinent de noter que la régulation à la hausse de l'expression de la lipase coïncide avec l'initiation du développement morphologique et fonctionnel de la muqueuse gastrique humaine, c'est-à-dire entre 10 et 13 semaines de gestation (Ménard et Arsenault, 1990; Ménard et al., 1995). Récemment, l'expression et la distribution spatiales et temporelles de plusieurs constituants de la matrice extracellulaire ont été corrélées avec le développement de l'axe foveolus/glande (Tremblay et Ménard, 1996). Dans les cellules épithéliales intestinales humaines, il a été démontré que la laminine-1, un constituant majeur de la membrane basilaire, stimule la différenciation cellulaire en modulant l'expression de la sucrase-isomaltase et de la lactase (Vachon et Beaulieu, 1995). Cependant, l'implication de ces macromolécules dans le développement de l'expression de la lipase gastrique reste à être élucidée.

L'analyse de l'expression de la lipase dans les différentes régions anatomiques de l'estomac a permis d'observer un gradient décroissant d'expression de l'enzyme allant du fundus jusqu'à l'antra pylorique, et ce tant au niveau de la protéine que de l'ARNm. Ce patron d'expression décroissant

corrèle très bien celui observé au niveau de l'activité de la lipase que nous avons rapporté précédemment (Ménard et al., 1995). La corrélation retrouvée entre les niveaux d'activité, de la protéine et de l'ARNm suggère fortement que le développement spontané de l'expression de la lipase gastrique humaine est régulée principalement au niveau de l'ARNm. Dans cette étude, nous n'avons pas eu accès à des stades plus précoces du développement embryonnaire. Ainsi nous ne pouvons pas exclure la possibilité qu'avant 10 semaines de gestation, l'ARNm de la lipase soit déjà présent mais dégradé trop rapidement avant le processus de traduction ou encore trop faible pour être détecté. Cependant, cette possibilité semble peu probable en regard du parallélisme identique observé entre les niveaux d'activité, de protéine et d'ARNm lors du développement. Dans la muqueuse gastrique adulte, bien que le même patron d'expression de l'activité de la lipase a été rapporté dans les différents sites anatomiques (Moreau et al., 1988; Abrams et al., 1988), la corrélation entre l'activité enzymatique, la protéine et l'ARNm demeure à être établie.

## 2. Expression de la lipase gastrique en culture

Dans ce deuxième volet, nous nous sommes attardés à étudier l'expression de la lipase gastrique dans des explants cultivés pendant 24 h. De façon surprenante, nous avons observé que même si les niveaux relatifs

de la protéine ont augmenté (2.2 fois) durant la culture, les niveaux d'ARNm de la lipase sont demeurés stables ou légèrement diminués. Cette absence de corrélation dans les niveaux d'expression était inattendue en relation avec le parallélisme observé *in vivo* lors du développement. Afin de mieux comprendre ce qui se produisait pendant la culture, nous avons analysé les niveaux d'expression de l'ARNm de la lipase à différents temps de culture incluant la période de stabilisation des explants. Nous avons constaté que l'expression de l'ARNm augmente rapidement et de façon transitoire en culture, l'augmentation atteignant un plateau après les 4 premières h. Cette augmentation transitoire diminue graduellement à partir de la 8<sup>ème</sup> h pour revenir au niveau initial après 24 h. Cette augmentation relative de l'ARNm de la lipase pendant les premières h de culture est équivalente à l'augmentation des protéines totales après 24 h, indiquant que l'expression de la lipase est régulée au niveau de l'ARNm. Fait important à noter est que cette augmentation transitoire de l'expression de la lipase se produit durant la période de stabilisation normalement allouée aux explants gastriques. Cette observation nous oblige à réévaluer et/ou à réinterpréter les effets biologiques des modulateurs étudiés ajoutés après une période de 4 h de stabilisation. Finalement, l'augmentation rapide des niveaux d'ARNm (2 fois) observée dès le début de la culture suggère que l'explantation des tissus en culture induit, par elle-même, une synthèse d'ARNm. Le ou les mécanismes de régulation sont pour l'instant inconnus. Une possibilité serait que lorsque l'estomac est soustrait à l'influence systémique foetale il y aurait perte d'une

régulation transcriptionnelle négative opérant normalement *in utero*. Cette régulation négative pourrait se situer au niveau des constituants du liquide amniotique ou de la circulation sanguine. Un phénomène similaire a été rapporté concernant l'expression de l'ARNm de la lactase dans des explants jéjunaux foetaux humains (Villa et al., 1992).

### 3. Effet de EGF sur l'expression de la lipase gastrique

Dans le chapitre III (paragraphe B, section 4), nous avons montré que EGF est capable de moduler l'activité de la lipase dans des explants foetaux gastriques entre le 2<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jour de culture. Afin de déterminer à quel niveau EGF module l'expression de la lipase, nous avons analysé les niveaux d'ARNm de la lipase dans des explants gastriques cultivés en présence de EGF. Après 24 h de culture, nous avons observé une légère diminution (10%) de l'expression de l'ARNm de la lipase en présence de EGF. Cependant, cette expression réduite du messager ne s'est jamais traduite par une baisse de l'activité après le même temps de culture. Cette observation pourrait être interprétée de deux façons: soit que les niveaux d'activité de la lipase détectés au début de la culture ( $T_0$ ) résulteraient en grande partie de l'enzyme déjà emmagasiné dans les granules de sécrétion et sécrété ultérieurement, ou soit que cette activité de la lipase résulterait de

l'augmentation transitoire des ARNm produits lors de la période de stabilisation.

