

Université de Sherbrooke

Effet synergique de la signalisation des BMP dans les cellules Foxl1⁺ et de *Trp53* dans l'initiation et la progression de la carcinogenèse gastrique

Par
Camille Ouellet
Programmes gradués de biologie cellulaire

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

Sherbrooke, Québec, Canada
Septembre, 2019

Membres du jury d'évaluation

P^{re} Nathalie Perreault, Département d'immunologie et de biologie cellulaire, FMSS
Pr François Boudreau, Département d'immunologie et de biologie cellulaire, FMSS
P^{re} Véronique Giroux, Département d'immunologie et de biologie cellulaire, FMSS
Pr Benoit Paquette, Département de médecine nucléaire et de radiobiologie, FMSS

© Camille Ouellet, 2019

À mes parents, famille et amis qui m'ont soutenu tout au long de mon parcours.

Somewhere, something incredible is waiting to be known.

Carl Sagan

1. RÉSUMÉ

Effet synergique de la signalisation des BMP dans les cellules Foxl1⁺ et de *Trp53* dans l'initiation et la progression de la carcinogenèse gastrique

Par

Camille Ouellet

Programmes gradués de biologie cellulaire

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

La signalisation des BMP est associée à l'homéostasie du système digestif et à la carcinogenèse gastrique. Des travaux précédents de notre laboratoire ont démontré que la perte épithéliale de la signalisation des BMP a peu d'impact sur la néoplasie alors que la perte mésenchymateuse des BMP (*Bmpr1a*^{ΔFoxl1}) initie la polypose gastrique, mais sans progression en carcinome. Nous observons chez ces souris une accumulation de p53 au noyau des cellules épithéliales, élément qui pourrait expliquer la limitation de la progression tumorale. Ce présent mémoire a pour but de déterminer si la perte de *Trp53* dans un modèle murin dont la signalisation BMP est invalidée dans les télocytes Foxl1⁺ (*Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}) est suffisante pour observer une progression de la carcinogenèse gastrique. Pour ce faire, nous avons analysé les tissus gastriques des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} âgées de 90 jours tant au niveau histologique que transcriptomique afin de comprendre les éléments favorisant la progression de l'adénome au carcinome dans les estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. De plus, une évaluation de divers phénotypes associés à une initiation de la polypose fut effectuée sur ces souris âgées de 30 jours afin d'élucider le rôle de p53 dans l'initiation de la néoplasie gastrique. Nos résultats montrent que la perte de p53 permet bel et bien la progression de la carcinogenèse gastrique puisque les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} âgées de 90 jours présentent des carcinomes invasifs alors que les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} du même âge ont des adénomes. Le transcriptome des carcinomes *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} montre des signatures de diminution de la polarité cellulaire, des jonctions cellule-cellule et cellule-matrice et des signes d'une migration cellulaire agressive combinée à une perméabilité accrue des vaisseaux sanguins. Ces tumeurs présentent aussi des modulations de signalisations associées au cancer gastrique comme la voie sonic hedgehog et les cibles de MYC. Les estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} de 30 jours montrent une initiation précoce de la polypose et des lésions prénéoplasiques comme l'atrophie des cellules pariétales, le *spasmolytic peptide expressing metaplasia* et la métaplasie intestinale. En conclusion, il existe une relation synergique entre la voie des BMP dans les télocytes Foxl1⁺ et p53 tant dans l'initiation que dans la progression de la carcinogenèse gastrique.

Mots clés : Cancer gastrique, signalisation des BMP, p53, mésenchyme, télocytes

2. TABLE DES MATIERES

1. Résumé	v
2. Table des matières	vi
3. Liste des figures	ix
4. Liste des tableaux	xi
5. Liste des abréviations	xii
6. Introduction	1
6.1 Le système gastrointestinal	1
6.1.1 L'estomac humain et murin	1
6.1.2 Les cellules épithéliales gastriques	2
6.1.2.1 Les cellules souches épithéliales gastriques	3
6.1.2.2 Les cellules pariétales	4
6.1.2.3 Les cellules à mucus	5
6.1.2.4 Les cellules zymogéniques	5
6.1.3 Les cellules mésenchymateuses.....	6
6.1.3.1 Les fibroblastes	6
6.1.3.2 Les myofibroblastes	6
6.1.3.3 Les télocytes	7
6.1.3.4 Les Cancer Associated Fibroblasts	8
6.1.3.5 La matrice extracellulaire.....	9
6.2 Les interactions épithélio-mésenchymateuses	10
6.2.1 En condition homéostatiques	11
6.2.1.1 Le développement embryonnaire et l'organogenèse	11
6.2.1.2 Le maintien de l'homéostasie à l'âge adulte	11
6.2.2 Le microenvironnement tumoral	12
6.3 Le cancer gastrique	13
6.3.1 La cascade de la carcinogenèse gastrique.....	15
6.3.1.1 Les lésions prénéoplasiques.....	16
6.3.1.2 L'adénome et le carcinome	18
6.3.1.3 Les cellules souches cancéreuses gastriques.....	20
6.4 La voie des bone morphogenetic proteins	21
6.5 Implication de p53 dans la carcinogenèse gastrique	24
6.6 Hypothèse et objectifs de recherche	26
7. Matériel et méthodes	29

7.1 Utilisation de souris transgéniques	29
7.1.1 Génotypage des animaux	29
7.1.2 Euthanasie des animaux.....	31
7.1.3 Analyse macroscopique des estomacs	31
7.1.4 Fixation des estomacs	31
7.1.5 Coloration de coupes d'estomacs	31
7.1.5.1 Coloration Hématoxyline et Éosine (H&E)	31
7.1.5.2 Coloration à l'alcian bleu.....	33
7.1.6 Analyses histopathologiques des estomacs	33
7.1.7 Immunofluorescence sur coupe de tissu en paraffine.....	33
7.1.8 Immunohistochimie sur coupe de tissu en paraffine.....	36
7.1.9 Extraction d'ARN à partir de tissu gastrique	39
7.1.10 Digestion à la DNase et RT des ARN de tissu.....	40
7.1.11 RT-PCR.....	41
7.1.12 Séquençage d'ARN du tissu gastrique.....	43
7.1.13 Analyses statistiques.....	43
8. Résultats	44
8.1 Les souris <i>Bmpr1a</i>^{ΔFoxl1};<i>Trp53</i>^{null} présentent des tumeurs de stade plus avancé que les souris <i>Bmpr1a</i>^{ΔFoxl1} à 90 jours	44
8.1.1 Analyse histopathologique des tissus d'estomac des souris âgées de 90 jours	45
8.1.2 Analyse du statut prolifératif des tissus d'estomac des souris âgées de 90 jours.....	47
8.2 Analyse de l'initiation de la polypose chez les souris <i>Bmpr1a</i>^{ΔFoxl1};<i>Trp53</i>^{null} âgées de 30 jours.....	49
8.2.1 Analyse du statut prolifératif des tissus d'estomac des souris âgées de 30 jours.....	52
8.2.2 Présence de lésions préneoplasiques chez les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} âgées de 30 jours	55
8.2.2.1 Diminution du nombre de cellules pariétales	55
8.2.2.2 Spasmolytic peptide expressing metaplasia	56
8.2.2.3 Métaplasie intestinale	57
8.2.3 Analyses de CD44, marqueur de cellules souches cancéreuses gastriques dans les estomac des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} âgées de 30 jours.....	61
8.2.4 Analyses de l'identité des cellules mésenchymateuses des estomacs des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} âgées de 30 jours	63

8.3 Analyse du transcriptome des carcinomes gastriques des souris	
<i>Bmpr1a</i>^{ΔFoxl1};<i>Trp53</i>^{null} âgées de 90 jours.....	66
8.3.1 Analyses des caractéristiques générales du transcriptome des polypes de l'antre des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} et <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} âgées de 90 jours.....	66
8.3.2 Analyses des signatures des jonctions cellulaires dans le transcriptome des polypes de l'antre des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} âgées de 90 jours.....	68
8.3.3 Analyses des signatures de carcinogenèse gastrique dans le transcriptome des polypes de l'antre des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} âgées de 90 jours	73
9. Discussion.....	76
10. Conclusion	95
11. Perspectives.....	96
12. Remerciements.....	99
13. Liste des références.....	100
14. Annexes	117

3. LISTE DES FIGURES

Figure 1 Régionalisation de l'estomac murin	2
Figure 2 Schéma des cellules épithéliales composant les glandes du corps et de l'antra de l'estomac	3
Figure 3 Cascade moléculaire de la carcinogenèse gastrique de type intestinal	15
Figure 4 Les lésions préneoplasiques gastriques	16
Figure 5 La signalisation des BMP dépendante des SMAD.....	22
Figure 6. Les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} présentent une augmentation de la charge tumorale gastrique à l'âge de 90 jours	44
Figure 7. Les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} présentent une progression de la carcinogenèse gastrique à l'âge de 90 jours	46
Figure 8. Marquage des cellules prolifératives dans les estomacs des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} à l'âge de 90 jours	48
Figure 9. Nombre de cellules prolifératives dans les estomacs des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} à l'âge de 90 jours	49
Figure 10. Les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} présentent une initiation de la polypose gastrique précoce à l'âge de 30 jours	50
Figure 11. Les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} présentent des signes d'initiation de la polypose gastrique au niveau histologique à l'âge de 30 jours.....	51
Figure 12. Marquage des cellules prolifératives des estomacs des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} à l'âge de 30 jours	52
Figure 13. Nombre de cellules prolifératives dans les estomacs des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} à l'âge de 30 jours	54
Figure 14. Diminution du nombre de cellules pariétales dans le corps des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} à l'âge de 30 jours	56
Figure 15. Initiation de SPEM dans le corps des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} à l'âge de 30 jours	57
Figure 16. Présence de mucines intestinales dans le corps des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} à l'âge de 30 jours	58

Figure 17. Analyse de la sécrétion des cellules à mucus de surface chez les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} âgées de 30 jours.....	59
Figure 18. Analyse de la sécrétion de MUC5AC chez les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} âgées de 30 jours.....	60
Figure 19. Augmentation de l'expression de CD44s dans l'estomac des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} à 30 jours.....	62
Figure 20. Augmentation du nombre de cellules souches cancéreuses prolifératives dans l'estomac des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} à 30 jours	63
Figure 21. Analyse du nombre et de l'identité des cellules mésenchymateuses dans les estomacs des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} âgées de 30 jours	65
Figure 22. Analyse des caractéristiques générales du transcriptome de l'antre des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} à l'âge de 90 jours	67
Figure 23. Analyse des signatures de polarité et jonctions cellulaires de l'antre des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} à l'âge de 90 jours	70
Figure 24. Analyse des signatures des jonctions adhérentes de l'antre des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} à l'âge de 90 jours	71
Figure 25. Analyse des signatures des jonctions cellule-matrice de l'antre des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} à l'âge de 90 jours	73
Figure 26. Analyse des signatures de marqueurs de cancer gastrique de l'antre des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} à l'âge de 90 jours	74
Figure 27. Analyse des signatures de marqueurs de cancer gastrique en lien avec p53 dans l'antre des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Trp53</i> ^{null} à l'âge de 90 jours.....	75

4. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Amorces pour les PCR de géotypage	30
Tableau 2 : Déparaffination et réhydratation des coupes de tissu	32
Tableau 3 : Déshydratation des coupes de tissu	32
Tableau 4 : Anticorps utilisés pour les immunofluorescences sur tissu	35
Tableau 5 : Contre-coloration des immunohistochimies	38
Tableau 6 : Amorces pour les RT-PCR	42

5. LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTA1	<i>Actin Alpha 1</i>
ActRIIa	<i>Activin Receptor Type IIa</i>
ActRIIb	<i>Activin Receptor Type IIb</i>
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
ADAM15	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase 15</i>
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNP	<i>Activity Dependent Neuroprotector Homeobox</i>
ALK1	<i>Activin Receptor-like Kinase 1</i>
ALK2	<i>Activin Receptor-like Kinase 2</i>
ALK3	<i>Activin Receptor-like Kinase 3</i>
ALK4	<i>Activin Receptor-like Kinase 4</i>
ALK6	<i>Activin Receptor-like Kinase 6</i>
AMOT	<i>Angiomotin</i>
AMOTL1	<i>Angiomotin Like 1</i>
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ARID1A	<i>AT-Rich Interaction Domain 1A</i>
ARP2	<i>Actin Related Protein 2</i>
ARP3	<i>Actin Related Protein 3</i>
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP4A	<i>ATPase H⁺/K⁺ Transporting Subunit α</i>
ATP4B	<i>ATPase H⁺/K⁺ Transporting Subunit β</i>
BCL2	<i>B-Cell CLL/Lymphoma 2</i>
BMI1	<i>B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMP10	<i>Bone Morphogenetic Protein 10</i>

Bmpr1a	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor 1a</i>
BmprII	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor II</i>
BRPF3	<i>Bromodomain and PHD Finger Containing 3</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAF	<i>Cancer Associated Fibroblast</i>
CAND1	<i>Cullin Associated and Neddylation Dissociated 1</i>
CAPN1	<i>Calpain 1</i>
CAPN2	<i>Calpain 2</i>
CAPN5	<i>Calpain 5</i>
CAV1	<i>Caveolin 1</i>
CCNE1	<i>Cycline E1</i>
CDH1	<i>Cadhérine 1</i>
CDH2	<i>Cadhérine 2</i>
CDK4	<i>Cyclin Dependent Kinase 4</i>
CDX2	<i>Caudal Type Homeobox 2</i>
CLDN5	<i>Claudine 5</i>
CMTM4	<i>CKLF Like MARVEL Transmembrane Domain Containing 4</i>
CSC	<i>Cancer Stem Cell</i>
CSNK1D	<i>Casein Kinase 1δ</i>
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
CTNNA1	<i>Caténine α1</i>
CTNND1	<i>Caténine δ1</i>
CXCL	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i>
CXCL17	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 17</i>
DAB	<i>3,3'-diaminobenzidine</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phénylindole</i>
DAPK	<i>Death Associated Protein Kinase</i>
DEPC	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>
DLG1	<i>Discs Large Homolog 1</i>
DLG5	<i>Discs Large Homolog 5</i>
dNTP	<i>Désoxyribonucléotides</i>

DSG2	<i>Desmoglein 2</i>
DSP	<i>Desmoplakin</i>
DST	<i>Dystonin</i>
EDTA	<i>Acide Éthylènediaminetétraacétique</i>
EGF	<i>Epithelial Growth Factor</i>
EGR2	<i>Early Growth Response 2</i>
EIF1AX	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A X-Linked</i>
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>
EPHB1	<i>Ephrin Type-B Receptor 1</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase 2</i>
FAP	<i>Fibroblast Activation Protein</i>
FBXW8	<i>F-Box and WD Repeat Domain Containing 8</i>
FC	<i>Fold Change</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FLNA	<i>Filamin A</i>
FMN1	<i>Formin 1</i>
FN1	<i>Fibronectine 1</i>
Foxl1	<i>Forkhead Box L1</i>
FSP1	<i>Fibroblast-specific Protein 1</i>
FWER p-Value	<i>Familywise-error Rate p-Value</i>
GAS6	<i>Growth Arrest Specific 6</i>
GIF	<i>Gastric Intrinsic Factor</i>
GLI1	<i>Glioma-Associated Oncogene 1</i>
GNL3	<i>G Protein Nucleolar 3</i>
GRHL2	<i>Grainyhead Like Transcription Factor 2</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GS-II	<i>Griffonia Simplicifolia II</i>
HA	<i>Hyaluronic Acid</i>
HAT	<i>Histone Acétyltransférase</i>
H&E	<i>Hématoxyline et Éosine</i>

HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HH	<i>Hedgehog</i>
HIPK1	<i>Homeodomain Interacting Protein Kinase 1</i>
H. pylori	<i>Helicobacter pylori</i>
HRP	Horseradish Peroxidase
ING1	<i>Inhibitor Of Growth 1</i>
ING4	<i>Inhibitor Of Growth 4</i>
ING5	<i>Inhibitor Of Growth 5</i>
IF	Immunofluorescence
IFN γ	Interféron γ
IEC	<i>Intestinal Epithelial Cells</i>
IgG	Immunoglobuline G
IHC	Immunohistochimie
IL	Interleukine
IL1 β	Interleukine 1 β
IL6	Interleukine 6
ILF2	<i>Interleukin Enhancer Binding Factor 2</i>
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
ITGA1	Intégrine α 1
ITGA3	Intégrine α 3
ITGA5	Intégrine α 5
ITGA6	Intégrine α 6
ITGB3	Intégrine β 3
ITGB4	Intégrine β 4
JNK	<i>JUN N-Terminal Kinase</i>
JUP	<i>Junction Plakoglobin</i>
L1CAM	<i>L1 Cell Adhesion Molecule</i>
LAMA3	<i>Laminin Subunit α3</i>
LAMA5	<i>Laminin Subunit α5</i>
LAMB1	<i>Laminin Subunit β1</i>

LAMB2	<i>Laminin Subunit β2</i>
LAMB3	<i>Laminin Subunit β3</i>
LAMC1	<i>Laminin Subunit γ1</i>
LAMC2	<i>Laminin Subunit γ2</i>
LFS	<i>Li-Fraumeni Syndrome</i>
Lgr5	<i>Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5</i>
LLGL1	<i>Lethal Giant Larvae Homolog 1</i>
LLGL2	<i>Lethal Giant Larvae Homolog 2</i>
LOH	<i>Loss of Heterozygosity</i>
Lrig1	<i>Leucine Rich Repeats And Immunoglobulin Like Domains 1</i>
LYZ	<i>Lysozyme</i>
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2</i>
MEC	<i>Matrice Extracellulaire</i>
MI	<i>Métaplasie Intestinale</i>
min	<i>Minute</i>
MLH1	<i>MutL Homolog 1</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
MMP10	<i>Matrix Metalloproteinase 10</i>
MMP3	<i>Matrix Metalloproteinase 3</i>
MSI	<i>Microsatellite Instability</i>
MTMR3	<i>Myotubularin Related Protein 3</i>
MUC1	<i>Mucine 1</i>
MUC2	<i>Mucine 2</i>
MUC5AC	<i>Mucine 5 sous-types A et C</i>
MUC6	<i>Mucine 6</i>
NEDD4	<i>Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Down-Regulated Protein 4</i>
NES	<i>Normalized Enrichment Score</i>
NF1	<i>Neurofibromin 1</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor κ B</i>
NFYA	<i>Nuclear Transcription Factor Y Subunit α</i>

Oct4	<i>Octamer-Binding Protein 4</i>
p38-MAPK	<i>p38 Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
p53 RE	<i>p53 Responsive Elements</i>
PARD3	<i>Partitioning Defective 3 Homolog</i>
PARD6B	<i>Partitioning Defective 6 Homolog β</i>
PATZ1	<i>POZ/BTB and AT Hook Containing Zinc Finger 1</i>
pb	<i>Paire de base</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGFR α	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor α</i>
PFA	<i>Paraformaldéhyde</i>
pH	<i>Potentiel hydrogène</i>
PHF2	<i>PHD Finger Protein 2</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit α</i>
PKA	<i>Protein Kinase A</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PKP3	<i>Plakophilin 3</i>
PKP4	<i>Plakophilin 4</i>
PLEC	<i>Plectin</i>
PLEKHA7	<i>Pleckstrin Homology Domain Containing A7</i>
PPM1D	<i>Protein Phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ Dependent 1D</i>
PRKCA	<i>Protein Kinase C Alpha</i>
PRRX1	<i>Paired Related Homeobox 1</i>
PTCH	<i>Patched</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
PTK7	<i>Protein Tyrosine Kinase 7</i>
PXN	<i>Paxilline</i>
qPCR	<i>PCR quantitatif</i>
RBM25	<i>RNA Binding Motif Protein 25</i>

RHOA	<i>Ras Homolog Family Member A</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPM	<i>Révolution par minute</i>
RT	<i>Rétrotranscription</i>
RT-qPCR	<i>Retrotranscription Quantitative PCR</i>
RUNX3	<i>Runt-Related Transcription Factor 3</i>
SCRIB	<i>Scribble</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SDF1	<i>Stromal Cell-derived Factor 1</i>
Sec	<i>Seconde</i>
SFRP1	<i>Secreted Frizzled Related Protein 1</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SI	<i>Sucrase Isomaltase</i>
SMO	<i>Smoothened</i>
SPEM	<i>Spasmolytic Peptide Expressing Metaplasia</i>
SOX2	<i>SRY-Box 2</i>
STAT1	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
STK11	<i>Serine/Threonine Kinase 11</i>
TBP	<i>TATA-Box Binding Protein</i>
TCF4	<i>Transcription Factor 4</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TERT	<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
Tff2	<i>Trefoil Factor 2</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TJP1	<i>Tight Junction Protein 1</i>
TLN1	<i>Taline 1</i>
TLN2	<i>Taline 2</i>
TNC	<i>Tenascin C</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TRIM32	<i>Tripartite Motif Containing 32</i>

Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TRPC4AP	<i>Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 4 Associated Protein</i>
UBE3A	<i>Ubiquitin Protein Ligase E3A</i>
UEA-1	<i>Ulex Europaeus Agglutinin I</i>
uPA	<i>Urokinase-Type Plasminogen Activator</i>
USP22	<i>Ubiquitin Specific Peptidase 22</i>
Wnt	<i>Wingless</i>
VCL	Vinculine
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VIM	Vimentine
ZEB1	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>
ZEB2	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2</i>
ZYX	<i>Zyxin</i>
α SMA	<i>α-Smooth Muscle Actin</i>

6. INTRODUCTION

6.1 Le système gastrointestinal

Le système gastrointestinal permet l'entrée et la transformation mécanique et biochimique des aliments en nutriments, l'absorption de ces nutriments ainsi que l'éjection des déchets. Le tube digestif est composé de la bouche, l'œsophage, l'estomac, les intestins (duodénum, jéjunum et iléon), le côlon et le rectum. Le pancréas et le foie font partie des organes annexes au tube digestif et déversent leur contenu dans le duodénum, principalement des enzymes digestives et l'acide biliaire. Chaque région du tube digestif a une fonction qui lui est propre : la bouche permet de préparer les aliments à la digestion par la mastication et l'ajout de salive, l'estomac assure le brassage du bol alimentaire en plus de sécréter l'acide gastrique et des enzymes de digestion, les intestins permettent une digestion finale des nutriments et l'absorption de ceux-ci, le côlon l'absorption de l'eau et le rectum la sortie de matière non-utilisée (Le Guen et al. 2015; Schneeman 2002). Dans les parties tubulaires du système gastrointestinal, deux couches de muscles permettent le mouvement unidirectionnel du bol alimentaire par péristaltisme (Le Guen et al. 2015; Zakhem et al. 2019).

6.1.1 L'estomac humain et murin

L'estomac est un organe en forme de poche situé entre l'œsophage et le duodénum. C'est l'organe responsable des premières étapes de digestion mécanique et biochimique du bol alimentaire, mais il a aussi un rôle de régulation du système immunitaire et un rôle endocrinien via la sécrétion d'hormones régulant l'appétit et le métabolisme (Chu et Schubert 2012; Xianju Li et al. 2018). L'estomac est un réservoir permettant le stockage et le passage régulé du bol alimentaire à l'intestin. La digestion de la nourriture dans l'estomac est possible par la sécrétion d'acide gastrique et de diverses enzymes de digestion (lipases, protéases et amylases) (Chu et Schubert 2012; Sams et al. 2016).

Du point de vue histologique, l'estomac est divisé en deux parties chez l'humain (corps et antre) et en trois parties chez la souris (fondus, corps et antre) (figure 1) qui ont des

fonctions biologiques qui leur sont propres (Chu et Schubert 2012). Le fondus, partie proximale de l'estomac non présente chez l'humain, est composé d'un épithélium stratifié et a pour fonction d'entreposer de la nourriture. Le corps et l'antra constituent l'estomac glandulaire et sont constitués d'un épithélium cylindrique simple organisé en glandes. La région du corps permet la digestion de la nourriture par la sécrétion d'acide gastrique et de certaines enzymes de digestion. L'antra, la partie la plus distale de l'estomac, prépare le bol alimentaire à son entrée dans le duodénum via la sécrétion de mucines formant un mucus protecteur. Le corps comme l'antra comportent aussi des cellules endocrines responsables de la sécrétion d'hormones (Xianju Li et al. 2018; Ni et al. 2019).

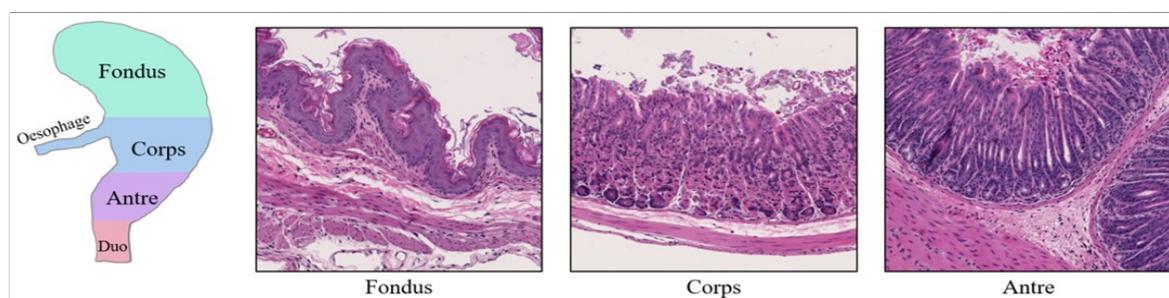


Figure 1 Régionalisation de l'estomac murin

Le schéma à gauche représente les différentes régions de l'estomac murin, soient le fondus, le corps et l'antra. L'oesophage permet l'entrée du bol alimentaire dans l'estomac, et le duodénum (Duo) en permet sa sortie. Les trois photos de coupes d'estomacs murins montrent l'architecture du fondus, du corps et de l'antra. Coloration hématoxyline et éosine (H&E), grossissement 10X.

6.1.2 Les cellules épithéliales gastriques

La glande est l'unité fonctionnelle de l'estomac. Comme montrée à la figure 2, la glande gastrique peut être subdivisée en quatre zones fonctionnelles : le fovéole, l'isthme, le collet et la base. Généralement, le fovéole contient principalement des cellules à mucus de surface, l'isthme contient les cellules souches et progénitrices, le collet contient les cellules à mucus du collet et la base contient les cellules zymogéniques. Les cellules pariétales et endocrines sont retrouvées sur la longueur de la glande (Chu et Schubert 2012; Mccracken et Wells 2017) (figure 2).

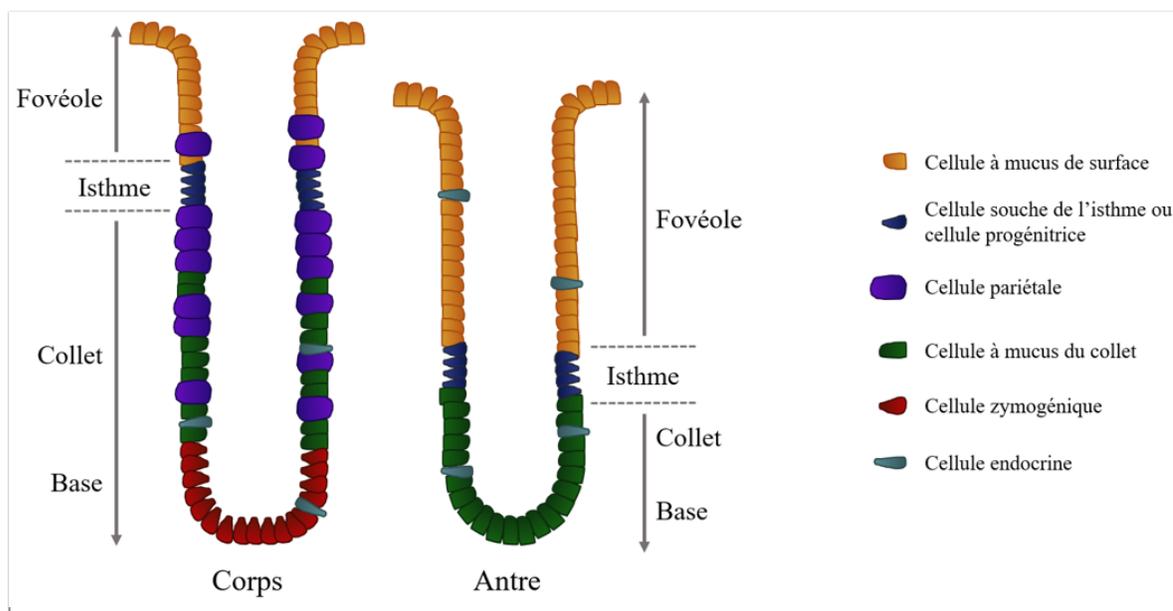


Figure 2 Schéma des cellules épithéliales composant les glandes du corps et de l'antra de l'estomac

Représentation schématisée des glandes du corps et de l'antra. Chaque glande est séparée en quatre zones (fovéole, isthme, collet et base), les flèches représentent la direction de migration des cellules à partir de l'isthme. Le corps est composé de cellules à mucus de surface (jaune), cellules souches de l'isthme et cellules progénitrices (noir), cellules pariétales (mauve), cellules à mucus du collet (vert), cellules zymogéniques (rouge) et cellules endocrines (turquoise). Les glandes de l'antra sont composées de cellules à mucus de surface (jaune), cellules souches de l'isthme et cellules progénitrices (noir), cellules à mucus du collet (vert) et cellules endocrines (turquoise).

6.1.2.1 Les cellules souches épithéliales gastriques

La région proliférative de l'estomac se trouve dans la région de l'isthme, c'est-à-dire le tiers supérieur des glandes du corps et le tiers inférieur des glandes de l'antra. Les cellules souches de l'isthme se divisent pour former les cellules progénitrices. Ces dernières vont se multiplier et migrer de manière ascendante et descendante afin de former les cinq types principaux de cellules épithéliales différenciées de l'estomac : les cellules à mucus de surface et du collet, les cellules pariétales, les cellules zymogéniques et les cellules endocrines. Ces cellules différenciées vont ensuite continuer leur migration jusqu'au moment où elles seront éliminées par apoptose dans le haut du fovéole ou au fond de la

base de la glande (Chu et Schubert 2012; Hoffmann 2013; Mills et Shivdasani 2011) (figure 2).

Même si l'existence de cellules prolifératives dans l'isthme a été mise en évidence en 1993 par Karam et Leblond (Karam et Leblond 1993), l'identité moléculaire des cellules souches gastriques reste incertaine à ce jour. Quelques marqueurs potentiels ont été associés aux cellules souches de l'isthme comme *Bmi1* (Yoshioka et al. 2019), *Mist1* (Hayakawa et al. 2015) et *Sox2* (Arnold et al. 2011), mais aucun marqueur n'est exprimé de manière exclusive dans ces cellules. D'autres cellules à caractère souches ont aussi été identifiées à la base des glandes de l'estomac comme les cellules exprimant *Lgr5* (Barker et al. 2010; Giroux et Rustgi 2017; Leushacke et al. 2013; Zavros 2018), *Troy* (Stange et al. 2013) et *Lrig1* (Schweiger et al. 2018). Mais ces cellules sont souvent quiescentes en condition homéostatique et jouent donc principalement un rôle de cellules souches de réserve, c'est-à-dire qu'elles peuvent être activées en cas de dommage à la muqueuse pour soutenir les cellules souches de l'isthme (Barker et al. 2010; Leushacke et al. 2013; Stange et al. 2013; Zavros 2018).

6.1.2.2 Les cellules pariétales

Les cellules pariétales sont le type cellulaire épithélial principal des glandes du corps et sont absentes de l'antrum (Ni et al. 2019) (figure 2). Les cellules pariétales sont issues des cellules souches de l'isthme en condition homéostatique et sont incapable de se diviser lorsque totalement différenciées (Bredemeyer et al. 2009). Elles expriment à leur membrane apicale la pompe H^+/K^+ -ATPase (pompe à protons), transporteur permettant la sortie d'un ion H^+ contre l'entrée d'un ion K^+ , ce qui acidifie le contenu de l'estomac à un pH de 1,7 chez l'humain afin de faciliter la digestion des aliments (Dressman et al. 1990). La sécrétion d'acide gastrique permet aussi d'activer certaines enzymes gastriques comme le pepsinogène sécrété par les cellules zymogéniques (Chu et Schubert 2012; Xianju Li et al. 2018). Présentes dans toutes les régions de la glande, les cellules pariétales font partie de la niche des cellules à mucus du collet, cellules progénitrices des cellules zymogéniques. Elles ont donc une influence importante sur la maturation des cellules zymogéniques (Bredemeyer et al. 2009; Hoffmann 2013).

6.1.2.3 Les cellules à mucus

Les mucines gastriques sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire qui sont soit ancrées à la membrane ou sécrétées par les cellules à mucus de l'estomac. Les principales mucines gastriques sont MUC1, MUC5AC et MUC6 (Reis et al. 2000) et composent en grande partie la couche de mucus servant à protéger la muqueuse gastrique contre l'acidité, les forces mécaniques, les enzymes de digestion et les agents pathogènes du contenu de l'estomac (Hoffmann 2012; Xianju Li et al. 2018). Il existe deux types de cellules épithéliales sécrétant le mucus : les cellules à mucus de surface et les cellules à mucus du collet (Xianju Li et al. 2018) (figure 2). Les cellules à mucus de surface se trouvent dans la région du fovéole des glandes du corps et de l'antra. Ces cellules proviennent de la division et migration ascendante des cellules progénitrices de l'isthme. Le principal marqueur des cellules à mucus de surface est MUC5AC (Xianju Li et al. 2018), mais ces cellules sécrètent aussi MUC1 (Babu et al. 2006) et peuvent être identifiées en utilisant la lectine UEA-1 (Narita et Numao 1992). Le deuxième type de cellules à mucus de l'estomac sont les cellules à mucus du collet. Elle se trouvent dans la région du collet de la glande et sont issues de la migration descendante des cellules progénitrices de l'isthme ainsi que de leur propre prolifération (Hoffmann 2012). Ces cellules sécrètent majoritairement MUC6 (Hoffmann 2013; Xianju Li et al. 2018) et la lectine GS-II (Kodaira et al. 2000) ou un marquage contre Tff2 (Hoffmann 2013; Quante et al. 2010) qui sont souvent utilisés pour identifier ces cellules. Les cellules à mucus du collet sont aussi les cellules progénitrices des cellules zymogéniques (Bredemeyer et al. 2009; Hoffmann 2012, 2013).

6.1.2.4 Les cellules zymogéniques

Les cellules zymogéniques sont des cellules acinaires sécrétant entre autres des enzymes digestives (pepsinogènes, lipases, protéases). Ces cellules non prolifératives se retrouvent dans la région de la base des glandes du corps de l'estomac (figure 2) et expriment différents marqueurs spécifiques comme le *Gastric Intrinsic Factor* (GIF) et Mist1 (Xianju Li et al. 2018; Ni et al. 2019). Les cellules zymogéniques sont issues de la différenciation des cellules à mucus du collet. En effet, ces dernières se différencient en cellules pré-zymogéniques qui deviennent par la suite des cellules zymogéniques matures (Bredemeyer et al. 2009; Hoffmann 2012, 2013). Plusieurs facteurs influencent la différenciation et maturation des cellules zymogéniques. Entre autres, la présence de cellules pariétales

permet une maturation complète des cellules zymogéniques via la sécrétion de ligands SHH et d'amphiréguline (Hoffmann 2013). La maturation complète des cellules zymogéniques est aussi dépendante de la voie des *bone morphogenetic proteins* (BMP) (Hoffmann 2013; Maloum et al. 2011), de la distance de migration des cellules vers le bas de la glande gastrique et de l'expression de Mist1. En effet, sans Mist1, les cellules restent bloquées à un stade transitoire immature présentant à la fois les caractéristiques des cellules à mucus du collet et les cellules zymogéniques (Bredemeyer et al. 2009; Hoffmann 2012; Ramsey et al. 2007).

6.1.3 Les cellules mésenchymateuses

6.1.3.1 Les fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules mésenchymateuses qui sont relativement peu actives lorsque le tissu est en homéostasie, mais qui s'activent en cas de dommage ou pathologie via la prolifération et sécrétion de facteurs solubles, d'enzymes de dégradation et de constituants de la matrice extracellulaire (MEC) (Bremnes et al. 2011; Darby et Hewitson 2007; Theocharis, Manou, et Karamanos 2019). Les fibroblastes sont situés dans le stroma et se retrouvent à proximité des cellules épithéliales avec qui ils entretiennent une communication bidirectionnelle dans le but de maintenir l'intégralité tissulaire. Les fibroblastes sont issus de diverses origines comme la prolifération des fibroblastes résidents, l'appel de précurseurs circulants de la moelle osseuse ou la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) des cellules épithéliales (Darby et Hewitson 2007). Les fibroblastes forment donc une population hétérogène selon leur origine mais peuvent être identifiés par un marqueur universel, soit la vimentine (Kalluri et Zeisberg 2006).

6.1.3.2 Les myofibroblastes

En condition d'homéostasie, il existe une balance entre le nombre de fibroblastes et de myofibroblastes dans le stroma d'un tissu (Hawinkels et al. 2014; Hussey, Keane, et Badylak 2017). Lorsque les fibroblastes sont activés par un dommage tissulaire, de l'inflammation ou une pathologie, cet équilibre est rompu et certains fibroblastes se transforment en myofibroblastes afin de former un stroma réactif (Darby et Hewitson 2007). En effet, les myofibroblastes sont plus bioactifs que les fibroblastes, c'est-à-dire qu'ils prolifèrent plus et qu'ils sécrètent davantage de facteurs solubles pour générer une

réponse aux cellules avoisinantes. Les myofibroblastes sécrètent aussi des composants de la MEC en plus grande quantité ainsi que des enzymes permettant de modifier la MEC (Valkenburg, de Groot, et Pienta 2018). Ces caractéristiques des myofibroblastes leur permettent de pouvoir réagir à une modification de l'équilibre tissulaire afin de ramener le tissu à un état homéostatique. Lorsque cela est atteint, certains myofibroblastes vont mourir par apoptose ou se retransformer en fibroblastes afin de recréer l'état original du tissu (Darby et Hewitson 2007). Les myofibroblastes, comme les fibroblastes, sont localisés à proximité des cellules épithéliales et sont donc en mesure de communiquer avec elles via la sécrétion de facteurs de croissance (TGF β , BMP, Wnt), de cytokines (SDF1), de chimiokines et d'autres facteurs solubles (Le Guen et al. 2015). Au niveau moléculaire, ce qui différencie les myofibroblastes des fibroblastes est qu'en plus d'exprimer la vimentine, ils expriment aussi l' α SMA (Le Guen et al. 2015).