Afin de vérifier cette dernière interprétation, nous avons cultivé des explants gastriques pendant 8 h en présence de EGF, mais en omettant la période de stabilisation (explantation directe). Par hybridation Northern, nous avons observé une réduction significative (37%) de l'expression de l'ARNm de la lipase en présence de EGF, les niveaux d'ARNm demeurant similaires à ceux du début de la culture. Ces résultats ont démontré que EGF régule l'expression de la lipase en inhibant presque totalement l'augmentation transitoire de l'ARNm.

Afin de vérifier si cette inhibition de l'augmentation transitoire induite par EGF se traduisait également par une diminution de l'activité, nous avons analysé les niveaux d'activité de la lipase dans des explants gastriques cultivés pendant 24 h en présence de EGF appliqué directement au début de la culture. Nous avons observé une diminution significative (40%) de l'activité tissulaire de la lipase induite par EGF, laquelle corrèle la diminution de l'expression d'ARNm (37%) indiquant que l'expression de la lipase est régulée au niveau de l'ARNm par EGF et que l'explantation directe optimise l'effet du modulateur. Fait intéressant, l'activité totale (tissu + milieu) de la lipase a aussi diminué (27%) de façon significative, alors qu'aucune variation de l'activité présente dans le milieu n'a été observée. Ces résultats suggèrent qu'une très grande quantité de cette activité proviendrait de l'accumulation dans le milieu de culture de la lipase contenue dans les

granules de sécrétion des cellules principales et sécrétée dès le début de la culture. Plus tôt dans ce travail, nous avons postulé que EGF pouvait influencer la synthèse et/ou la dégradation de l'enzyme. Maintenant, nos résultats démontrent que EGF affecte directement l'expression de l'ARNm de la lipase gastrique.

## V. CONCLUSIONS

L'objectif global du présent travail était d'identifier les modulateurs du développement fonctionnel de la muqueuse gastrique foetale humaine et d'établir leurs mécanismes d'action, et plus particulièrement sur une enzyme importante dans la fonction digestive, soit la lipase gastrique. Dans un premier temps, nous avons analysé le patron de distribution de la lipase gastrique dans les différentes régions anatomiques de l'estomac au cours du développement. Nous avons mis en évidence que le patron de distribution de la lipase que l'on retrouve chez l'adulte, c'est-à-dire un gradient décroissant d'expression allant de la région du fundus vers l'antrum pylorique, est établi très tôt (13<sup>ème</sup> semaine de gestation) dans la muqueuse gastrique foetale. L'apparition et l'établissement précoces du patron d'expression adulte de la lipase supportent l'hypothèse de son rôle nutritionnel important à la naissance.

De plus, nous avons montré que la lipase est localisée dans les granules de sécrétion des cellules principales de l'épithélium gastrique. Il a été établi que la lipase et la pepsine sont colocalisées dans le cytoplasme des mêmes cellules chez l'adulte. Fait intéressant, nous avons montré antérieurement que les niveaux d'activité de ces enzymes dans les différentes régions de l'estomac ne coïncident pas toujours, indiquant qu'il pourrait y avoir au cours du développement des cellules riches en lipase et

d'autres riches en pepsine. Chez le lapin, la présence de deux types de cellules principales a été démontrée, l'une exprimant la lipase et l'autre la pepsine. Il serait pertinent de vérifier dans l'épithélium gastrique foetal humain s'il existe deux types de cellules principales distinctes ou bien si c'est le reflet d'une cellule n'ayant pas encore atteint son stade de cellule épithéliale gastrique mature pleinement différenciée. L'utilisation de la technique d'immunofluorescence indirecte en double marquage serait appropriée pour répondre à cette question.

Dans un second volet, nous avons établi la capacité de EGF à moduler le développement de la muqueuse gastrique humaine. Nos résultats ont démontré qu'en culture organotypique, EGF module la prolifération cellulaire de l'épithélium gastrique ainsi que son développement fonctionnel, entre autre sur la synthèse des glycoprotéines et de la lipase gastrique. De plus, nous avons montré que les effets de ce facteur de croissance sont médiés par la présence d'un récepteur spécifique à EGF à la membrane basolatérale des cellules épithéliales. Par conséquent, le système de culture organotypique sans sérum représente un outil indispensable pour l'étude des mécanismes de régulation des processus de prolifération et de différenciation cellulaires au niveau de l'épithélium gastrique. Cependant, une caractérisation moléculaire plus approfondie de ces mécanismes de régulation du développement devra être effectuée. Les premières étapes de cette caractérisation font l'objet du dernier volet de ces travaux.