6.1.3.3 Les télocytes

Les télocytes sont un type cellulaire mésenchymateux qui ont longtemps été confondus avec les cellules de Cajal étant donné leur morphologie semblable avant d'être distinguées en tant que cellules ressemblant aux cellules de Cajal. C'est en 2009 que Popescu a proposé le nom de télocyte afin de les dissocier complètement des cellules de Cajal. Les télocytes ont depuis été étudiés avec un intérêt grandissant dans différents organes (systèmes cardiaque, gastrointestinal, reproductif, urinaire, pulmonaire, hépatique, pancréatique et musculaire) (Varga et al. 2019). Au niveau morphologique, les télocytes sont des cellules comportant un petit corps cellulaire composé majoritairement du noyau et de longs prolongements membranaires fins appelés télopodes. Les télopodes sont composés de podoms et de podomères. Les podoms sont des régions où la membrane se dilate formant des protubérances renfermant des mitochondries et du réticulum endoplasmique séparées par des espaces libres appelés podomères. Ces longs télopodes permettent de former un réseau en trois dimensions via des contacts hétérocellulaires ainsi qu'avec les éléments de la MEC comme le collagène et les fibres élastiques. L'intérêt grandissant pour les télocytes vient des rôles variés que ceux-ci semble occuper dans le maintien de l'homéostasie tissulaire comme le support mécanique, la transduction de signal, le renouvellement et la réparation tissulaire, la surveillance immunitaire en lien avec l'inflammation et la différenciation des cellules épithéliales (Shoshkes-Carmel et al. 2018). Au niveau

gastrointestinal, il a récemment été mis en évidence que les télocytes exprimant le facteur de transcription FOXL1 sont essentiels au maintien de la niche des cellules souches intestinales (Shoshkes-Carmel et al. 2018). Via leur localisation sub-épithéliale, les télocytes FOXL1⁺ régulent ainsi la prolifération et différenciation des cellules souches intestinales et progénitrices. Les télocytes, comme plusieurs cellules mésenchymateuses, peuvent communiquer avec les cellules à proximité via la sécrétion de facteurs de croissance, cytokines et chimiokines (Nawaz et al. 2018; D. C. Wang et Wang 2017). Ils peuvent aussi modifier la MEC par la sécrétion d'enzymes de remodelage ou dégradation comme les MMP10 et MMP3 et en sécrétant des composantes de la matrice comme différents types de collagènes (Nawaz et al. 2018; Zheng et al. 2013). Une diminution du nombre de télocytes a d'ailleurs été remarqué dans des cas de fibrose de l'intestin (Milia et al. 2013) et du colon (Manetti et al. 2015). Comme aucun marqueur spécifique pour les télocytes n'a été mis à jour jusqu'à maintenant, il est possible de les observer par microscopie électronique ou en utilisant une combinaison de différents marqueurs comme vimentine, CD34, PDGFR α et c-kit (Chang et al. 2015). Les télocytes sont aussi généralement négatifs pour α SMA dans le tissu gastrointestinal (X. Wang et Cretoiu 2016).

6.1.3.4 Les Cancer Associated Fibroblasts

En situation de carcinogenèse, les cellules mésenchymateuses peuvent se transformer en un type cellulaire plus réactif qui contribue à former le microenvironnement tumoral : les *Cancer Associated Fibroblasts* (CAF). Les CAF sont donc une population hétérogène de cellules mésenchymateuses prolifératives, migratoires et sécrétrices issues de la transformation des cellules résidentes du tissu en cellules mésenchymateuses (fibroblastes, myofibroblastes et cellules épithéliales) ou des cellules souches mésenchymateuses en elles-même (moelle osseuse ou tissu adipeux) (Pietras et Östman 2010; Valkenburg, de Groot, et Pienta 2018). Pour identifier les CAF dans une tumeur, comme aucun marquage spécifique n'a été identifié jusqu'à ce jour, une combinaison non-spécifique de vimentine et d' α SMA est le plus souvent utilisée (Hawinkels et al. 2014; De Wever et al. 2008). Cependant, cette combinaison ne permet pas de différencier un CAF d'un myofibroblaste au niveau histologique puisque tous les deux expriment la vimentine et α SMA (Valkenburg, de Groot, et Pienta 2018). Comme les CAF sont des cellules hautement bioactives, leur sécrétion permet de transmettre de l'information aux cellules avoisinantes

(cellules tumorales, cellules mésenchymateuses, cellules immunitaires...) et aussi de modifier la MEC. En effet, les CAF ont la capacité de recruter des macrophages et moduler leur polarisation, de favoriser l'angiogenèse, de permettre l'initiation et la progression tumorale ainsi que de faciliter l'invasion et migration des cellules tumorales (Pietras et Östman 2010). Toutes ses fonctions sont dues à la capacité des CAF de sécréter plusieurs facteurs de croissance, cytokines et éléments de la MEC. La voie du TGF β a été démontrée comme étant importante pour la transformation des fibroblastes en CAF et pour créer un microenvironnement favorisant l'EMT des cellules tumorales épithéliales (Attieh, Vignjevic, et Matic 2016; Bhowmick 2004; Pietras et Östman 2010). Pour stimuler la croissance et progression tumorale ainsi que modifier le microenvironnement, des facteurs solubles et cytokines sont sécrétés par les CAF, comme ceux appartenant aux signalisations FGF, HGF, PDGF, VEGF, NF κ B, TNF α , IFN γ , SDF1, IL-6, CTGF, EGF, GAS6, Galectine-1, WNT, SFRP1, SHH, BMP et certaines CXCL (Pietras et Östman 2010; Valkenburg, de Groot, et Pienta 2018). De plus, les CAF ont la capacité de modifier directement la MEC par la sécrétion d'enzymes la modifiant ou la dégradant (MMP, cathepsines, activateurs du plasminogène) ou en sécrétant directement des éléments de la matrice (collagènes, téna-scine, périostine, fibronectine) (Pietras et Östman 2010). Ainsi, les CAF peuvent migrer à travers la MEC en sécrétant des enzymes de dégradation pour ensuite sécréter des éléments de la MEC (surtout la fibronectine) sur leur chemin afin de favoriser la migration des cellules tumorales (Hamidi et Ivaska 2018).

6.1.3.5 La matrice extracellulaire

La MEC est un réseau en trois dimensions de fibres dynamiques qui est en constante modification et renouvellement par les cellules qui y résident, dont les cellules mésenchymateuses (fibroblastes, myofibroblastes, télocytes) qui sont les principales cellules sécrétrices de protéines composant la MEC (Darby et Hewitson 2007; Theocharis, Manou, et Karamanos 2019; Zakhem et al. 2019). En effet, les cellules en contact avec la MEC sont ancrées à celle-ci et peuvent y recevoir des signaux via les récepteurs à leur surface (intégrines, récepteurs à domaine discoidin, récepteurs des facteurs de croissance, protéoglycans, récepteurs à l'acide hyaluronique) (Theocharis, Manou, et Karamanos 2019). En retour, les cellules peuvent répondre aux signaux envoyés par la MEC en sécrétant des éléments de la MEC ou des enzymes qui vont la modifier (MMP, ADAM,

uPA, granzyme, collagénases). Ainsi, par ses propriétés mécaniques et biochimiques, la MEC peut transmettre diverses informations aux cellules mésenchymateuses, épithéliales, immunitaires et endothéliales déclenchant des mécanismes liés à la prolifération, la survie, la migration, la différenciation et le maintien de l'homéostasie (Theocharis, Manou, et Karamanos 2019; Zakhem et al. 2019). La MEC a donc la capacité, en condition homéostatique, de maintenir les fibroblastes à un état peu actif et au contraire, en cas de dommage, d'activer les cellules mésenchymateuses, épithéliales et immunitaires. La MEC sert aussi de réservoir en trappant ou modulant la disponibilité de certains facteurs de croissance ou cytokines, molécules qui peuvent être rendues plus accessibles par des enzymes clivants ou remodelant les éléments de la matrice. Ces enzymes sont sécrétées par les cellules en contact avec la MEC (Theocharis, Manou, et Karamanos 2019). La MEC est composée d'environ 300 molécules, certaines étant de composantes fibreuses insolubles alors que d'autres étant des composantes solubles. Les composantes insolubles sont principalement les collagènes, laminines, fibronectines, protéoglycans et élastines. Les protéines solubles sont l'acide hyaluronique, protéines matricellulaires, facteurs de croissance, cytokines, chimiokines et enzymes de digestion ou modification de la matrice (Theocharis, Manou, et Karamanos 2019; Valkenburg, de Groot, et Pienta 2018; Zakhem et al. 2019).

6.2 Les interactions épithélio-mésenchymateuses

Les tissus des organes sont composés de différents types cellulaires qui interagissent entre eux afin de maintenir l'homéostasie. Dans le cas du système gastrointestinal, deux compartiments cellulaires jouent un rôle crucial dans le maintien de la muqueuse : l'épithélium et le mésenchyme. L'épithélium est la couche de cellules en contact avec la lumière du tube digestif alors que le mésenchyme est la couche de cellules et MEC qui se trouve sous l'épithélium. La communication entre ces deux compartiments est nécessaire au maintien d'un tissu sain et une dérégulation de ces interactions peut mener à un état pathologique.

6.2.1 En conditions homéostatiques

6.2.1.1 Le développement embryonnaire et l'organogenèse

Les interactions entre l'endoderme (qui formera l'épithélium) et le mésoderme (qui formera le mésenchyme) sont connues depuis longtemps comme étant les chefs d'orchestre de l'embryogenèse. En effet, ces interactions permettent entre autres la régionalisation du tube digestif selon l'axe antéro-postérieur. Pour ce faire, le mésoderme et l'endoderme communiquent de manière bidirectionnelle via différentes voies de signalisation comme SHH, TGF β , BMP, FGF, NOTCH et WNT (Le Guen et al. 2015; Hoffmann 2013). Ainsi la régionalisation implique une spécialisation des cellules et de leur environnement tant au niveau de l'endoderme que du mésoderme afin que la muqueuse soit entièrement fonctionnelle (Valkenburg, de Groot, et Pienta 2018).

6.2.1.2 Le maintien de l'homéostasie à l'âge adulte

Les interactions entre le compartiment épithélial et mésenchymateux sont toutes aussi importantes à l'âge adulte que durant le développement embryonnaire afin de maintenir l'homéostasie tissulaire et éviter le développement de pathologies (Hamidi et Ivaska 2018). Une partie importante des interactions cellule-matrice se produisent entre les cellules épithéliales et la membrane basale, région du mésenchyme la plus près du compartiment épithélial. Ainsi, les cellules épithéliales peuvent obtenir de l'information sur leur environnement à l'aide de récepteurs comme les intégrines, des protéines transmembranaires hétérodimériques reconnaissant divers ligands dont plusieurs protéines de la MEC (collagène, fibronectine, laminine). La liaison entre les intégrines et leurs ligands forme l'adhésome à partir de la queue cytoplasmique des intégrines. L'adhésome est un assemblage de protéines d'échafaudage, de protéines signalétiques et d'éléments du cytosquelette qui permettent d'induire une cascade de signalisation intracellulaire en réponse à un stimulus extracellulaire (Winograd-katz et al. 2014). Cette cascade permet ensuite à la cellule épithéliale de produire une réponse en sécrétant différents messagers ou éléments de la MEC. Cette communication bidirectionnelle permet donc de générer des processus modifiant la survie, la migration et la différenciation cellulaire (Hamidi et Ivaska 2018; Theocharis, Manou, et Karamanos 2019). Un bon exemple de relation épithélio-mésenchymateuse qui participe aux fonctions normales d'un tissu est la niche des cellules

souches intestinales. En effet, le microenvironnement essentiel au bon fonctionnement des cellules souches intestinales est établi par les cellules de Paneth, mais aussi par les cellules mésenchymateuses sub-épithéliales au bas de la crypte et de la MEC entourant ces cellules (Sailaja, He, et Li 2016). La voie de WNT est particulièrement importante pour la prolifération des cellules souches et il a été montré que les cellules de Paneth ainsi que les cellules mésenchymateuses sécrètent des facteurs WNT et RSPON, mais que seulement ceux sécrétés par les cellules mésenchymateuses sont essentiels au bon fonctionnement de la crypte intestinale (Greicius et Virshup 2019; Kabiri et al. 2014).

6.2.2 Le microenvironnement tumoral

La communication entre les compartiments épithélial et mésenchymateux est importante dans le maintien d'un tissu sain et c'est pourquoi une déstabilisation de cette communication est présente dans plusieurs pathologies comme le cancer (Valkenburg, de Groot, et Pienta 2018). Dans l'initiation de la polypose, le stroma peut jouer soit le rôle de répresseur tumoral ou il peut promouvoir la tumorigenèse. En effet, le stroma a comme propriété intrinsèque de maintenir l'homéostasie tissulaire et donc d'empêcher ou ralentir la néoplasie des cellules épithéliales en influençant leur prolifération, différenciation et migration (Valkenburg, de Groot, et Pienta 2018). L'autre possibilité est que le stroma peut favoriser la carcinogenèse en devenant réactif et en envoyant des signaux pro-tumoraux à l'épithélium (Barcellos-Hoff et Ravani 2000; Kaukonen et al. 2016; Valkenburg, de Groot, et Pienta 2018). Comme cette communication est bidirectionnelle, l'épithélium va à son tour sécréter des facteurs permettant de modifier la MEC ou favoriser la transformation des cellules mésenchymateuses en cellules réactives (Gandellini et al. 2015; Kojima et al. 2010). Ceci s'illustre très bien dans les cas de carcinomes (qui représente 90% des tumeurs) qui constituent un milieu hétérogène composé de cellules tumorales de nature épithéliales et d'un stroma réactif composé principalement de MEC et de cellules mésenchymateuses, immunitaires et endothéliales réactives (Pietras et Östman 2010; Valkenburg, de Groot, et Pienta 2018).

Le microenvironnement tumoral est donc composé d'une MEC qui sera plus rigide et contractile (Theocharis, Manou, et Karamanos 2019), ce qui promeut la croissance, survie et migration cellulaire, par exemple par la diminution de l'expression de PTEN dans le

pancréas (Mouw et al. 2014). Une altération de la quantité et de l'orientation des fibres de collagène de type I ainsi qu'une augmentation de la ténascine sont observées dans plusieurs types de tumeurs (Werb et Lu 2015) et la présence de fibrose (accumulation anormale de fibres de collagène) est aussi fréquente dans plusieurs tumeurs (Huijbers et al. 2013). Ainsi, l'augmentation de la MEC dans une tumeur permet d'entreposer davantage de médiateurs pro-inflammatoires comme des cytokines, des facteurs de croissance et des enzymes dégradant ou modifiant la MEC (Theocharis, Manou, et Karamanos 2019). Le microenvironnement tumoral contient aussi une plus grande quantité de myofibroblastes et de CAF, cellules plus bioactives que les fibroblastes qui sécrètent donc davantage de facteurs de croissance et cytokines favorisant la croissance tumorale et l'inflammation en plus de sécréter des éléments de la MEC ou des enzymes la modifiant pour la mise en place d'un microenvironnement oncogénique (Hamidi et Ivaska 2018; Theocharis, Manou, et Karamanos 2019). Tous ces éléments évoluant ensemble forment l'environnement idéal pour l'initiation et la progression de la carcinogenèse ainsi que la migration et invasion des cellules tumorales dans le but de former des métastases.

6.3 Le cancer gastrique

Au Canada, le cancer gastrique représente 3500 nouveaux cas par années avec 2100 morts annuellement et un taux de survie sur 5 ans de seulement 25% (Canadian Cancer Society's Advisory Committee 2018). L'incidence mondiale du cancer gastrique en 2012 était de 2.0% chez les hommes et le cancer gastrique représente 6.8% des nouveau cas de cancer annuellement, ce qui le place au 5^e rang des cancers les plus communs (Ferlay et al. 2015). Donc même si l'incidence du cancer gastrique a diminué durant les dernières décennies, celui-ci reste une maladie mortelle avec un très mauvais pronostic et une résistance élevée à la chimiothérapie (Gao et al. 2018). Le cancer gastrique est une maladie qui présente peu de symptômes caractéristiques et qui est difficile à diagnostiquer de manière précoce puisque seule une endoscopie accompagnée d'une biopsie permet de repérer et identifier les lésions. Ainsi, au Canada, entre 2011 et 2015, 64% des cas de cancer gastrique ont été diagnostiqués au troisième ou quatrième stade (Canadian Cancer Society's Advisory Committee 2018), ce qui limite grandement les options thérapeutiques (Ahn et Park 2016). De plus, les tumeurs gastriques présentent un haut taux d'hétérogénéité génétique et

épigénétique entre les patients, mais aussi au sein d'une même tumeur, ce qui complexifie la compréhension de cette pathologie (Gao et al. 2018).

Les facteurs de risques associés au cancer gastrique sont soit d'origine héréditaire ou environnementale. Les facteurs héréditaires représentent 10% des cancer gastriques et sont dus principalement à des mutations dans des gènes liés à la voie des BMP, *CDHI*, *CTNNA1*, *TP53*, *APC* et *STK11* (Cutsem et al. 2016). Les facteurs environnementaux sont presque tous liés au mode de vie comme la cigarette, l'obésité, l'alimentation (riche en sel, riche en nitrates, riche en sucres raffinés, faible en fruits et légumes) et l'infection par la bactérie *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (Compare, Rocco, et Nardone 2010; Massarrat et Stolte 2014). Il existe plusieurs classifications pour différencier les différents types de cancer gastriques selon leurs caractéristiques histologiques ou moléculaires. La première classification largement adoptée qui est encore utilisée à ce jour est la classification de Lauren établie en 1965 (Lauren 1965). Celle-ci se base sur les caractéristiques histologiques des tumeurs pour les classer en deux catégories : le type diffus et le type intestinal. Les tumeurs de type diffus présentent de petites cellules tumorales éparses, seules ou en petit amas, et une absence de structures glandulaires. Ces tumeurs présentent souvent une infiltration profonde, un mauvais pronostic et une mutation de *CDHI*, gène codant pour la E-cadhérine (Xiangchun Li et al. 2016). De leur côté, les tumeurs de type intestinal montrent des structures glandulaires définies, même si leur architecture est altérée, qui comportent des cellules épithéliales différenciées ayant un phénotype intestinal (Lauren 1965). Avec le développement des technologies de séquençage à haut débit, plusieurs groupes ont mis sur pied de nouvelles classifications basées sur les signatures génétiques et moléculaires des tumeurs (Bass, Adam J. Thorsson et al. 2014; Cho et al. 2011; Cristescu et al. 2015). Ces classifications ont plusieurs points en commun, la plus populaire étant celle du Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA) en 2014 qui sépare les tumeurs gastriques en quatre catégories : Signature d'infection au virus Epstein-Barr (mutation de *PI3K*, hyperméthylation des promoteurs de gènes), instabilité des microsatellites (inactivation de *MLH1*), tumeurs stable génomiquement (associé au type diffus de Lauren et mutation de *RHOA*) et tumeur avec instabilité chromosomique (aneuploïdie et multiples amplifications géniques) (Bass, Adam J. Thorsson et al. 2014).