Dans un troisième volet, nous avons vérifié l'hypothèse d'un rôle potentiel des facteurs de croissance insuliniques (IGFs) et de l'insuline dans le développement de l'estomac. Dans la première étape de ce volet, nous avons montré la présence de récepteurs spécifiques pour IGF-1 et l'insuline au niveau des membranes basolatérales des cellules épithéliales, ce qui suggérait effectivement une action possible de ces facteurs. Deuxièmement, nos résultats ont précisé que les IGFs, mais non l'insuline, influencent le développement de la muqueuse gastrique humaine. De plus, nous avons observé que IGF-1 et IGF-2 modulent de façon différentielle la prolifération cellulaire, mais non la différenciation. Par ailleurs, cette observation nous a amené à émettre l'hypothèse que l'effet différentiel des IGFs sur la prolifération peut être le résultat d'une implication des IGFbps. Ainsi, dans la dernière partie de ce volet, nous avons vérifié et démontré que la muqueuse gastrique foetale humaine est une source endogène de IGFbps, et de plus que ces protéines possèdent la capacité de lier les IGFs au cours du développement, indiquant la possibilité d'un réseau très complexe d'interactions entre ces IGFbps et les IGFs dans la modulation du développement de l'estomac foetal humain. Cependant, le méthode de culture organotypique ne s'avère pas le modèle idéal pour étudier les relations directes entre les composantes du système des IGFs dans la modulation du développement. Pour ce faire, il faudra établir un modèle de culture de cellules épithéliales gastriques, soit de culture primaire ou encore

une lignée cellulaire épithéliale, et du même coup cela nous permettra de déterminer l'origine cellulaire de chacune des IGFBPs.

Enfin, nous avons initié pour la première fois l'étude des mécanismes de régulation de la synthèse de la lipase gastrique, afin d'établir à quel niveau de contrôle l'expression de la lipase est soumise. Après avoir développé l'outil nécessaire pour cette étude, c'est-à-dire le cDNA de la lipase gastrique, nous avons analysé les différents niveaux d'expression de la lipase durant l'ontogénèse de la muqueuse gastrique ainsi qu'en culture. Nos observations ont clairement établi une corrélation entre l'augmentation graduelle des niveaux de la protéine et de l'ARNm lors du développement, indiquant que l'expression de la lipase est régulée à la hausse dans l'épithélium gastrique en développement. De plus, notre analyse des niveaux d'expression de la lipase dans les différentes régions anatomiques de l'estomac appuie fortement l'hypothèse que l'expression de la lipase est régulée au niveau de l'ARNm. Nos études en culture organotypique ont montré de façon surprenante une augmentation transitoire, mais non maintenue, de l'expression de la lipase dans les premières h de culture. Ceci indique que le seul fait de mettre l'estomac en culture augmente l'expression de la lipase, suggérant la perte d'un facteur contrôlant de façon négative la régulation transcriptionnelle de la lipase qui opérerait normalement *in utero*. Ce phénomène en culture organotypique a été démontré pour d'autres enzymes digestives (Villa et al., 1992). De plus, le fait que l'augmentation transitoire de la lipase en culture ne soit pas maintenue suggère également

la perte d'un facteur ou des facteurs qui maintiennent ou stimulent son expression.

Dans le présent travail, nous avons établi que EGF, IGF-1 et IGF-2 modulent l'activité de la lipase gastrique. Cette modulation de l'activité nous a incité à préciser à quel niveau de régulation d'expression ces facteurs exercent leur influence. Pour ce faire, nous avons analysé l'effet de EGF sur les niveaux d'expression d'ARNm de la lipase en culture. Nos observations ont montré que EGF induit une régulation à la baisse de l'expression de l'ARNm de la lipase, qui se traduit aussi par une baisse de l'activité totale. D'autres observations ont montré que EGF modulent l'expression de plusieurs enzymes digestives (Ménard et al., 1988, 1990; Cross et Quaroni, 1991). Toutefois, cette étude démontre que EGF est le premier facteur de croissance connu qui affecte directement l'expression de l'ARNm de la lipase gastrique. Par ailleurs, la présence de EGF dans le liquide amniotique et dans le lait maternel, jumelée à son effet sur l'expression de la lipase, suggèrent que EGF pourrait être impliqué normalement dans le développement fonctionnel de l'estomac. Ces évidences ouvrent un champ d'étude sur les répresseurs et les stimulateurs du développement de la muqueuse gastrique. Toutefois, il reste aussi à vérifier si les IGFs modulent également l'activité de la lipase au même niveau.

Finalement, ce présent travail a permis de déterminer et de caractériser différents modulateurs impliqués dans le développement fonctionnel de la muqueuse gastrique foetale humaine et d'initier l'étude des

mécanismes d'action. Parmi ces divers mécanismes, nous retrouvons les facteurs de croissance, tel EGF et les IGFs, qui, maintenant ne fait plus aucun doute, sont des modulateurs des processus de prolifération et différenciation cellulaires gastriques. Dans la muqueuse gastrique humaine, l'influence de ces facteurs est exercée par une expression et une distribution de leurs récepteurs spécifiques à la portion basolatérale des cellules épithéliales tout le long de l'axe foveolus/glande. De plus, les effets des IGFs sur la prolifération cellulaire et la fonction digestive et, en plus la présence des IGFBPs, viennent ajouter un autre niveau de complexité dans la régulation du développement de l'épithélium gastrique. Cependant, la mise au point d'un système de culture primaire ou de lignées cellulaires épithéliales gastriques permettra, vraisemblablement, de mieux comprendre et d'approfondir le rôle du système des IGFs dans la modulation du développement de la muqueuse gastrique.