6.3.1 La cascade de la carcinogenèse gastrique

Comme le cancer gastrique de type intestinal a été plus étudié que le type diffus, il est possible de déterminer les étapes clés menant à la formation de ces tumeurs. D'abord, la muqueuse gastrique, sous l'effet de plusieurs facteurs comme une infections par *H. pylori*, développe une gastrite chronique non-atrophique (Correa et Piazzuelo 2012; Frank et al. 2012). À la suite de cette inflammation, la muqueuse développe d'autres signes précurseurs du cancer gastrique comme les lésions préneoplasiques (perte des cellules pariétales, *spasmolytic peptide expressing metaplasia* et métaplasie intestinale). Ces lésions mènent ensuite au développement d'adénomes qui progressent en carcinomes pour ensuite envahir les tissus environnants et former des métastases à des sites distants (Correa et Piazzuelo 2012). La figure 3 montre cette cascade de la carcinogenèse gastrique incluant les éléments génétiques caractéristiques de chacune de ces étapes.

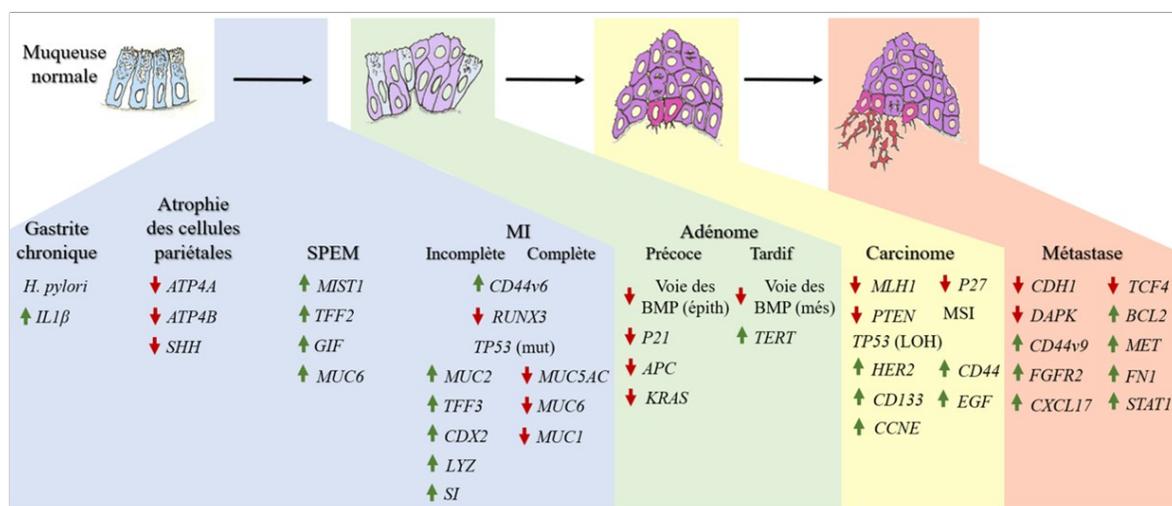


Figure 3 Cascade moléculaire de la carcinogenèse gastrique de type intestinal

Schéma montrant les étapes menant à la formation du cancer gastrique de type intestinal (gastrite, atrophie des cellules pariétales, SPEM, MI, adénome, carcinome et métastases). Cette cascade est accompagnée d'une liste non-exhaustive des événements génétiques caractéristiques de chacune de ces étapes. Les événements menant à une augmentation de l'activité du gène ou de la protéine sont marqués par une flèche verte, ceux menant à une diminution sont marqués par une flèche rouge. SPEM = *spasmolytic peptide expressing metaplasia*, MI = métaplasie intestinale, *H. pylori* = *Helicobacter pylori*, *TP53* mut = mutation de *TP53*, *TP53* LOH = perte d'hétérozygotie de *TP53*, MSI = instabilité des microsatellites. Les illustrations ont été réalisées par Pierre Chailier Ph.D. et la figure a été prêtée par la P^{re} Nathalie Perreault Ph.D.

6.3.1.1 Les lésions préneoplasiques

Les lésions préneoplasiques sont les événements survenant après la gastrite et menant à la formation d'adénomes gastriques. Ces lésions sont l'atrophie des cellules pariétales, suivie de la formation de *spasmolytic peptide expressing metaplasia* (SPEM) et finalement la métaplasie intestinale (voir figure 4).

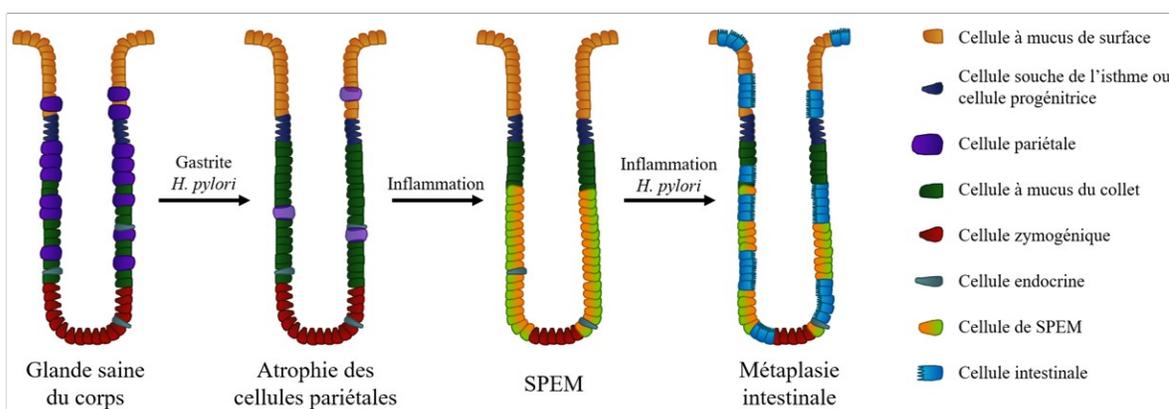


Figure 4 Les lésions préneoplasiques gastriques

Schéma montrant le développement des lésions préneoplasiques gastriques : la perte des cellules pariétales, le SPEM et la métaplasie intestinale. Les flèches indiquent les éléments déclencheurs ou permettant la progression d'une lésion à une autre. Les cellules de SPEM sont représentées en jaune-vert et les cellules de type intestinal sont en bleu.

D'abord, les cellules pariétales peuvent devenir atrophiées à la suite d'une infection chronique causée par *H. pylori* ou par une gastrite atrophique (Petersen, Mills, et Goldenring 2017). Cette perte des cellules pariétales au sein des glandes du corps a un effet important sur l'homéostasie glandulaire puisque les pariétales sécrètent une multitude de molécules dont certaines sont essentielles à la différenciation et maturation des cellules zymogéniques (Bredemeyer et al. 2009; Hoffmann 2013). De plus, l'espace laissé par les cellules pariétales atrophiées induit la prolifération des cellules à mucus qui vont remplacer les cellules pariétales dans les glandes du corps (Goldenring et Nam 2010). Malgré tous ces changements morphologiques de l'épithélium gastrique, la perte des cellules pariétales à elle seule n'est pas suffisante à la poursuite de la cascade de la carcinogenèse gastrique. En effet, même si la maturation des cellules zymogéniques n'est pas complète, la présence

d'inflammation est nécessaire à la formation du SPEM (Burclaff et al. 2017; Hoffmann 2012).

Le SPEM est une lésion préneoplasique du corps de l'estomac qui est constitué d'une transdifférenciation des cellules zymogéniques en cellules à mucus du collet (Hayakawa, Fox, et Wang 2017). Ainsi, les cellules zymogéniques retournent à un état prolifératif ressemblant à celui des cellules pré-zymogéniques qui ont les caractéristiques à la fois des cellules à mucus du collet et des cellules zymogéniques. La différence entre les cellules du SPEM et les cellules pré-zymogéniques est principalement que les cellules pré-zymogéniques n'expriment pas *Mist1* (cellules zymogéniques immatures) alors que les cellules du SPEM expriment *Mist1* (cellules zymogéniques matures) (Goldenring et Nam 2010; Nozaki et al. 2008). De plus, la prolifération des cellules du SPEM provient des cellules zymogéniques de la base de la glande, cette néoplasie est donc indépendante des cellules souches de l'isthme (Goldenring et Nam 2010). Au niveau histologique, une augmentation des cellules positives à la fois pour les marqueurs des cellules à mucus du collet (*Tff2*, *Muc6* et lectine GS-II) et les marqueurs des cellules zymogéniques (*GIF* et *Mist1*) est observée (Hoffmann 2012).

Finalement, la métaplasie intestinales (MI) des cellules épithéliales gastriques peut prendre son origine du SPEM (Goldenring et Nam 2010; Hoffmann 2012) ou uniquement de l'inflammation chronique causée par *H. pylori* ou une gastrite (Hoffmann 2012). Elle est caractérisée par l'acquisition de caractéristiques intestinales par les cellules épithéliales gastriques comme la présence de cellules caliciformes, de cellules absorbantes et la sécrétion de mucines et enzymes intestinales. Il existe deux classes de MI : la MI incomplète et la MI complète. La MI incomplète consiste en la cohabitation à la fois des caractéristiques intestinales et gastriques dans la muqueuse gastrique alors que la MI complète est le remplacement des caractéristiques gastriques par des caractéristiques intestinales au niveau de l'estomac (Barros et al. 2010).

Au niveau moléculaire, la MI s'apparente à une perte de la régionalisation du tube digestif qui s'est produit lors de l'organogenèse de l'estomac chez l'embryon. En effet, un des

facteurs de transcription impliqué dans la spécialisation du tube gastrointestinal est CDX2 dont l'expression est maintenue au niveau de l'intestin alors qu'elle est interrompue dans l'estomac (Le Guen et al. 2015). Il se trouve qu'en cas de MI, CDX2 est de nouveau exprimé dans le tissu gastrique et contribue à l'émergence du phénotype intestinal (Bai et al. 2002; Barros et al. 2010; Giroux et Rustgi 2017). D'autres protéines intestinales sont aussi produites de manière anormale par les cellules épithéliales gastriques comme MUC2, TFF3, la sucrase isomaltase et autres mucines intestinales (Babu et al. 2006; Goldenring et Nam 2010). Les cellules gastriques absentes des tissus atteints de MI complète sont principalement les cellules zymogéniques, cellules à mucus de surface et du collet, donc perte des mucines gastriques comme MUC5AC, MUC6 et MUC1 et des facteurs caractéristiques des cellules zymogéniques comme Mist1 et GIF (Hoffmann 2012). De plus, la MI n'affecte pas seulement les cellules épithéliales mais aussi les cellules mésenchymateuses sub-épithéliales. Les souris exprimant de manière ectopique CDX2 au niveau de l'estomac présentent des cellules mésenchymateuses adjacentes aux cellules épithéliales ressemblant aux fibroblastes péricryptaux intestinaux (H Mutoh et al. 2005). Lorsqu'un diagnostic de MI est posé, un suivi fréquent est recommandé puisqu'il s'agit du plus gros facteur de risque connu pour le développement du cancer gastrique. En effet, la présence de MI augmente le risque de développer une dysplasie de bas grade par un facteur de 25 fois dans les trois ans suivant le diagnostic (D. Li et al. 2016).

6.3.1.2 L'adénome et le carcinome

L'adénome gastrique est une lésion dysplasique qui n'envahit pas la *lamina propria*, qui est de nature bénigne et qui peut progresser en carcinome gastrique. Le carcinome, pour sa part, est une tumeur de type maligne envahissant la *lamina propria* et pouvant mener à la formation de métastases. Les adénomes gastriques peuvent être séparés en deux grandes classes selon leur phénotype soit gastrique ou intestinal. Le type le plus commun chez l'humain est l'adénome de type intestinal qui présente une architecture glandulaire ressemblant au cancer colorectal et exprime divers marqueurs intestinaux comme MUC2, CD10 et CDX2 (Ahn et Park 2016). L'adénome de type gastrique peut être soit de nature foveolaire ou pylorique selon sa localisation et conserve ses caractéristiques typiques de l'estomac (types cellulaires, mucines). L'adénome gastrique foveolaire est le second type d'adénome le plus commun chez l'humain et présente une monocouche d'épithélium

cuboïdale et une architecture tissulaire avec des embranchements irréguliers et des replis épithéliaux anormaux sans MI (Ahn et Park 2016). Par la suite, chaque adénome peut être défini comme étant de haut ou bas grade afin de spécifier davantage le stade de la maladie, mais cette évaluation reste plutôt subjective et peut varier selon le pathologiste ou les lignes directrices de différents pays (Ahn et Park 2016). De manière générale, l'adénome de bas grade peut présenter des mutations dans les gènes *TP53*, *APC* et *KRAS* (Grabsch et Tan 2013). L'adénome de haut grade est généralement caractérisé par un ratio noyau-cytoplasme plus élevé, une déplétion de certaines mucines et une architecture plus irrégulière que l'adénome de bas grade (Ahn et Park 2016).

Pour ce qui est du carcinome, comme mentionné préalablement, différentes nomenclatures existent afin de classer les différents types de cancer gastrique, mais puisque les tumeurs gastriques sont hautement hétérogènes tant au niveau histologique que moléculaire, catégoriser les tumeurs dans un seul type de cancer n'est pas simple. Malgré tout, certains événements génétiques sont connus pour être associés aux carcinomes de type intestinal selon la classification de Lauren (en opposition au type diffus) comme des mutations ou perte d'hétérozygotie (LOH) de *PTEN*, LOH de *TP53*, diminution de p27, productions de variants aberrants de CD44, augmentation de la cycline E, amplification de HER2 et une augmentation de la famille des EGF (T. Chen, Xu, et Zhou 2016; Grabsch et Tan 2013; Panani 2008). D'autres événements moléculaires sont connus pour être des événements tardifs au niveau du carcinome comme la présence de CD44v6, CD133 ou l'instabilité des microsatellites (S. Chen et al. 2013; Endoh et al. 2000).

Lorsqu'un carcinome envahit le compartiment mésenchymateux adjacent à l'épithélium, certaines cellules tumorales peuvent utiliser les vaisseaux sanguins ou lymphatiques pour s'établir et coloniser d'autres tissus de l'organisme. Ce phénomène permet la formation de masses tumorales secondaires distantes appelées métastases. Au niveau de la tumeur primaire gastrique, différents marqueurs pourraient suggérer la capacité des cellules tumorales à former des métastases comme une augmentation de STAT1, CXCL17, FGFR2, MET et BCL-2 ou une diminution de EGR2 (Feng et al. 2015; Matsuoka et Yashiro 2018; Panani 2008).

6.3.1.3 *Les cellules souches cancéreuses gastriques*

Les cellules souches cancéreuses (CSC) sont un sous-type de cellules tumorales qui ont la capacité de s'auto-régénérer et de mener à la formation de différentes lignées cancéreuses au sein de la tumeur. Elles ont la capacité d'initier la formation tumorale, conférer une résistance aux traitements et favoriser la formation de métastases (Batlle et Clevers 2017; Nosrati et al. 2014). Les CSC ont été documentées dans plusieurs types de cancer comme la leucémie, cancer du sein, cancer colorectal, cancer du cerveau et cancer gastrique (Batlle et Clevers 2017). Au niveau du cancer gastrique, plusieurs marqueurs ont été identifiés dernièrement comme LGR5, CD44, CD133, OCT4, SOX2 et NANOG (Nosrati et al. 2014; Singh 2014). En revanche, ces marqueurs ne sont pas spécifiques puisque plusieurs d'entre eux sont aussi des marqueurs de cellules souches saines. Une combinaison de plusieurs de ces marqueurs permettrait donc une identification plus précise des CSC gastriques comme il a été démontré pour CD44 et CD133 (Hirata et al. 2013; Nosrati et al. 2014). Le marqueur de CSC gastriques le plus étudié est sans contredit CD44, qui a d'ailleurs été identifié d'abord comme un marqueur pronostique de cancer gastrique.

CD44 est une glycoprotéine récepteur des hyaluronans et autres éléments de la MEC comme l'acide hyaluronique (HA), le collagène, la fibronectine et autres facteurs de croissance (Theocharis, Manou, et Karamanos 2019). CD44 joue un rôle important dans l'adhésion entre les cellules et la MEC et induit une signalisation intracellulaire favorisant la prolifération, la survie et la migration (Cichy et Puré 2003; Nosrati et al. 2014). Une des particularités de cette protéine est qu'elle possède divers variants d'épissage alternatif. Le plus commun est CD44s, où les exons 6 à 15 sont exclus, mais il existe d'autres variants où les exons 6 à 15 (appelés v1 à v10) peuvent être inclus seuls ou en combinaison (Morath, Hartmann, et Orian-rousseau 2016). CD44 est généralement localisé à la membrane plasmique, mais il peut aussi être présent et actif dans le cytoplasme ou être associé à la MEC par clivage enzymatique, ce qui lui confère des rôles différents. Par exemple, CD44 lié à la MEC peut inhiber l'activité de ses homologues membranaires en séquestrant la HA et ainsi empêcher sa liaison aux CD44 membranaires (Cichy et Puré 2003).

Dans le cancer gastrique, il a été montré que les motifs des différents variants de CD44 sont altérés, c'est-à-dire que certains variants qui normalement ne sont pas observés dans l'estomac le sont dans les tumeurs gastriques et à l'inverse, d'autres variants normalement présents sont absents. En effet, il a été démontré que les cellules tumorales gastriques exprimant CD44v9 sont plus résistantes contre les espèces réactives à l'oxygène (ROS) et pourraient donc participer à la récurrence du cancer gastrique après traitement (Hirata et al. 2013). De plus, l'expression de CD44v6 corrèle avec les lésions précoces des adénomes gastriques de type intestinal (da Cunha et al. 2010). Finalement le variant CD44v8-10 pourrait être un marqueur plus précis pour identifier les CSC gastriques que CD44s (Lau et al. 2014).

6.4 La voie des bone morphogenetic proteins

Découverts d'abord pour leur propriété de formation osseuse, les *bone morphogenetic proteins* (BMP) font partie de la grande famille des *transforming growth factor beta* (TGF β). Il existe une vingtaine de ligands BMP qui sont des morphogènes, c'est-à-dire que l'information véhiculée par un même ligand BMP diffère selon la concentration disponible dans le microenvironnement des cellules. Les BMP se trouvent sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères et plusieurs inhibiteurs sont connus comme noggin, chordin, les protéines dan, gremlin, cerberus et *twisted gastrulation* (Bragdon et al. 2011).