Par ailleurs, l'apparition et l'établissement précoces d'un patron d'expression adulte de la lipase gastrique montrent que les mécanismes de régulation de la différenciation cellulaire gastrique sont en place très tôt lors de la période foetale. En effet, l'apparition de la lipase coïncide avec l'initiation de la morphogénèse glandulaire. De plus, l'expression et la distribution spatiales et temporelles de divers constituants de la matrice extracellulaire au niveau de la muqueuse gastrique foetale humaine ont montré que l'expression de la laminine-2 (ou mérosine) débute dès l'initiation de la morphogénèse et est localisée à la base des glandes gastriques en

formation. Il serait pertinent de réaliser une analyse approfondie du rôle de ces macromolécules dans la différenciation épithéliale gastrique afin de prouver l'implication de la matrice extracellulaire dans le mécanisme global de régulation du développement de l'estomac. Par conséquent, il est maintenant évident que les mécanismes impliqués dans la régulation des processus de prolifération cellulaire et ainsi que de la différenciation épithéliale gastrique sont le résultat de plusieurs facteurs. D'autres études impliquant la mise au point de modèles cellulaires (culture primaire, lignée cellulaire) seront nécessaires afin de nous permettre de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sont responsables de l'initiation et du maintien de la différenciation gastrique humaine.

En conclusion, il reste maintenant peu de doute que les mécanismes, tant au niveau cellulaire que moléculaire, menant au développement et au maintien d'une fonction digestive adéquate s'avèrent complexes et nombreux. Nous avons mis en évidence les premiers facteurs de croissance (EGF et IGFs) impliqués dans le développement fonctionnel de la muqueuse gastrique humaine, et plus particulièrement dans la modulation de la lipase gastrique. En effet, dès la naissance, et encore plus chez les enfants prématurés, l'estomac est appelé à jouer un rôle nutritionnel primordial dans l'hydrolyse des triglycérides présents dans le lait maternel et/ou dans les formules substitués, résultat de l'immaturité des fonctions exocrines du pancréas. Le développement normal des capacités digestives étant essentielles pour une digestion normale des nutriments, il est donc important

de bien comprendre la nature des divers mécanismes de régulation impliqués dans la modulation du développement des fonctions digestives lors de la différenciation de l'épithélium gastrique. Nos travaux ont donc contribué à mettre en évidence l'importance de cette enzyme chez l'humain et à préciser les mécanismes de régulation de son expression pendant le développement.

## **VI. REMERCIEMENTS**

Je tiens avant tout à remercier chaleureusement et avec amitié le docteur Daniel Ménard qui, de par ses nombreuses qualités humaines, scientifiques et pédagogiques, m'a permis de mener à bien et à terme ce projet dans une atmosphère de motivation et d'apprentissage. Je lui dois, sans aucune réserve, ma profonde gratitude et tout mon respect de m'avoir accueilli au sein de son équipe.

Je désire également remercier les docteurs Jean-François Beaulieu et Raymond Calvert pour leur disponibilité, leurs précieux conseils et les discussions, tant scientifiques qu'amicales, que nous avons eues.

Je tiens à remercier très affectueusement Madame Lina Corriveau, qui a fait de mon séjour dans le laboratoire une expérience des plus agréables. C'est avec la plus grande sincérité que je lui dois toute ma reconnaissance et toute mon amitié.

Un merci très spécial au docteur Pierre H. Vachon pour son amitié et ses connaissances scientifiques, qui même lors de son absence "physique" en dehors du département, était très présent et disponible pour m'appuyer dans la réalisation de ce travail.

Je me dois de remercier mes confrères de travail ("la famille gastrique"), Pierre Chailier et Jean-René Basque, pour leur précieuse amitié, leur soutien moral et ainsi que pour les bons moments que nous avons passé ensemble.

Je remercie également Madame Elizabeth Herring-Gillam pour ses connaissances en biologie moléculaire et son expertise technique qu'elle a bien voulu me faire partager dans une atmosphère des plus agréables.

Finalement, je remercie tous les membres du département d'anatomie et de biologie cellulaire (étudiantes, étudiants, professeurs et secrétaires) pour leur camaraderie et leur appui.

## VI. BIBLIOGRAPHIE

Abrams CK, Hamosh M, Dutta SK, Hubbard VS, Hamosh P. Role of nonpancreatic lipolytic activity in exocrine pancreatic insufficiency. *Gastroenterology* 1987;92:125-129.

Abrams CK, Hamosh M, Hubbard VS, Dutta SK, Hamosh p. Lingual lipase in cystic fibrosis: Quantitation of enzyme activity in the upper small intestine of patients with exocrine pancreatic insufficiency. *J Clin Invest* 1984;73:374-382.

Abrams CK, Hamosh M, Lee TC, Ansher AF, Collen MJ, Lewis JH, Benjamin SP, Hamosh P. Gastric lipase: Localization in the human stomach. *Gastroenterology* 1988;95:1460-1464.

Anson ML, Mirky AE. The estimation of pepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 1932;10:342-344.

Arsenault P, Ménard D. Influence of hydrocortisone on human fetal small intestine in organ culture. *J Pediatr Gastroenterol and Nutr* 1985;4:893-901.

Arsenault P, Ménard D. Stimulatory effects of epidermal growth factor on deoxyribonucleic acid synthesis in the gastrointestinal tract of the suckling mouse. *Comp Biochem Physiology* 1987;86(1):123-127.

Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993;75:83-95.

Baxter RC. Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review. *Horm Res* 1994;42:140-144.

Beauchamp RD, Barnard JA, McCutchen CM, Cherner JA, Coffey RJ Jr. Localization of transforming growth factor  $\alpha$  and its receptor in gastric mucosal cells. Implications for a regulatory role in acid secretion and mucosal renewal. *J Clin Invest* 1989;184:1017-1023.

Belfrage P and Vaughan M. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labelled oleic acid from mixtures with glycerides. *J Lip Res* 1969;10:341-344.