La signalisation des BMP est activée lorsque le BMP lie les récepteurs transmembranaires des BMP qui sont des sérine/thréonine kinases formant des hétérodimères : récepteur de type I (ALK1, ALK2, ALK3 ou BMPRI1A, ALK4 et ALK6) et de type II (BMPRII, ActRIIa et ActRIIb) (Bragdon et al. 2011). Il s'en suit alors une cascade de phosphorylation intracellulaire qui peut activer soit la voie des BMP dépendante des SMAD, soit la voie des BMP indépendante des SMAD. Pour la voie des BMP dépendante des SMAD (qui sont les effecteurs principaux de la voie des BMP), le récepteur de type I est transphosphorylé par le récepteur de type II sur son domaine GS, ce qui lui permet alors de phosphoryler les R-SMAD (SMAD1-5-8) sur leur motif SSXS, qui vont ensuite dimériser avec le Co-SMAD (SMAD4) dans le cytoplasme avant de transloquer au noyau afin de moduler l'expression des gènes cibles de la voie des BMP (Bragdon et al. 2011; Miyazono, Maeda, et Imamura 2005) (figure 5). Au niveau intracellulaire, il existe aussi les SMAD6 et SMAD7 qui sont

les SMAD inhibiteurs (I-SMAD). Les I-SMAD peuvent réguler négativement le BMPRI en bloquant son interaction avec le R-SMAD, en le ciblant pour l'ubiquitination et éventuellement pour la dégradation ou en favorisant son internalisation. Les I-SMAD peuvent aussi cibler les R-SMAD et Co-SMAD en compétitionnant la liaison du R-SMAD à BMPRI ou au Co-SMAD, en empêchant leur translocation au noyau ou en bloquant leur liaison aux promoteurs de leurs gènes cibles (W. Li et al. 2017; Miyazono, Kamiya, et Morikawa 2010; Miyazono, Maeda, et Imamura 2005). Pour ce qui est de la voie des BMP indépendante des SMAD, la transphosphorylation des récepteurs de la voie des BMP à la suite de la liaison du ligand peut activer d'autres voies de signalisation sans utiliser les SMAD comme la voie de p38-MAPK, ERK, JNK, NF- κ B, PI3K-Akt, PKA ou PKC. L'activation de la voie des BMP indépendante des SMAD entraîne différentes réponses cellulaires liées à la survie, la migration et la différenciation (Bragdon et al. 2011).

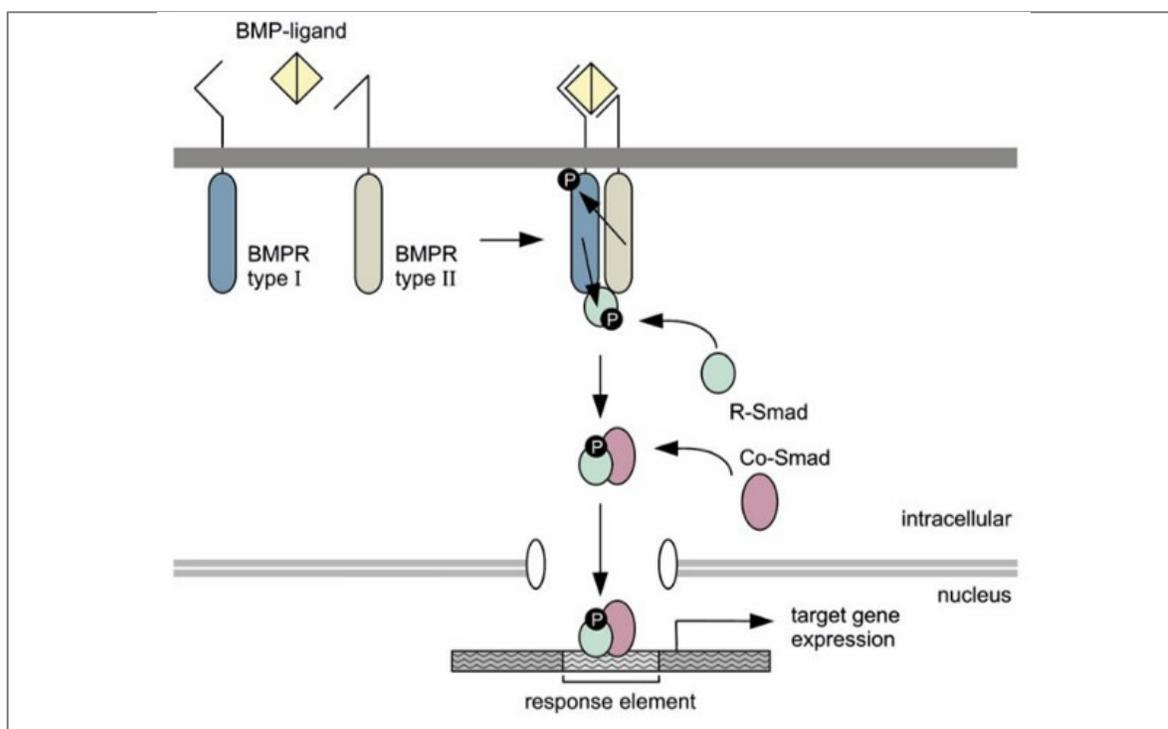


Figure 5 La signalisation des BMP dépendante des SMAD

Représentation schématique de la voie des BMP dépendante des SMAD. Le ligand BMP se lie aux domaines extracellulaires des récepteurs de type un et deux des BMP (BMPRI et BMPRII) qui forment un dimère. BMPRII phosphoryle BMPRI qui phosphoryle ensuite R-SMAD (SMAD1-5-8). Le R-SMAD dimérise avec le Co-SMAD (SMAD4) et le dimère de facteurs de transcription transloque au noyau pour moduler l'expression des gènes cibles de

la voie des BMP. Figure tirée de l'article de Balemans et van Hul (Balemans et Hul 2002), licence #4597721245899 (voir Annexe 1)

Au niveau biologique, la voie des BMP est d'une importance cruciale lors du développement embryonnaire et l'ablation de BMP2 ou BMP4 est létale aux stades de l'embryon (Balemans et Hul 2002; Bragdon et al. 2011). En effet, BMP4 est essentiel à la gastrulation et joue un rôle important lors la spécialisation du tube digestif puisqu'il est exprimé par le mésoderme dans certaines régions afin de spécialiser ces segments du tube digestif (Le Guen et al. 2015; R. N. Wang et al. 2014). La voie des BMP est toute aussi importante à l'âge adulte en contribuant au maintien de l'homéostasie tissulaire. En effet, la voie des BMP est une signalisation tant autocrine que paracrine et ce à la fois par la sécrétion des cellules épithéliales que mésenchymateuses. Donc, la voie des BMP permet une communication bidirectionnelle entre le compartiment épithélial et mésenchymateux dans plusieurs tissus et une entrave à cette communication entraîne une perte de l'équilibre tissulaire pouvant mener à diverses pathologies. Par exemple, une suractivation de la voie des BMP peut mener à la formation osseuse ectopique dans les tissus mous (Bragdon et al. 2011; R. N. Wang et al. 2014) ou favoriser la formation tumorale et l'invasion dans le cancer du sein (D. Guo, Huang, et Gong 2012). À l'opposé, une perte de BMP10 dans la prostate favorise la survie des cellules tumorales (Ye, Kynaston, et Jiang 2009). Dans le système gastrointestinal, le syndrome de la polypose juvénile est causé par une mutation germinale délétère de *SMAD4* ou *Bmpr1a*. Ce syndrome héréditaire présente une abondance de polypes dans l'ensemble du tube gastrointestinal. Ces polypes augmentent principalement les risques de cancer du côlon chez ces patients, mais aussi tout autre type de cancer du système gastrointestinal (Zhou et al. 2001). Du côté de l'estomac, l'absence de la voie des BMP engendre la perte des cellules pariétales, l'hyperprolifération des cellules épithéliales, la formation de SPEM et une expression aberrante des mucines gastriques et intestinales (MI) menant à la formation de carcinomes (Bleuming et al. 2007; Oshima et al. 2009; Shinohara et al. 2010).

Des travaux de notre laboratoire se sont intéressés au rôle de suppresseur de tumeur de la signalisation des BMP dans le contexte de l'initiation de la carcinogenèse gastrique. Dans le but de décomposer l'importance de la signalisation épithéliale et mésenchymateuse, un

modèle murin ayant une délétion épithéliale de *Bmpr1a* dans l'estomac a été généré. L'étude des estomacs de ces souris montre une architecture glandulaire normale sans modulation de la prolifération, une modification du nombre de cellules à mucus et de la sécrétion de mucines, une diminution du nombre de cellules pariétales, une augmentation du nombre de cellules endocrines et la présence de SPEM chez des souris âgées de 90 jours. Cette étude a donc démontré que la perte de la voie des BMP dans l'épithélium entrave la différenciation des cellules épithéliales gastriques, mais n'induit pas de polypose (Maloum et al. 2011). Afin de mieux comprendre le rôle de la signalisation mésenchymateuse des BMP dans la polypose gastrique, un modèle murin ayant une délétion de *Bmpr1a* dans les télocytes FOXL1⁺ a été généré. L'analyse de la muqueuse gastrique a permis de déterminer que les souris âgées de 90 jours présentent des polypes tant dans le corps que dans l'antrum. Au niveau histologique, ces adénomes montrent une architecture glandulaire anormale, un élargissement du compartiment mésenchymateux avec infiltration de cellules immunitaires accompagné de fibrose, une diminution du nombre de cellules pariétales et enfin une présence de SPEM et de MI (S. A. B. Roy et al. 2016).

6.5 Implication de p53 dans la carcinogénèse gastrique

Découverte en 1979 comme une protéine liant l'antigène large T du virus SV40 dans des cellules transformées (Lane et Crawford 1979), la protéine p53 est depuis un suppresseur de tumeur largement étudié pour ses multiples capacités. p53 est composé en N-terminal d'un domaine de transactivation, d'une région riche en proline, d'un domaine de liaison à l'ADN, d'un domaine d'homotétramérisation et d'un domaine de régulation situé en C-terminal (Joerger et Fersht 2016). p53 est un facteur de transcription qui peut lier, via son domaine de liaison à l'ADN, des séquences d'ADN précises appelées *p53 responsive elements* (p53RE). Ce motif d'ADN est composé de deux demi-séquences consensus de 10 paires de bases (pb) : RRRCWWGYYY (R=A,G; W=A,T; Y=C,T). Ces demi-séquences sont séparées par une séquence variable de zéro à 20 pb (El-deiry et al. 1992; Hafner et al. 2019; Joerger et Fersht 2016). Au niveau cellulaire, p53 a une courte demi-vie et une expression basale faible et ce, dans la plupart des types cellulaires. De ce fait, un des gènes cible de p53 est *mouse double minute 2* (MDM2), gène codant pour une E3 ubiquitine ligase qui a pour cible p53 lui-même (Barak et al. 1993). Ainsi, l'expression de p53

s'accompagne peu après par l'expression de MDM2 qui va lier p53 sur son domaine de transactivation et permettre une dégradation rapide par le protéasome, ce qui crée une boucle de rétroaction négative (Alsafadi et al. 2009; Aubrey et al. 2018; Haupt et al. 1997). Différents types de stress (dommages à l'ADN, activation d'oncogènes, stress ribosomal, perte des jonctions cellulaires, hypoxie) peuvent interrompre cette rétroaction et permettre à p53 de s'accumuler dans la cellule afin d'engendrer une réponse en retour (Alsafadi et al. 2009; Horn et Vousden 2007). Les réponses cellulaires générées dépendent du type de stress que la cellule subit et cette variété de réponse est permise par les quelques 500 gènes cibles de p53 sans compter les protéines avec lesquelles il interagit (Aubrey et al. 2018). En effet, p53 régule divers processus en lien avec la réparation des dommages à l'ADN, la sénescence, divers types de mort cellulaire dont l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et le vieillissement (Aubrey et al. 2018; Levine et Oren 2009). Certaines nouvelles fonctions de p53 ont été mises en évidence récemment comme la régulation du caractère souche des cellules souches embryonnaires et la régulation de certaines voies métaboliques liées à la production d'énergie (Kaiser et Attardi 2018).

Plusieurs des fonctions de p53 énumérées précédemment sont des processus impliqués dans la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses. Ces caractéristiques et le fait que *TP53* soit muté dans 50% des cas de cancer font de p53 le suppresseur de tumeur le plus analysé et le plus étudié dans la lutte contre le cancer (Alsafadi et al. 2009). Une mutation de *TP53* peut avoir plusieurs effets sur la cellule : elle peut empêcher son expression, entraver certaines fonctions de p53 ou au contraire lui conférer des nouvelles fonctions oncogéniques (Aubrey et al. 2018; Levine et Oren 2009). L'importance de p53 en tant que suppresseur de tumeurs est bien démontrée chez les patients atteints du syndrome Li-Fraumeni (LFS), caractérisé par une mutation de *TP53*, qui ont 50% de chances de recevoir un diagnostic de cancer avant l'âge de 30 ans et plus de 90% de chances de développer un cancer avant l'âge de 70 ans (Kaiser et Attardi 2018; Malkin et al. 1990). De plus, les personnes atteintes du LFS développent des tumeurs à un jeune âge et plusieurs tumeurs primaires sont souvent observées. Les types de cancers développés sont de nature diverse : cancer du sein, sarcome des tissus mous, tumeur du cerveau, ostéosarcome, leucémie, cancer gastrointestinal, cancer du poumon, cancer des reins, cancer de la peau,

etc. (Malkin et al. 1990). De plus, dans la plupart des cas de cancer sporadiques, une mutation ou perte de *TP53* est considérée comme un évènement tardif favorisant la progression des tumeurs et la formation de métastases (Hamidi et Ivaska 2018; Levine et Oren 2009).

Au niveau du cancer gastrique, l'analyse des mutations de *TP53* dans les tumeurs gastriques a montré que les mutations se produisent à 80% dans le domaine de liaison à l'ADN de p53 et que 75% de ces mutations sont des substitutions faux sens (Bellini et al. 2012). L'accumulation de p53 dans les cellules est souvent signe d'une mutation de *TP53* puisque p53 muté a une plus longue demi-vie et n'est pas aussi facilement dégradé que p53 non-muté, ce qui explique son accumulation (Bellini et al. 2012). De plus, plusieurs études ont montré que la mutation de *TP53* et l'accumulation de p53 est un évènement pouvant survenir aussi tôt que lors des lésions précancéreuses (MI), mais sans être un évènement déclencheur, et dont la fréquence augmente avec une progression de la carcinogenèse. De plus, la perte d'hétérozygotie (LOH) de *TP53* ou l'absence de p53 est un évènement survenant plus tardivement, soit dans les carcinomes et dans les métastases gastriques avec une fréquence marquée au niveau des métastases (Bellini et al. 2012; Fenoglio-Preiser et al. 2003). Le suppresseur de tumeur p53 joue donc un rôle central dans l'initiation et la progression de la carcinogenèse gastrique.

6.6 Hypothèse et objectifs de recherche

Plusieurs études montrent l'importance des interactions entre l'épithélium et le mésenchyme durant la morphogenèse et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire du système gastrointestinal (Hamidi et Ivaska 2018). De plus, les télocytes FOXL1⁺ ont été démontrés comme partie intégrale de la niche des cellules souches épithéliales du système gastrointestinal via leur proximité et la sécrétion de facteurs essentiels au maintien de l'intégralité de l'axe crypte-villosité (cytokines, facteurs de croissance, éléments de la MEC) (Shoshkes-Carmel et al. 2018). La voie des BMP est une des signalisations utilisée tant par le mésenchyme que par l'épithélium de manière bidirectionnelle et est essentielle à l'homéostasie de plusieurs tissus (Bragdon et al. 2011). Des études invalidant tous les types cellulaires gastriques pour la voie des BMP ont montré le rôle de cette signalisation dans le développement du cancer gastrique (Bleuming et al. 2007; Oshima et al. 2009). De plus,

notre laboratoire a démontré que la perte de la voie des BMP au niveau de l'épithélium gastrique ne mène pas à la polypose (Maloum et al. 2011), contrairement à cette même délétion dans les télocytes FOXL1⁺ (souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}) qui mène à la formation d'adénomes chez les souris âgées de 90 jours (S. A. B. Roy et al. 2016). En revanche, ces tumeurs ne progressent jamais en carcinome durant la vie des souris. Une accumulation importante de p53 dans les cellules épithéliales des adénomes des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} a été observée à l'âge de 90 jours. Le suppresseur de tumeur *TP53* est un gène dont la perte d'expression ou le LOH sont des événements clés dans la progression de la carcinogenèse gastrique (Bellini et al. 2012).

Hypothèse de recherche

La combinaison de la délétion conditionnelle de la signalisation des BMP dans les télocytes FOXL1⁺ et la perte de *Trp53* a un effet synergique sur la formation tumorale et permet un avancement dans la cascade de la carcinogenèse gastrique.

Pour répondre à cette hypothèse, j'ai croisé le modèle murin *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} avec une souris *Trp53*^{null} afin de générer un modèle double mutant comportant une délétion conditionnelle de la voie des BMP dans les télocytes FOXL1⁺ et une délétion ubiquitaire de *Trp53*. Les souris *Trp53*^{null} ne développent pas de polypose dans le tube digestif durant la vie de la souris.

Objectif #1

Évaluer par une analyse histopathologique la progression de la carcinogenèse gastrique dans les estomacs des souris double mutantes comparativement aux souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} âgées de 90 jours.

Objectif #2

Évaluer l'initiation de la carcinogenèse gastrique par la présence ou l'absence de lésions préneoplasiques chez des souris âgées de 30 jours.

Objectif #3

Analyser au niveau transcriptionnel les éléments participant à la progression des tumeurs gastriques de souris âgées de 90 jours.

7. MATÉRIEL ET MÉTHODES

7.1 Utilisation de souris transgéniques

Les souris transgéniques sont hébergées à l'unité de souris transgéniques (UST) du pavillon de recherche appliquée sur le cancer (PRAC) de la Faculté de médecine et des sciences de la santé (FMSS) selon les normes du comité d'éthique animal de l'Université de Sherbrooke et du conseil canadien de protection animale (CCPA) sous le protocole 114-15B. Les souris C57BL/6-*Bmpr1a*^{loxP/loxP} proviennent du Pr Mishina (Mishina et al. 1995), les souris C57BL/6-*Foxl1*Cre du Pr Kaestner (Sackett et al. 2007) et les souris C57BL/6-*Trp53*^{tm1Tyj} du Pr Weinberg (Jacks et al. 1994). Les souris C57BL/6-*Bmpr1a*^{loxP/loxP} et C57BL/6-*Foxl1*Cre ont été croisées afin de générer la lignée *Bmpr1a*^{loxP/+};*Foxl1*Cre, appelées *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} dans ce mémoire. Cette lignée a ensuite été croisée avec la lignée C57BL/6-*Trp53*^{tm1Tyj} afin de générer la lignée mutante *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} et ses différents contrôles. Pour ce projet de recherche, les souris de génotype contrôle, *Trp53*^{null}, *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{+/-} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} ont été utilisées à l'âge de 30 et 90 jours.