Bendayan M, Nanci A, Kan FWK. Effect of tissue processing on colloidal gold cytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1987;35:983.

Bennet C, Paterson IM, Corbishley CM, Luqmani YA. Expression of growth factor and epidermal growth factor receptor encoded transcripts in human gastric tissues. *Cancer Res* 1989;49:2104-2111.

Bennett A, Wilson DM, Liu F, Nagashima R, Rosenfeld RG, Hintz RL. Levels of insulin-like growth factors I and II in human cord blood. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:609-612.

Bernbäck S, Bläckberg L, Hernell O. Fatty acids generated by gastric lipase promote human milk triacylglycerol digestion by pancreatic colipase-dependent lipase. *Biochim Biophys Acta* 1989;1001:286-293.

Bernbäck S, Bläckberg L, Hernell O. The complete digestion of human milk triacylglycerol in vitro requires gastric lipase, pancreatic colipase-dependent lipase, and bile salt-stimulated lipase. *J Clin Invest* 1990;85:1221-1126.

Biezenski JJ, Pomerance W, Goodman J. Studies of the origin of amniotic fluid lipids. 1. Normal composition. *Am J Obstet Gynecol* 1968;102:853-861.

Bodmer MW, Angal S, Yarranton GT, Harris TJR, Lyons A, King DJ, Pieroni G, Rivière C, Verger R, and Lowe PA. Molecular cloning of a human gastric lipase and expression of the enzyme in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1987;909:237-244.

Borgström B. Importance of phospholipids, pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> and fatty acid for the digestion of dietary fat. *Gastroenterology* 1980;78:954-962.

Chen MC, Lee AT, Soll AH. Mitogenic response of canine fundic epithelial cells in short-term culture to transforming growth factor  $\alpha$  and insulin-like growth factor I. *J Clin Invest* 1991;87:1716-1723.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.

Cohen M, Morgan RGH, Hoffmann AF. Lipolytic activity of human gastric and duodenal juice against medium and long chain triglycerides. *Gastroenterology* 1971;60:1-14.

Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 1962;237:1555-1562.

Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 1993;55:131-153.

Cross HS, Quaroni A. Inhibition of sucrase-isomaltase expression by EGF in the human colon adenocarcinoma cells Caco-2. *Am J Physiol* 1991;261:C1173-C1183.

De Meyts P, Wallach B, Christoffersen CT, Urso B, Gronskov K, Latus LJ, Yakushiji F, Ilondo MM, Shymko RM. The insulin-like growth factor-1 receptor. *Horm Res* 1994;42:152-169.

Dembinski AB, Johnson LR. Effect of epidermal growth factor on the development of the rat gastric mucosa. *Endocrinology* 1985;116(1):90-94.

DeNigris SJ, Hamosh M, Kaskebar DK, Fink CS, Lee TC, Hamosh P. Secretion of human gastric lipase from dispersed gastric glands. *Biochim Biophys Acta* 1985;836:67-72.

Deren JS. Development of the structure and function in the fetal and newborn stomach. *Am J Clin Nutr* 1971;24:144-159.

Dipalma J, Kirk C, Hamosh M, Colon AR, Benjamin SB, and Hamosh P. Lipase and pepsin activity in the gastric mucosa of infants, children and adults. *Gastroenterology* 1991;101:116-120.

Donaldson RM and Kapadia CR. Organ culture of gastric mucosa: advantages and limitations. *Methods in Cell Biology* 1980, Vol 21B, Academic Press Inc, NY.

Finke U, Rutten M, Murphy RA, Silen W. Effects of epidermal growth factor on acid secretion from guinea pig gastric mucosa: in vitro analysis. *Gastroenterology* 1985;88:1175-1182.

Gargouri Y, Pieroni G, Rivière C, Lowe PA, Saunière JF, Sarda L, Verger R. Importance of human lipase for intestinal lipolysis: an in vitro study. *Biochim Biophys Acta* 1986;879:419-423.

Germain Lee EL, Janicot M, Lammers R, Ulrich A, Casella SJ. Expression of a type I insulin-like growth factor receptor with low affinity for insulin-like growth factor II. *Biochem J* 1992;268:413-417.

Ghitescu L, Bendayan M. Immunolabeling efficiency of protein A-gold complexes. *J Histochem Cytochem* 1990;38:1523.

Giles KW, Myers A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 1965;206:93-94.

Grand RJ, Watkins JB, Torti FM. Development of the human gastrointestinal tract. A review. *Gastroenterology* 1976;70:790-810.

Guo YS, Beauchamp RD, Jin GF, Townsend Jr CM, Thompson JC. Insulin-like growth factor-binding protein modulates the growth response to insulin-like growth factor 1 by human gastric cancer cells. *Gastroenterology* 1993;104:1595-1604.

Hamosh M, Scanlon JW, Ganot D, Likel M, Scanlon KB, and Hamosh P. Fat digestion in the newborn. Characterization of lipase in gastric aspirates of premature and term infants. *J Clin Invest* 1981;67:828-846.

Hamosh M. Digestion in the newborn. *Clinics in Perinatology* 1996;23(2) :191-209.

Hamosh M. Lingual and gastric lipases: their role in fat digestion. CRC Press, Boca Raton, Florida;1990:1-239.

Han VKM, D'Ercole AJ, Lund PK. Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science* 1987;236:193-197.

Han VKM, Lund PK, Lee DC, D'Ercole AJ. Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:422-429.