7.1.1 Génotypage des animaux

Entre les âges de 4 et 10 jours, les souriceaux sont identifiés en coupant un orteil différent pour chacun. Les orteils sont conservés dans un tube de 1,5 ml à -20°C jusqu'au moment de la digestion afin d'obtenir l'ADN génomique utilisé pour génotyper les souris. L'extraction de l'ADN est effectuée dans 75µl de NaOH (25mM) EDTA (0,2mM) à 95°C pendant une heure. Ensuite, la digestion est neutralisée par l'ajout de 75µl de Tris HCl (40mM) à pH 5,5. Une centrifugation à 4000 RPM pendant trois minutes permet de précipiter les débris présents dans la solution.

La réaction de PCR pour génotyper les séquences LoxP du gène *Bmpr1a* des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} utilise 4µl de cet ADN dilué 1:6, 1µl de tampon Platinum (10X) (Invitrogen, CA, É-U), 0,3µl de MgCl₂ (50mM) (Invitrogen, CA, É-U), 0,2µl de dNTP (10mM), 0,5µl des amorces spécifiques (10mM) (tableau 1), 0,1µl de la Taq Platinum (5U/µl) (Invitrogen, CA, É-U) dans 3,4µl d'eau stérile sans DNase/RNase (Wisent, Montréal, Qc, Canada). La réaction de PCR pour génotyper *Foxl1*Cre utilise 1µl d'ADN, 2,5µl de tampon NEB (10X)

(New England Biolabs), 0,5µl de dNTP (10mM), 1µl des amorces spécifiques (10mM) (tableau 1), 0,125µl de la Taq NEB (New England Biolabs) dans 18µl d'eau stérile sans DNase/RNase (Wisent, Montréal, Qc, Canada). La réaction de PCR pour génotyper *Trp53^{null}* utilise 0,5µl d'ADN, 2,5µl de tampon NEB (10X) (New England Biolabs), 0,5µl de dNTP (10mM), 0,5µl de l'amorce oIMR7777 (10mM) (tableau 1), 2µl des amorces oIMR7778 et oIMR8306 (10mM) (tableau 1), 0,125µl de la Taq NEB (New England Biolabs) dans 16µl d'eau stérile sans DNase/RNase (Wisent, Montréal, Qc, Canada). Les réactions PCR sont effectuées à des températures d'appariement spécifiques aux amorces utilisées (tableau 1) afin de former les produits PCR désirés et pouvoir génotyper les souris. Les produits PCR ont été migrés sur gel d'agarose 1,5% (p/v) (Bioshop, Burlington, On, Canada) pendant 30 minutes à 110V.

Tableau 1 : Amorces pour les PCR de génotypage

Génotypage	Amorce	Séquence	T°app.	Nb cycles	Taille produit
<i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1}	Fx2	5'-GCAGCTGCTG CTGCAGCCTCC-3'	65	35	150pb (allèle sauvage) 230pb (allèle loxP)
	Fx4	5'-TGGCTACAAT TTGTCTCATGC-3'			
<i>Foxl1</i> Cre	Cre-3'	5'- CGTTCACCGG CATCAACGTTT-3'	59	28	230pb
	Cre-5'	5'- CGTTCACCGG CATCAACGTTT-3'			
<i>Trp53^{null}</i>	oIMR7777	5'-ACAGCGTGGT GGTACCTTAT-3'	62	37	540pb (allèle sauvage) 650pb (allèle mutée)
	oIMR7778	5'-TATACTCAGA GCCGGCCT-3'			
	oIMR8306	5'-CTATCAGGAC ATAGCGTTGG-3'			

7.1.2 Euthanasie des animaux

Les souris sont d'abord anesthésiées par injection intra-péritonéale de 1µl par gramme de poids corporel d'une solution de kétamine (1000mg/ml) et xylazine (13mg/ml) (Wyeth, Guelph, ON). Les souris sont ensuite euthanasiées par dislocation cervicale selon le protocole autorisé par le comité d'éthique animale de la FMSS et le CCPA. Les organes sont ensuite rapidement prélevés et manipulés sur une plaque de verre froide pour ralentir la dégradation des tissus. Selon l'application désirée, l'estomac peut être préparé pour la mise en blocs de paraffine (section 8.1.4) ou l'extraction d'ARN (section 8.1.9).

7.1.3 Analyse macroscopique des estomacs

Pour évaluer au niveau macroscopique la muqueuse gastrique, les estomacs sont ouverts le long de la grande courbure du duodénum au fondus et déposés à plat avec le contenu de l'estomac vers le haut. Les observations macroscopiques liés au phénotype ont été notées pour chaque souris dont l'estomac a été ouvert et des photos d'estomacs de chaque génotype ont été prises par Robert Dumont, photographe de la FMSS.

7.1.4 Fixation des estomacs

Les estomacs qui seront utilisés pour la coupe de tissu en bloc de paraffine sont d'abord fixé entiers avec une solution de PFA (4% m/v) (Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U) pendant 16h à 20h à 4°C. Les tissus sont ensuite lavés deux fois avec de l'éthanol 70% v/v et conservé 24h dans cette solution à 4°C. Les estomacs sont ensuite coupés en anneaux sur l'axe proximal-distal de manière à obtenir deux tranches de l'antra, trois sections du corps et deux sections du fondus. Ces sections sont déposées sur des mousses à histo-cassettes imbibées d'éthanol 70% v/v et mises dans des histo-cassettes. Le tout est conservé dans l'éthanol 70% v/v jusqu'à la circulation, l'inclusion et la coupe qui est effectuée par la plateforme de phénotypage animal de la FMSS.

7.1.5 Coloration de coupes d'estomacs

7.1.5.1 Coloration Hématoxyline et Éosine (H&E)

Les coupes de tissu produites à la section 7.1.5 sont d'abord chauffées à 60°C pendant 15 minutes avant d'être déparaffinées et réhydratées selon les étapes décrites dans le tableau 2. Ensuite, les lames sont plongées dans une solution d'hématoxyline de Gill (Poly Scientific;

Cat #s210-8oz) pendant trois minutes et rincées à l'eau courante pendant cinq minutes. Les lames sont ensuite mises dans une solution d'alcool acide (éthanol 95% v/v et HCl concentré 1% v/v) pendant 30 secondes et rincées à l'eau courante une minute. Une solution d'eau ammoniacale (1g de bicarbonate de sodium et 2ml d'hydroxyde d'ammonium 30% dans 1L d'eau distillée à pH 8,0) est ensuite utilisée pendant une minute. Les lames sont ensuite rincées pendant cinq minutes à l'eau courante et trempées dans la solution d'éosine (Fluka St. Louis, MA, É-U) pendant une minute et 30 secondes. Les lames sont rincées sous l'eau courante pendant cinq minutes et sont déshydratées comme mentionné dans le tableau 2. Le montage des lames s'effectue avec le milieu de montage Vectamount (Vector laboratories, Burlingame, CA, É-U). La coloration H&E des lames d'estomac est effectuée par la plateforme de phénotypage animal de la FMSS. L'observation des lames se fait avec le scanner multi-lames à lumière visible Nanozoomer (Hamamatsu, Japon).

Tableau 2 : Déparaffination et réhydratation des coupes de tissu

Solution	Temps d'incubation
Xylène 100% v/v	2 X 5 min
Éthanol 100% v/v	2 X 2 min
Éthanol 95% v/v	1 X 1 min
Éthanol 80% v/v	1 X 1 min
Éthanol 75% v/v	1 X 1 min
Eau	1 X 1 min

Tableau 3 : Déshydratation des coupes de tissu

Solution	Temps d'incubation
Éthanol 70% v/v	1 X 2 min
Éthanol 95% v/v	1 X 2 min
Éthanol 100% v/v	2 X 2 min
Xylène 100% v/v	2 X 5 min

7.1.5.2 Coloration à l'alcian bleu

Les lames de tissu d'estomac obtenues à la section 7.1.5 sont d'abord chauffées à 60°C pendant 15 minutes avant d'être déparaffinées et réhydratées comme mentionné dans le tableau 2. Ensuite, les tissus à colorer sont encerclés à l'aide d'un crayon hydrophobe *liquid blocker super pap pen* (Diado Sangyo Co, Tokyo, Japon) afin de limiter la quantité de colorant à utiliser. Les lames sont d'abord trempées dans une solution d'acide acétique aqueux 3% v/v à pH 2,5 (Poly Scientific, Bay Shore, NY, É-U) pendant trois minutes. Les lames sont ensuite colorées avec une solution d'alcian bleu 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, É-U) dilué dans l'acide acétique aqueux 3% utilisée précédemment pendant 30 minutes dans une chambre humide. Les lames sont lavées sous l'eau courante pendant 10 minutes avant d'être contre-colorées au Nuclear Fast Red 0,1% (EMS, PA, É-U) pendant 20 minutes. Elles sont lavées sous l'eau courante pendant une minute et ensuite déshydratées comme indiqué dans le tableau 3. Les lames sont montées avec le milieu de montage Vectamount (Vector laboratories, Burlingame, CA, É-U) avant d'être observées avec le scanner multi-lames à lumière visible Nanozoomer (Hamamatsu, Japon).

7.1.6 Analyses histopathologiques des estomacs

Des lames d'estomacs de souris âgées de 90 jours avec coloration H&E (section 7.1.5.1) ont ensuite été analysées par une pathologiste animale, la professeure Marilene Paquet DMV, M.Sc., D'ACVP du Département de pathologie et microbiologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. L'analyse histopathologique a révélé les différents phénotypes présents dans les estomacs des souris et a permis de déterminer le stade de progression des tumeurs gastriques. Les lames d'estomacs des souris âgées de 30 jours avec coloration H&E ont été analysées par la professeure Perrine Garde-Granger M.D., pathologiste du Département de pathologie de la FMSS, Université de Sherbrooke. Cela nous a permis de déterminer les phénotypes et lésions précoces observées dans ces estomacs.

7.1.7 Immunofluorescence sur coupe de tissu en paraffine

Les coupes de tissu produites à la section 7.1.5 sont d'abord chauffées à 60°C pendant 15 minutes avant d'être déparaffinées et réhydratées selon les étapes décrites dans le tableau 2. Les lames sont ensuite chauffées dans une solution d'acide citrique monohydrate 10mM à

pH 6,0 (Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U) pendant 14 minutes au micro-ondes. Après les avoir fait refroidir pour éviter un choc thermique, les lames sont rincées à l'eau courante pendant 10 minutes et lavées deux fois pendant cinq minutes dans une solution de PBS 1X. Afin de limiter la quantité de solution à utiliser, les sections de tissu sont encerclées avec un crayon hydrophobe *liquid blocker super pap pen* (Diado Sangyo Co, Tokyo, Japon). Les lames sont ensuite bloquées dans une chambre humide pendant 40 minutes avec la solution de blocage (gélatine de peau de poisson d'eau froide 1% m/v [Sigma, MO, É-U], BSA 2% m/v [Roche, IN, É-U], Tween-20 0,002% v/v [Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U], dilué dans du PBS 1X). L'incubation de l'anticorps primaire s'effectue dans la chambre humide avec une solution composée de la solution de blocage et de l'anticorps primaire à la dilution désirée (tableau 4) pendant toute une nuit à 4°C, sauf pour l'anticorps contre CD44s qui est incubé une heure à température pièce. Les lames sont ensuite lavées trois fois dans du PBS 1X pendant cinq minutes à température pièce avec agitation. L'incubation avec l'anticorps secondaire se fait avec une solution composée de la solution de blocage et de l'anticorps secondaire à la dilution voulue (tableau 4) pendant deux heures à température pièce, dans une chambre humide et dans le noir. Ensuite, les lames sont lavées trois fois dans du PBS 1X pendant cinq minutes à température pièce avec agitation. Les lames sont par la suite contre-colorées avec la contre-coloration appropriée, soit dans le bleu d'évan (0,1% m/v dans du PBS 1X) (Sigma, MO, É-U) pendant 30 secondes ou avec le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 0,2µg/mL) (Cell Signaling Technology, Denver, É-U) pendant 1 minute. Les lames sont ensuite lavées trois fois dans du PBS 1X pendant cinq minutes à température pièce avec agitation et rincées une fois avec de l'eau pour enlever les sels. Les lames sont séchées dans le noir pendant 15 minutes et sont montées avec le milieu de montage Immumount (ThermoScientific, MA, É-U). Les lames sont rangées à 4°C jusqu'au moment de l'analyse avec le microscope à fluorescence Leica DM LB2 (Leica MicroSystem, Concorde, On, Canada). La superposition des différents filtres se fait avec le logiciel Image J.

Tableau 4 : Anticorps utilisés pour les immunofluorescences sur tissu

	Anticorps	Espèce	Dilution	Fournisseur, # catalogue
Anticorps primaires	H ⁺ /K ⁺ ATPase	Souris	1:4	MBL, D032-3H
	GIF	Lapin	1:75	Abnova, H00002694D01P
	Lectine GS-II	<i>Griffonia simplicifolia</i>	1:500	Invitrogen, L21415
	Lectine UEA-1	<i>Ulex europaeus</i>	1:600	Sigma, L9006
	Mucine 5ac	Souris	1:1000	Abcam, 24071-100
	CD44s	Rat	1:150	Abcam, ab25340
	CD44v6	Rat	1:3000	BioRad, MCA1967
	Ki67	Lapin	1:2	ThermoScientific, RM9106R7
	α -SMA	Souris	1:5000	Sigma, A2547
	Vimentine	Lapin	1:100	Cell Signaling, 5741
Anticorps secondaires	IgG Rat (Alexa Fluor 568)	Chèvre	1:300	Invitrogen, A11077
	IgG Mouse (Alexa Fluor 488)	Chèvre	1:300	Cell Signaling, 4408
	IgG Mouse (Alexa Fluor 594)	Chèvre	1:300	Cell Signaling, 8890
	IgG Lapin (Alexa Fluor 594)	Chèvre	1:300	Cell Signaling, 8889
	IgG Lapin (Alexa Fluor 488)	Chèvre	1:300	Cell Signaling, 4412

7.1.8 Immunohistochimie sur coupe de tissu en paraffine

Les immunohistochimies (IHC) ont été effectuées à l'aide du kit Dako REAL EnVision Detection System, Peroxidase/DAB+ Rabbit (Dako Agilent, CA, É-U). Les coupes de tissu produites à la section 7.1.5 sont d'abord chauffées à 60°C pendant 15 minutes avant d'être déparaffinées et réhydratées selon les étapes décrites dans le tableau 2. Les lames sont ensuite chauffées dans une solution d'acide citrique monohydrate 10mM à pH 6,0 (Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U) pendant 14 minutes au micro-ondes. Après les avoir fait refroidir pour éviter un choc thermique, les lames sont rincées à l'eau courante pendant 10 minutes et lavées deux fois pendant cinq minutes dans une solution de PBS 1X. Afin de limiter la quantité de solution à utiliser, les sections de tissu sont encerclées avec un crayon hydrophobe *liquid blocker super pap pen* (Diado Sangyo Co, Tokyo, Japon).

Les lames sont ensuite incubées cinq minutes à la température de la pièce dans la solution de blocage des peroxydases endogènes fourni dans le kit Dako (Agilent, CA, É-U). Les lames sont ensuite bloquées dans une chambre humide pendant 40 minutes avec la solution de blocage (gélatine de peau de poisson d'eau froide 1% m/v [Sigma, MO, É-U], BSA 2% m/v [Roche, IN, É-U], Tween-20 0,002% v/v [Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U], dilué dans du PBS 1X). L'incubation de l'anticorps primaire contre PCNA (Abcam, ab18197) s'effectue dans la chambre humide avec une solution composée de la solution de blocage et de l'anticorps primaire dilué 1:7000 pendant toute une nuit à 4°C. Les lames sont ensuite lavées trois fois dans du PBS 1X pendant cinq minutes à température pièce avec agitation. L'incubation avec l'anticorps secondaire se fait avec l'anticorps secondaire HRP fourni par le kit Dako (Agilent, CA, É-U) pendant une heure à température pièce, dans une chambre humide. Ensuite, les lames sont lavées trois fois dans du PBS 1X pendant cinq minutes à température pièce avec agitation.

Pour la révélation, les lames sont incubées avec la solution de révélation composée de 1ml de substrat et 20µl du chromogène DAB fournis dans le kit Dako (Agilent, CA, É-U) jusqu'à l'obtention de la coloration désirée. Pour arrêter la réaction de coloration, les lames sont trempées dans l'eau déionisée et ensuite lavées deux fois pendant 10 minutes à température pièce et avec agitation. Pour la contre-coloration, les lames ont subi les étapes

décrites dans le tableau 5. Les lames sont ensuite déshydratées comme indiqué dans le tableau 3 et montées avec le milieu de montage Vectamount (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) avant d'être observées avec le scanner multi-lames à lumière visible Nanozoomer (Hamamatsu, Japon).