Han VKM, Matsell DG, Delhanty PJD, Hill DJ, Shimasaki S, Nygard K. IGF-binding protein mRNAs in the human fetus: tissue and cellular distribution of developmental expression. *Horm Res* 1996;45:160-166.

Heinz-Erian P, Kessler U, Funk B, Gais P, Kiess W. Identification and in situ localization of the insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate (IGF-II/M6P) receptor in the rat gastrointestinal tract: comparison with the IGF-1 receptor. *Endocrinology* 1991;129:1769-1778.

Helander HF. The cells of the gastric mucosa. *Int Rev Cytol* 1981;70:217-289.

Hormi K, Lehy T. Developmental expression of transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor receptor proteins in the human pancreas and digestive tract. *Cell Tissue Res* 1994;278:439-450.

Humbel RE. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 1990;190:445-462.

Johnson LR. Functional development of the stomach. *Ann Rev Physiol* 1985;47:199-215.

Jones J, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3-34.

Kelly SM, Hunter JO. Epidermal growth factor stimulates synthesis and secretion of mucus glycoproteins in human gastric mucosa. *Clin Sci* 1990;79:425-427.

Konturek JW, Brzozowski T, Konturek SJ. Epidermal growth factor in protection, repair, and healing of gastroduodenal mucosa. *J Clin Gastroenterology* 1991;13(Suppl. 1):S88-S97.

Konturek SJ, Bielanoki W, Konturek JW, Oleksy J, Yamazaki J. Release and action of epidermal growth factor on gastric secretion in humans. *Scand J Gastroenterology* 1989;24(4):485-492.

Kornfeld S. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* 1992;61:307-330.

Kumegawa M, Takuma T, Hosoda S, Kunii S, Kanda Y. Precocious induction of pepsinogen in the stomach of suckling mice by hormones. *Biochim Biophys Acta* 1978;543:243-250.

Kuwayama H, Naito T, Kojima Y. Proliferative response of rabbit and rat gastric epithelial cells to human epidermal growth factor. *Digestion* 1994;55:108-114.

Laburthe M, Rouyer-Fessard C, Gammeltoft S. Receptors for insulin-like growth factors I and II in rat gastrointestinal epithelium. *Am J Physiol* 1988;254:G457-G462.

Lee PC, Borysewicz R, Struve M, Raab K, Werlin SL. Development of lipolytic activity in gastric aspirates from premature infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;17:291-297.

Lehy T. Renouvellement cellulaire de l'épithélium gastrique et facteurs de croissance. *Gastroentérol Clin Biol* 1985;9:20-25.

Lipkin M. Growth and development of gastrointestinal cells. *Ann Rev Physiol* 1985;47:175-197.

Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I and type 1 IGF receptor. *Cell* 1993;75:73-82.

Lowry OH, Rosebrough NF, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.

Malo C, Arsenault P, Ménard D. Organ culture of the small intestine of suckling mouse in a serum-free medium. *Cell Tissue Res* 1983;228:75-84.

Malo C, Ménard D. Influence of epidermal growth factor on the development of suckling mouse intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1982;83:28-35.

Ménard D, Arsenault P, Monfils S. Maturation of human fetal stomach in organ culture. *Gastroenterology* 1993;104:492-501.

Ménard D, Arsenault P, Pothier P. Biologic effects of epidermal growth factor in human fetal jejunum. *Gastroenterology* 1988;94:656-663.

Ménard D, Arsenault P. Cell proliferation in the developing human stomach. *Anat Embryol* 1990;182:509-516.

Ménard D, Calvert R. Fetal and postnatal development of the small intestine and large intestine: Patterns and regulation. In: Morrisset J, Solomon TE eds. Growth of the gastrointestinal tract: Gastrointestinal hormones and growth factors. CRC Press, Boca Raton, Florida;1991:159-174.

Ménard D, Corriveau L, Arsenault P. Differential effects of epidermal growth factor and hydrocortisone in human fetal colon. J Pediatr Gastroenterol and Nutr 1990;10:13-20.

Ménard D, Monfils S, Tremblay E. Ontogeny of human gastric lipase and pepsin activities. Gastroenterology 1995;108:1650-1656.

Ménard D, Pothier P. Radioautographic localization of epidermal growth factor receptors in human fetal gut. Gastroenterology 1991;101:640-649.

Ménard D. Growth promoting factors and the development of the human gut. In: Lebenthal E. ed. Human gastrointestinal development. New York: Raven, 1989:123-150.

Moreau H, Laugier R, Gargouri Y, Ferrat O F, Verger R. Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin. Gastroenterology 1988;95:1221-1226.

Morgan DO, Edman JC, Standring DN, Fried VA, Smith MC, Roth RA, W.J. Rutter WJ. Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 1987;329:301-307.

Neville D, Yeomans MB, Trier JS, Moxey PC, Markezin ET. Maturation and differentiation of cultured fetal stomach. Effects of corticosteroids, pentagastrin, and cytochalasin B. *Gastroenterology* 1976;71:770-777.

Nomura Y. On the submicroscopic morphogenesis of parietal cell in the gastric gland of the human fetus. *Z Anat Entwicklungsgesch* 1966;125:316-356.

Oguchi S, Walker A, Sanderson IR. Profile of IGF-binding proteins secreted by intestinal epithelial cells changes with differentiation. *Am J Physiol* 1994;30:G843-G850.

Oh Y, Nagalla SR, Yamanaka Y, Kim HS, Wilson E, Rosenfeld RG. Synthesis and characterization of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-7. *J Biol Chem* 1996;271(48):30322-30325.

Ohneda K, Ulshen MH, Randall Fuller C, D'Ercole A Joseph, Kay Lund P. Enhanced growth of small bowel in transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Gastroenterology* 1997;112:444-454.

Olsen PS, Poulsen SS, Kirkegaard P, Nexø E. Role of submandibular saliva and epidermal growth factor in gastric cytoprotection. *Gastroenterology* 1984;87:103-108.

Orsini B, Calabro A, Milani S, Grappone C, Herbst H, Surrenti C. Localization of epidermal growth factor/transforming growth factor- $\alpha$  receptor in the human gastric mucosa. An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1993;423:57-63.

Pfeiffer A, Rothbauer E, Wiebecke B, Pratschke E, Kramling HJ, Mann K. Increased epidermal growth factor receptors in gastric carcinomas. *Gastroenterology* 1990;98:961-967.

Piechaczyk M, Blanchard J-M, Marty L, Dani C, Panatières F, El-Sabouty S, Fort P, Jeanteur P. Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in rat tissues. *Nucleic Acids Res* 1984;12:6951-6963.

Rechler M.M. Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitam Horm* 1993;47:1-114.

Remacle-Bonnet M, Garrouste F, El Atiq F, Marvaldi J, Pommier G. Cell polarity of the insulin-like growth factor system in human intestinal epithelial cells. Unique apical sorting of insulin-like growth factor binding protein-6 in differentiated human colon cancer cells. *J Clin Invest* 1995;96:192-200.

Rotwein P. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 1991;5:3-18.

Rubin W, Ross LL, Sleisenger MH, Jeffries GH. The normal human gastric epithelia: a fine structure study. *Lab Invest* 1968;19(6):598-626.

Salenius P. On the ontogenesis of the human gastric epithelial cells. *Acta Anat (Basel) Suppl* 1962;46:1-75.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-5467.

Scheving LA, Yey YC, Tsai TH, Scheving LE. Circadian phase-dependent stimulatory effects of epidermal growth factor on deoxyribonucleic acid synthesis in the tongue, esophagus, and stomach of the adult male mouse. *Endocrinology* 1979;105:1475-1480.

Slot JW and Geuze HJ. A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur J Cell Biol* 1985;38:87-93.

Sodoyez-Goffaux F, Sodoyez JC, De Vos CJ. Insulin receptors in the gastrointestinal tract of the rat fetus: quantitative autoradiographic studies. *Diabetologia* 1985;28:45-50

Spellacy WN, Buhi WC, Bradley B, Holsinger KK. Maternal, fetal and amniotic levels of glucose, insulin and growth hormone. *J Obstet Gynecol* 1973;41(3):323-331.

Steele Perkins G, Turner J, Edman JC, Hari J, Pierce SB, Stover C, Rutter WJ, Roth RA. Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem* 1988;263:11486-11492.

Stewart CEH, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 1996;76:1005-1026.

Streeter GL. Weight, sitting head, head size, foot length and menstrual age of the human embryo. *Contr Embryol* 1920;11:143-179.

Termanini B, Nardi RV, Finan TM, Parikh I, Korman LY. Insulin-like growth I receptors in rabbit gastrointestinal tract. Characterization and autoradiographic localization. *Gastroenterology* 1990;99:51-60.

Thomas JO, Kornberg RD. An octamer of histone in chromatin and free solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:2626-2630.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4354.

Tremblay E, Ménard D. Differential expression of extracellular matrix components during the morphogenesis of human gastric mucosa. *Anat Rec* 1996;245:668-676.

Vachon PH, Beaulieu J-F. Extracellular heterotrimeric laminin promotes differentiation in human enterocytes. *Am J Physiol* 1995;268:G857-G867.

Villa M, Ménard D, Semenza G, Mantei N. The expression of lactase enzymatic activity and mRNA in human fetal jejunum. Effect of organ culture and of treatment with hydrocortisone. *FEBS Letters* 1992;301:202-206.

Yoshida S, Kasuga S, Hirao Y, Fuwa T, Nakagawa S. Effect of biosynthetic human epidermal growth factor on the synthesis and secretion of mucin glycoprotein from primary culture of rabbit fundal mucosa cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 1987;23(7):460-464.

Zapf J. Physiological role of the insulin-like growth factor binding proteins. *Eur J Endocrinol* 1995;132:645-654.

Zarrilli R, Romano M, Pignata S, Casola S, Bruni CB, Acquaviva AM.

Constitutive insulin-like growth factor-II expression interferes with the enterocyte-like differentiation of Caco-2 cells. *J Biol Chem* 1996;271(14):8108-8114.

## VIII. ANNEXES

### 1. Liste des publications

Ménard D, Monfils S, Tremblay E. Ontogeny of human gastric lipase and pepsin activities. *Gastroenterology* 1995;108:1650-1656.

Tremblay E and Ménard D. Differential expression of extracellular matrix components during the morphogenesis of human gastric mucosa. *Anatomical Record* 1996;245(4):668-676.

Tremblay E, Monfils S and Ménard D. Epidermal growth factor influences cell proliferation, glycoprotein synthesis and lipase activity in developing human gastric mucosa. *Gastroenterology* 1997;112:1188-1196.

Tremblay E and Ménard D. Developmental gene expression of human gastric lipase. (En préparation)

Tremblay E and Ménard D. Regulation of the functional development of human gastric mucosa by insulin-like growth factors. (En préparation).