Tableau 5 : Contre-coloration des immunohistochimies

Solution	Incubation
Hématoxyline de Harris	2 min
Eau courante	5 min
Alcool acide (éthanol 95% v/v, HCl concentré 5% v/v)	30 sec
Eau courante	5 min
Eau ammoniacale (2ml d'hydroxyde d'ammonium dans 1L d'eau distillée à pH 10,0)	1 min
Eau courante	5 min

7.1.9 Extraction d'ARN à partir de tissu gastrique

Si les prélèvements d'estomacs de souris détaillés à la section 7.1.2 sont utilisés pour en extraire l'ARN total, les tissus désirés seront coupés en très petits morceaux sur la plaque de verre froide. Le kit ToTALLY RNA (Ambion, #1910, Fair Lawn, NJ, É-U) est utilisé pour la lyse des échantillons et l'extraction de l'ARN. Les tissus sont ensuite transférés dans un tube de 2,0ml contenant la solution dénaturante allant avec le kit mentionné précédemment (Ambion, Fair Lawn, NJ, É-U) et une bille d'acier inoxydable de 5mm (Qiagen, MD, USA). Le TissueLyser (Qiagen, MD, É-U) est utilisé pendant deux fois deux minutes à 50 oscillations par secondes avec une pause de 10 minutes sur glace entre les deux étapes pour lyser les tissus. Les lysats sont ensuite centrifugés à 13000RPM pendant 15 minutes à 4°C afin de précipiter les débris. Le surnageant est transféré dans un tube de 1,5ml et est congelé dans l'azote liquide avant d'être conservé à -80°C jusqu'à l'extraction. Au moment de l'extraction d'ARN, les lysats sont dégelés sur glace et centrifugés à 13000RPM pendant 15 minutes à 4°C pour précipiter les débris restants. Un volume prédéterminé (appelé volume de départ) a été transféré dans un tube de 1,5ml. Un volume de départ de phénol:chloroforme:IAA (Ambion, Fair Lawn, NJ, É-U) a été ajouté au lysat d'ARN. Les tubes sont vortexés pendant une minute, laissés à reposer sur glace pendant 5 minutes et centrifugés à 12000g pendant cinq minutes à 4°C. La phase supérieure aqueuse est transférée dans un nouveau tube de 1,5ml et une quantité d'acétate de sodium (3M, pH 4,5) (Ambion, Fair Lawn, NJ, É-U) représentant 10% du volume récolté est ajouté. Les tubes sont mélangés par inversion pendant 10 secondes et un «volume de départ» de phénol acide:chloroforme (Ambion, Fair Lawn, NJ, É-U) est ajouté. Les tubes sont vortexés pendant une minute, laissés au repos sur glace pendant cinq minutes et centrifugés à 12000g pendant cinq minutes à 4°C. La phase supérieure aqueuse est transférée dans un nouveau tube de 1,5ml et une quantité équivalente d'isopropanol (Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U) froid est ajoutée. Les tubes sont mélangés par une dizaine d'inversions et sont incubés à -20°C entre 30 et 60 minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés à 12000g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est enlevé en faisant attention à ne pas déloger l'ARN précipité et les culots sont séchés à 37°C pendant un maximum de huit minutes. 100µl d'eau DEPC/EDTA 0,1mM (Ambion, Fair Lawn, NJ, É-U) est ajouté aux culots et incubé pendant 10 minutes à température pièce. Les tubes sont vortexés à vitesse moyenne,

chauffés à 70°C pendant trois minutes et vortexés à vitesse moyenne pour dissoudre le culot. Les solutions d'ARN sont dosées à l'aide d'un NanoDrop. Si la concentration d'ARN est de plus de 200ng/μl, la précipitation au LiCl est possible. Pour la purification au LiCl (Ambion, Fair Lawn, NJ, É-U), 50% du volume est ajouté en solution de LiCl, les tubes sont agités par inversion une dizaine de fois et incubés à -20°C entre 30 et 60 minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés à 12000g pendant 15 minutes à 4°C et le surnageant est jeté en faisant attention à ne pas déloger le culot d'ARN. Le culot est lavé avec 300μl d'éthanol 70%, vortexé à faible vitesse et centrifugé à 3000g pendant cinq minutes à 4°C. L'éthanol est éliminé du tube et le culot est séché à 37°C pendant 10 minutes. De l'eau DEPC/EDTA 0,1mM (Ambion, Fair Lawn, NJ, É-U) est ajouté au culot et laissé à incuber 10 minutes à température pièce. Les tubes sont vortexés à vitesse moyenne et ensuite chauffés à 70°C pendant 3 minutes avant d'être vortexés à nouveau à vitesse moyenne jusqu'à dissolution du culot. Les ARN sont alors dosés à l'aide d'un NanoDrop et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

7.1.10 Digestion à la DNase et RT des ARN de tissu

Les ARN obtenus à la section 7.1.9 subissent une digestion à la DNase I pour enlever toute trace d'ADN qui n'aurait pas été éliminée. Pour ce faire, un volume équivalent à 2μg d'ARN est transféré dans un nouveau tube de 1,5ml auquel s'ajoute 2μl de tampon 10X (Roche, Indianapolis, IN, É-U), assez d'eau pour obtenir un volume de 19μl et finalement 1μl de DNase1 (Roche, Indianapolis, IN, É-U) préalablement diluée 1:10 pour obtenir une concentration d'enzyme de 1U/tube. Les tubes sont incubés pendant 30 minutes à 37°C. Pour inhiber la réaction, une solution d'EDTA est ajoutée afin d'obtenir une concentration finale de 5mM et les tubes sont chauffés à 75°C pendant 10 minutes. Les tubes sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

Pour transformer les ARN en ADN complémentaire (ADNc), une réaction de rétrotranscription (RT) doit être effectuée. Pour cette réaction, 1μg d'ARN traité à la DNase est utilisé et le volume est complété avec de l'eau pour atteindre 10μl. À cela s'ajoute 4μl de tampon AMV 5X (Roche, Indianapolis, IN, É-U), 2,4 μl d'un mélange d'amorces poly-dT 25mM (IDT Technology, NJ, É-U), 0,8μl de dNTP 25mM, 0,6μl d'inhibiteur de RNase (Roche, Indianapolis, IN, É-U), 0,5μl d'enzyme AMV-RT (Roche,

Indianapolis, IN, É-U) et 1,7µl d'eau DEPC est ajouté à chaque réaction. Les tubes sont alors incubés à 42°C pendant une heure. Pour inhiber la réaction, les tubes sont incubés à 95°C pendant cinq minutes. Les ADNc sont ensuite dilués 1:10 dans l'eau stérile et sont conservés à -20°C.

7.1.11 RT-PCR

Afin d'observer l'expression de nouveaux marqueurs normalement absents de l'estomac, les ADNc produits à la section 7.1.10 sont amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques. Pour l'analyse de l'expression de la sucrase-isomaltase (SI), le même protocole que pour le génotypage de la *Foxl1*Cre a été utilisé (section 7.1.1), mais avec des amorces spécifiques à la SI (tableau 6), avec 4µl d'ADNc dilué 1:10. Pour le gène de référence *TATA box binding protein* (TBP), le mélange réactionnel est constitué de 3µl d'ADNc dilué 1:10, 15,14µl d'eau, 2µl de tampon 10X (New England Biolabs, MA, É-U), 0,16µl de dNTP 25mM, 1µl de chaque amorce spécifique à TBP (tableau 6) et 0,2µl de taq (New England Biolabs, MA, É-U). Les produits PCR sont ensuite migrés sur gel d'agarose 1,25% à 110V pendant 25 minutes.

Tableau 6 : Amorces pour les RT-PCR

Gène cible	Amorce	Séquence	T°app.	Nb cycles
SI	SI5055	5'-CAAACCATCG AGCCTTAGGA-3'	59	30
	SI4849	5'-TGCTGCCCTA TTTCTACACACA-3'		
<i>TBP</i>	hrmTBP 1009	5'-GGGGAGCTGT GATGTGAAGT-3'	59	30
	hmrTBP 1136	5'-GGAGAACAAT TCTGGGTTTGA-3'		

7.1.12 Séquençage d'ARN du tissu gastrique

Pour le séquençage du transcriptome, la muqueuse totale de l'antré a été utilisée pour les souris contrôles et *Trp53*^{null} alors que seulement les polypes de l'antré des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}:*Trp53*^{null} ont été utilisées. L'ARN de ces échantillons a été extrait comme décrit dans la section 7.1.9. La qualité et l'intégrité des ARN a été déterminée par la plateforme de RNomique de la FMSS et seulement les échantillons ayant un *RNA Integrity Number* (RIN) de plus de 9 ont été utilisés. Trois échantillons par génotype ont été sélectionnés selon leur concentration et leur RIN et ces derniers ont été envoyés au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill (Montréal, Qc, Canada) pour la suite du protocole. C'est là qu'ont été préparées les bibliothèques d'ADNc selon la technologie RNASeq Stranded de NEB et que le séquençage de type Illumina HiSeq4000 PE100 a été effectué. Le *Canadian Center for Computational Genomics* de l'Université McGill a ensuite aligné les séquences au génome murin GRCm38 d'Ensembl en plus d'effectuer les calculs de normalisation, de statistiques et de variations. Les données ont ensuite été analysées avec les logiciels *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) et *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA). Concernant l'analyse avec GSEA, des *heatmaps* montrant l'expression de certains transcrits en lien avec la catégorie analysée ont été générés à partir des gènes montrant un *core enrichment*, c'est-à-dire à partir d'uniquement les transcrits qui participent le plus au score d'enrichissement. Cela permet d'éliminer les transcrits qui sont peu ou pas modulés entre les deux génotypes comparés.

7.1.13 Analyses statistiques

Pour quantifier le nombre de cellules marquées dans les IF ou IHC, des décomptes ont été effectués à l'aveugle sur un minimum de trois souris par génotype et un minimum de 10 images par souris afin d'obtenir une population représentative. En considérant la taille des groupes, l'analyse statistique ANOVA à deux voies avec le test à comparaison multiple de Tukey a été utilisé pour déterminer si la différence entre deux groupes est significative. Les données de décompte montrent les moyennes du nombre de cellules par glande et l'écart-type (ET). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism.

8. RÉSULTATS

8.1 Les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent des tumeurs de stade plus avancé que les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} à 90 jours

Les estomacs des souris âgées de 90 jours ont été récoltés, ouverts le long de la grande courbure et mis à plat, muqueuse vers le haut, afin d'observer la muqueuse gastrique au niveau macroscopique. Les estomacs des souris contrôles et *Trp53*^{null} présentent une muqueuse normale tandis que les estomacs des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{+/-} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent un épaissement important de la muqueuse ainsi que des polypes dans la région du corps et de l'antrum de l'estomac. Cependant, les polypes des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} sont de taille plus importante et sont présents en plus grand nombre que ceux des estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} (figure 6). Au niveau de la pénétrance, tous les individus *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} montrent un épaissement important de la muqueuse alors que la grande majorité des individus *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et tous les individus *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent des polypes tant au niveau de l'antrum que du corps. Les polypes tendent à être plus nombreux et de plus grande taille dans la région du corps peu importe le génotype.

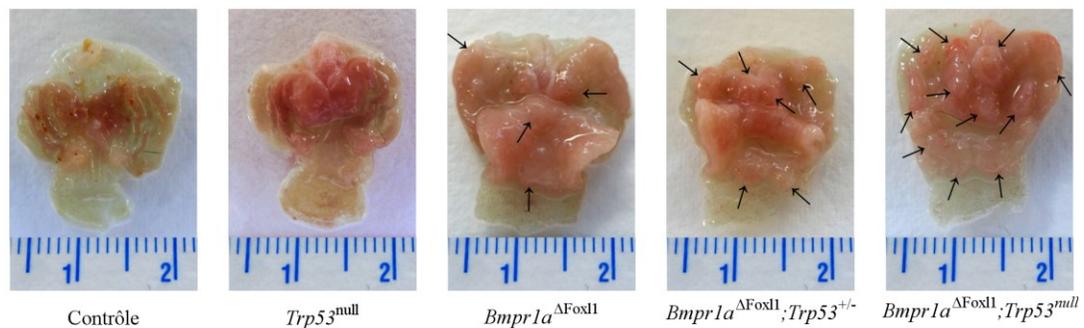


Figure 6. Les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent une augmentation de la charge tumorale gastrique à l'âge de 90 jours

Photos macroscopiques d'estomacs de souris âgées de 90 jours ouverts le long de la grande courbure et positionnés à plat, muqueuse vers le haut. Les flèches pointent des polypes gastriques. La règle est graduée en cm.

8.1.1 Analyse histopathologique des tissus d'estomac des souris âgées de 90 jours

Des colorations H&E de coupes de tissu des estomacs des souris contrôles, *Trp53*^{null}, *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} âgées de 90 jours ont été analysées par une pathologiste animale de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, Marilene Paquet, DVM M.Sc. D'ACVP. Cette analyse histopathologique a révélé que les estomacs des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, en comparaison avec les souris contrôles, présentent un épaissement de la muqueuse affectant principalement la région glandulaire du corps et de l'antré. Au niveau du corps, une diminution du nombre de cellules pariétales a été remarquée (cette observation sera validée à l'aide de marqueurs spécifiques plus loin dans ce mémoire). De plus, l'épithélium de surface est hyperplasique, celui des glandes est immature et les glandes présentent des microadénomes et des adénomes uniglandulaires. Il est aussi possible d'observer un accroissement du compartiment mésenchymateux au sein de la muqueuse tant au niveau du corps que de l'antré (figure 7). Concernant les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}, la pathologiste a noté un nombre plus élevé de zones dysplasiques, la présence de carcinomes de type tubulaire intramuqueux envahissant la *lamina propria* accompagnés d'une dysplasie marquée et d'une desmoplasie variable. Comme observé chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, un accroissement du compartiment mésenchymateux a été observé comparativement aux souris contrôles (figure 7). Les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent donc un stade tumoral plus avancé que les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} au même âge, soit à 90 jours.

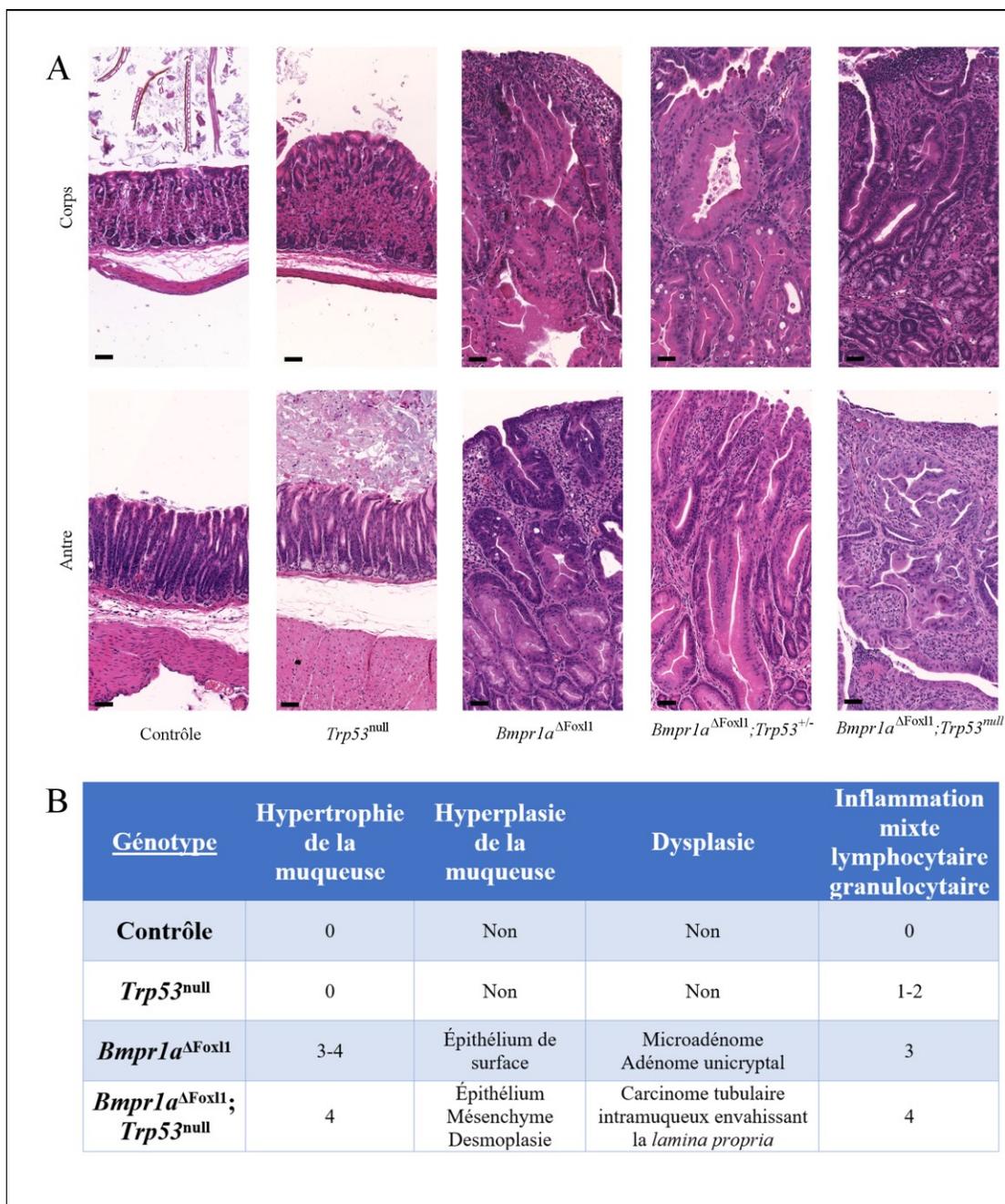


Figure 7. Les souris *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null} présentent une progression de la carcinogenèse gastrique à l'âge de 90 jours

A. Coloration H&E de coupes de tissu du corps et de l'antré des estomacs de souris âgées de 90 jours. Barre d'échelle = 50µm. B. Résultats de l'analyse histopathologique des coupes de tissu en A. 0 = Non observé, 1 = Grade minimal, 2 = Grade léger, 3 = Grade modéré, 4 = Grade sévère.

8.1.2 Analyse du statut prolifératif des tissus d'estomac des souris âgées de 90 jours

Une IHC dirigée contre PCNA a permis de marquer les cellules en division cellulaire et d'observer la taille de la zone de prolifération épithéliale dans la muqueuse des estomacs de souris âgées de 90 jours (figure 8). Ce marquage a permis d'observer que les souris contrôles et *Trp53*^{null} montrent une zone de prolifération épithéliale normale. Il est possible de remarquer que cette zone est plus importante chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFox11} et que l'élargissement est accentué chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null}. Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que tant chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFox11} que *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null}, les cellules prolifératives ne se limitent pas qu'à la région de l'isthme et qu'il y a donc une délocalisation de la prolifération chez les souris expérimentales. Comme observé dans les colorations H&E de ces mêmes tissus (figure 7A), le compartiment mésenchymateux est plus important chez les souris délétées pour *Bmpr1a* dans les cellules Fox11⁺. Il est d'ailleurs possible d'observer, par le marquage de PCNA, un plus grand nombre de cellules mésenchymateuses prolifératives chez ces souris comparativement aux souris contrôles (figure 8).

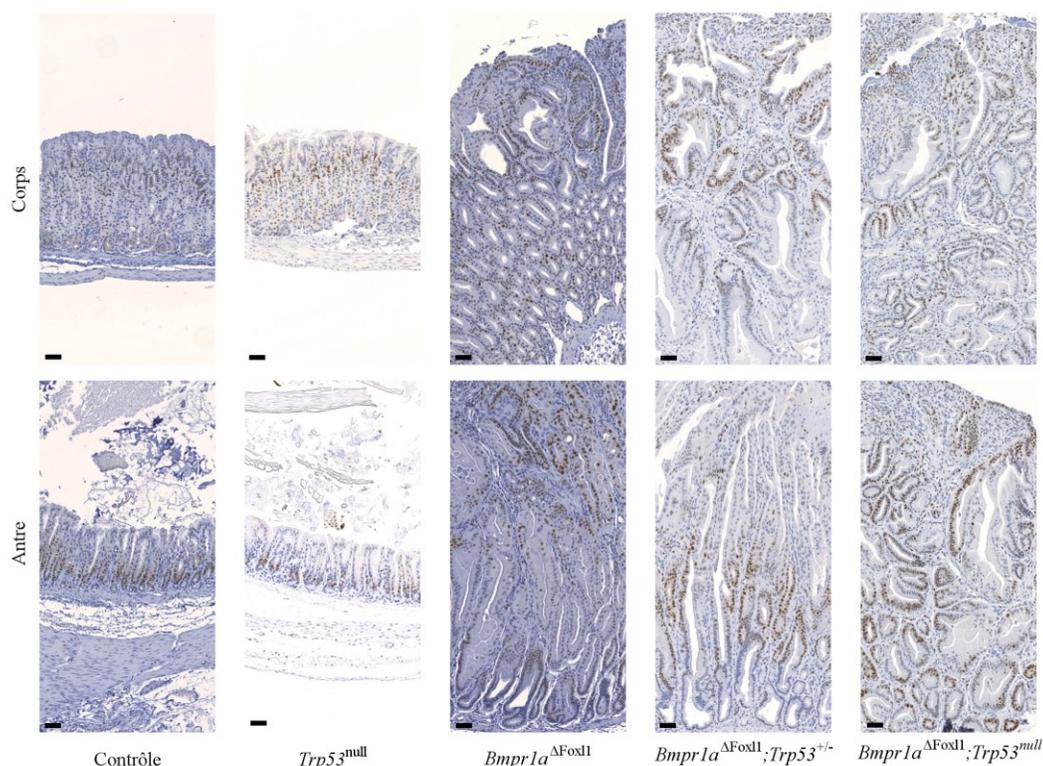


Figure 8. Marquage des cellules prolifératives dans les estomacs des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} à l'âge de 90 jours

IHC dirigé contre PCNA sur des coupes de tissu d'estomacs de 90 jours. Révélation du marquage au DAB (en brun). Contre coloration à l'Hématoxyline. Barre d'échelle = 50μm.