## **2. Liste des communications**

D Ménard, **E Tremblay**, R Verger, S Monfils (1993) Développement, localisation et régulation de la lipase gastrique humaine. XXXV<sup>e</sup> réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Pointe-au-Pic. Méd Sciences 9(suppl 1):21.

D Ménard, **E Tremblay**, R Verger et S Monfils (1994) Distribution, localization and regulation of human fetal gastric lipase . 94th Annual meeting of the American Gastroenterological Association at Digestive Disease Week, May 15-18, New Orleans, Louisiana. Gastroenterology 106(4):A621.

**E Tremblay** et D Ménard (1994) Immunolocalisation des principaux constituants de la matrice extracellulaire au cours du développement des glandes gastriques. XXXVI<sup>e</sup> réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Ste-Adèle. Méd Sciences 10(suppl 1):28.

D Ménard et **E Tremblay** (1994) Influence des facteurs de croissance insuliniques (IGF-1 et IGF-2) et de l'insuline sur la prolifération cellulaire dans l'estomac foetal humain. XXXVI<sup>e</sup> réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Ste-Adèle. Méd Sciences 10(suppl 1):28.

**E Tremblay** et D Ménard (1994) Effets de l'insuline et des facteurs de croissance insuliniques (IGF-1 et IGF-2) sur la prolifération cellulaire dans le tube digestif. Journée-rencontre sur l'axe entéro-pancréatique, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke.

**E Tremblay** and D Ménard (1995) Growth-promoting action of insulin-like growth factors (IGF-1 and IGF-2) and insulin on the developing human gastric mucosa. 95th Annual meeting of the American Gastroenterological Association at Digestive Disease Week, May 14-17, San Diego, California. *Gastroenterology* 108(4):A1012.

**E Tremblay** and D Ménard (1995) Compositional changes of laminin A chain isoforms, fibronectin and tenascin during the ontogenesis of human gastric mucosa. 95th Annual meeting of the American Gastroenterological Association at Digestive Disease Week, May 14-17, San Diego, California. *Gastroenterology* 108(4):A758.

**E Tremblay** and D Ménard (1995) Comparative study of the implication of insulin and insulin-like growth factors in the development of human gastric mucosa. International Symposium on Pediatric Gastroenterology and Nutrition, June 22-23, Montréal Convention Centre, Montréal, Canada.

**E Tremblay** et D Ménard (1995) La muqueuse gastrique foetale humaine: Une source de IGFBPs (Insulin-like growth factor binding proteins)? XXXVII<sup>e</sup> réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Bromont. Méd Sciences 11(suppl 2):22.

**E Tremblay** and D Ménard (1996) Epidermal growth factor (EGF) influences the developing human stomach. 96th Annual meeting of the American Gastroenterological Association at Digestive Disease Week, May 18-22, San Francisco, California. Gastroenterology 110(4):A845.

**E Tremblay** and D Ménard (1996) Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP)-1 and -2 are present and differentially localized in developing human gastric mucosa. 96th Annual meeting of the American Gastroenterological Association at Digestive Disease Week, May 18-22, San Francisco, California. Gastroenterology 110(4):A846

**E Tremblay** et D Ménard (1996) La gastrine influence le développement de la muqueuse gastrique humaine. XXXVIII<sup>e</sup> réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Québec. Méd. Sciences 12(suppl 2):P-215.

**E Tremblay** et D Ménard (1996) Ontogénèse de la lipase gastrique humaine. Journée-rencontre sur l'axe entéro-pancréatique. Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Université de Sherbrooke.

**E Tremblay** and D Ménard (1997) Immunological detection and secretion profiles of insulin-like growth factors binding proteins (IGFBPs) in developing human stomach. 36th Annual meeting of Canadian Association of Gastroenterology at Digestive Diseases Week, February 24 - March 1, 1997, Québec city, Québec. Can J Gastroenterology 11 (suppl A):S146.

JR Basque, **E Tremblay**, P Chailier and D Ménard (1997) Do gastric cancer cell lines represent suitable model to study human gastric epithelial differentiation? 36th Annual meeting of Canadian Association of Gastroenterology at Digestive Diseases Week, February 24 - March 1, 1997, Québec city, Québec. Can J Gastroenterology 11 (suppl A):S135.

**E Tremblay**, JF Beaulieu and D Ménard (1997) Developmental gene expression of gastric lipase in human stomach. 97th Annual meeting of the American Gastroenterological Association at Digestive Disease Week, May 11-14, 1997, Washington, DC. Gastroenterology 112:A912.

JR Basque, **E Tremblay**, P Chailier and D Ménard (1997) Analysis of gastric epithelial markers in three cell lines derived from human gastric carcinomas. 97th Annual meeting of the American Gastroenterological Association at Digestive Disease Week, May 11-14, 1997, Washington, DC. Gastroenterology 112:A536

**E Tremblay, J-F Beaulieu et D Ménard. Ontogénèse de l'expression de la lipase gastrique humaine. XXXIX<sup>e</sup> réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Trois-Rivière. Méd Sciences 13 (Suppl 2): O-73.**

JR Basque, **E Tremblay**, P Chailier et D Ménard. Analyse de marqueurs épithéliaux associés au développement fonctionnel de la muqueuse gastrique humaine dans trois lignées cancéreuses. XXXIX<sup>e</sup> réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Trois-Rivière. Méd Sciences 13 (Suppl 2): O-30.