Un décompte du nombre de cellules positives pour PCNA a été effectué au niveau de l'épithélium et du mésenchyme séparément dans le corps et l'antre de ces souris âgées de 90 jours. Ce décompte a permis d'établir qu'en comparant le corps des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} aux souris contrôles, il y a une augmentation de 210% (p<0,0001) du nombre de cellules épithéliales et une augmentation de 184% (p<0,0001) du nombre de cellules mésenchymateuses. La comparaison des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} par rapport aux souris contrôles a montré une augmentation de 175% (p<0,0001) du nombre de cellules épithéliales et une augmentation de 228% (p<0,0001) du nombre de cellules mésenchymateuses dans le corps également. Au niveau de l'antre, les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} présentent une augmentation de 285% (p<0,0001) des cellules prolifératives dans l'épithélium et une augmentation de 280% (p<0,0001) dans le mésenchyme comparativement aux souris contrôles. Pour les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}, une augmentation de 254% (p<0,0001) du nombre de cellules épithéliales et une augmentation de 311% (p<0,0001) du nombre de cellules mésenchymateuses sont observées dans l'antre comparativement aux souris contrôles. Ainsi, il y a présence d'hyperprolifération importante autant au niveau de l'épithélium que du mésenchyme dans le corps et l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} lorsque comparées aux souris contrôles (figure 9). Cependant, le nombre de cellules marquées pour PCNA n'est pas significativement modulé lorsqu'on compare les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} aux souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, tant dans l'épithélium que dans le mésenchyme.

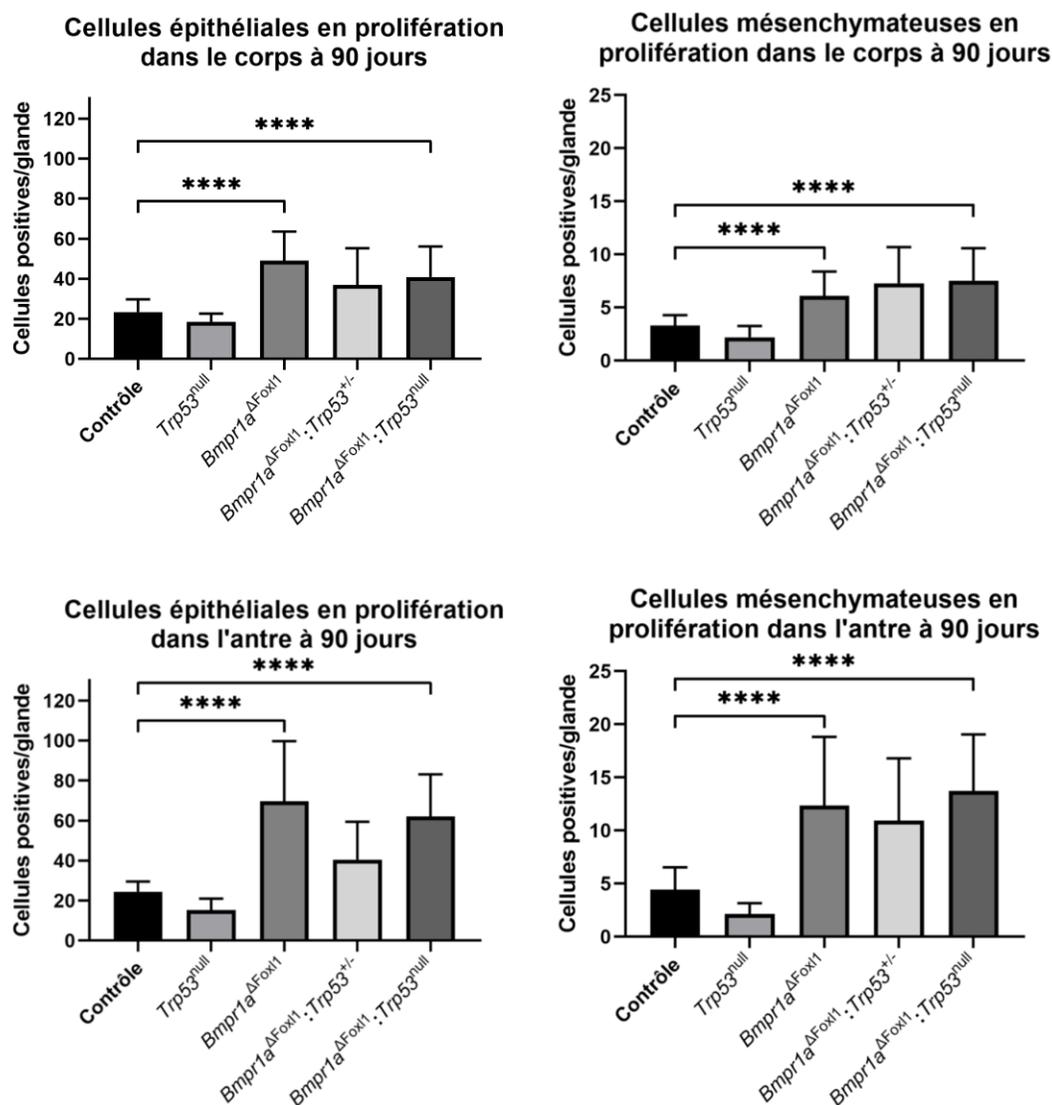


Figure 9. Nombre de cellules prolifératives dans les estomacs des souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1};Trp53^{null}$ à l'âge de 90 jours

Quantification du nombre de cellules positives pour PCNA par glande gastrique de l'IHC en A. Analyse statistique ANOVA à deux voies, test à comparaison multiple de Tukey, **** $p < 0,0001$.

8.2 Analyse de l'initiation de la polypose chez les souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1};Trp53^{null}$ âgées de 30 jours

Afin de comprendre pourquoi les souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1};Trp53^{null}$ présentent des carcinomes invasifs à 90 jours alors que les souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}$ du même âge montrent des

microadénomes, les estomacs de ces souris ont été évalués à un âge précoce, soit à l'âge de 30 jours. Comme effectué précédemment, les estomacs des souris de génotype contrôle, *Trp53*^{null}, *Bmpr1a*^{ΔFox11}, *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{+/-} et *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null} ont été prélevés, ouverts le long de la grande courbure et placés à plat afin d'observer la muqueuse en sa totalité. Ces observations macroscopiques ont confirmé que les estomacs des souris contrôles et *Trp53*^{null} sont normaux. Pour les souris *Bmpr1a*^{ΔFox11}, un léger épaissement de la muqueuse est observé (épaississement moins marqué que chez les souris âgées de 90 jours), mais aucun polype n'est détecté. En ce qui concerne les estomacs des souris *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null}, ces-derniers présentent un épaissement de la muqueuse accompagné de quelques polypes de petite taille tant au niveau du corps que de l'antra, tandis que les souris *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{+/-} présentent un phénotype macroscopique intermédiaire entre la lignée *Bmpr1a*^{ΔFox11} et la lignée *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null}, c'est-à-dire un épaissement de la muqueuse accompagné parfois d'un ou deux polypes (figure 10). Au niveau de la pénétrance, la majorité des individus *Bmpr1a*^{ΔFox11} et tous les individus *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null} montrent un épaissement de la muqueuse alors que des polypes sont présent chez environ 50% des individus *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null}.

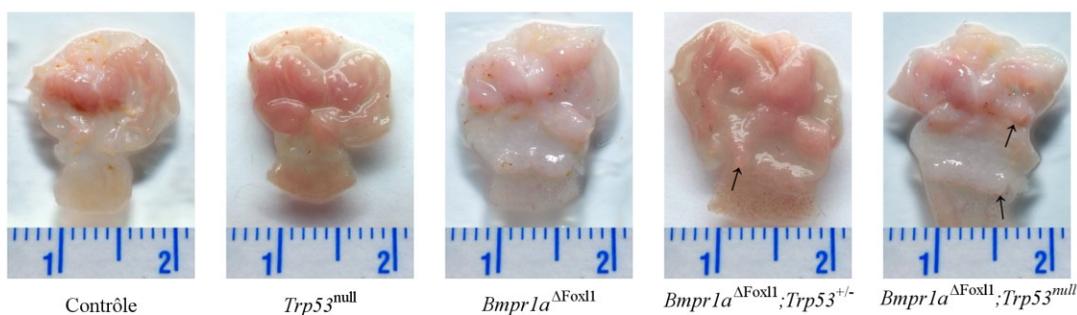


Figure 10. Les souris *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null} présentent une initiation de la polypose gastrique précoce à l'âge de 30 jours

Photos macroscopiques d'estomacs de souris âgées de 30 jours ouverts le long de la grande courbure et positionnés à plat, muqueuse vers le haut. Les flèches représentent des polypes et la règle est graduée en cm.

Des colorations H&E de coupes de tissu de ces estomacs ont ensuite été analysées par un pathologiste du CHUS appartenant à la Faculté de médecine et des sciences de la santé (FMSS) de l'Université de Sherbrooke, la professeure Perrine Garde-Granger M.D. Cette

analyse histologique a permis d'observer que l'estomac des souris contrôles et *Trp53*^{null} présentent bien une muqueuse saine, alors que les estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} montrent un épaissement de la muqueuse accompagné d'un léger accroissement du compartiment mésenchymateux. Concernant les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}, une hyperplasie de l'antre ainsi qu'un allongement du fovéole accompagné d'une légère inflammation a été observée. De plus, une diminution du nombre de vacuoles et une perte de muco-sécrétion a été notée au niveau épithélial alors qu'un léger accroissement du compartiment mésenchymateux est observé (figure 11). La sécrétion de mucus ainsi que l'analyse du compartiment mésenchymateux chez les souris âgées de 30 jours seront traités plus tard dans ce mémoire. La pathologiste conclue donc que la perte additionnelle de *Trp53* dans les estomacs de souris âgées de 30 jours entraîne un phénotype légèrement plus important que celui observé chez les souris n'ayant que la délétion de *Bmpr1a* dans les cellules FOXL1⁺.

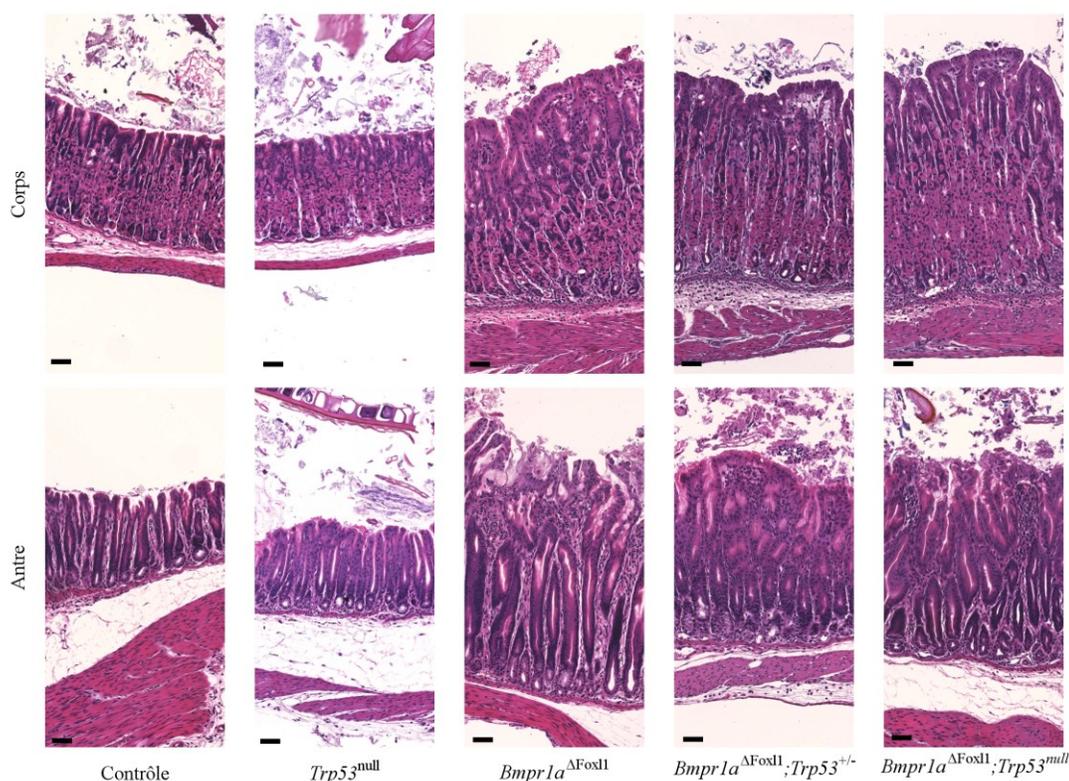


Figure 11. Les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent des signes d'initiation de la polypose gastrique au niveau histologique à l'âge de 30 jours

Coloration H&E de coupes de tissu du corps et de l'antre des estomacs de souris âgées de 30 jours. Barre d'échelle = 50μm.

8.2.1 Analyse du statut prolifératif des tissus d'estomac des souris âgées de 30 jours

Comme il a été fait pour les estomacs des souris âgées de 90 jours (figure 8), une IHC contre PCNA a été effectuée afin de déterminer la quantité et la localisation des cellules prolifératives dans les estomacs de souris âgées de 30 jours. Comme pour les estomacs des souris âgées de 90 jours, il est possible d'observer une augmentation du marquage de PCNA ainsi qu'un élargissement de la zone proliférative chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFox11} et *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null} comparativement aux souris contrôles, augmentation plus marquée chez les estomacs des souris *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null} (figure 12).

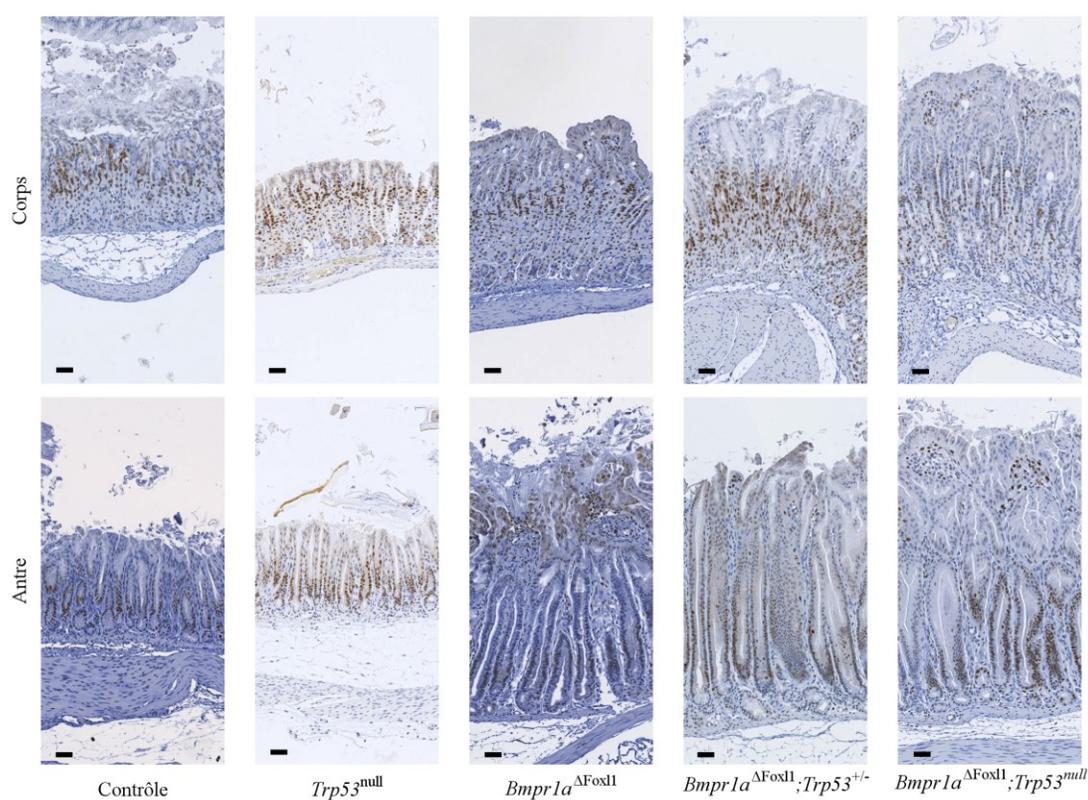


Figure 12. Marquage des cellules prolifératives des estomacs des souris *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null} à l'âge de 30 jours

IHC contre PCNA sur des coupes de tissu du corps et de l'antré de l'estomac de souris âgées de 30 jours. Révélation du marquage au DAB (en brun). Contre-coloration à l'hématoxyline. Barre d'échelle = 50µm.

Un décompte du nombre de cellules épithéliales et mésenchymateuses positives pour PCNA a aussi été effectué. Ce décompte a révélé que dans le corps, les souris *Bmpr1a*^{ΔFox11}

montrent une augmentation de 324% ($p < 0,0001$) du nombre de cellules mésenchymateuses, mais pas au niveau des cellules épithéliales comparativement aux souris contrôles. Les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent une augmentation de 129% ($p = 0,0003$) du nombre de cellules épithéliales et une augmentation de 224% ($p = 0,0013$) du nombre de cellules mésenchymateuses comparativement aux souris contrôles dans le corps. De plus, une augmentation de 128% ($p = 0,0005$) du nombre de cellules épithéliales est observée lorsqu'on compare les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} aux souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. Au niveau de l'antre, les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} montrent une augmentation du nombre de cellules épithéliales de 166% ($p = 0,0043$) et une augmentation du nombre de cellules mésenchymateuses de 447% ($p < 0,0001$) lorsque comparé aux souris contrôles. Pour les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}, une augmentation du nombre de cellules épithéliales de 207% ($p < 0,0001$) et une augmentation du nombre de cellules mésenchymateuses de 528% ($p < 0,0001$) ont été observées comparativement aux souris contrôles dans l'antre également (figure 13). Donc, les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} montrent une augmentation significative de la prolifération cellulaire épithéliale et mésenchymateuse dans le corps et l'antre comparativement aux souris contrôles. Cependant, la perte de *Trp53* combinée à la perte de *Bmpr1a* dans les cellules FOXL1⁺ permet d'observer une prolifération accrue dans les estomacs de souris âgées de 30 jours seulement au niveau de l'épithélium du corps, mais pas dans les autres compartiments cellulaires.

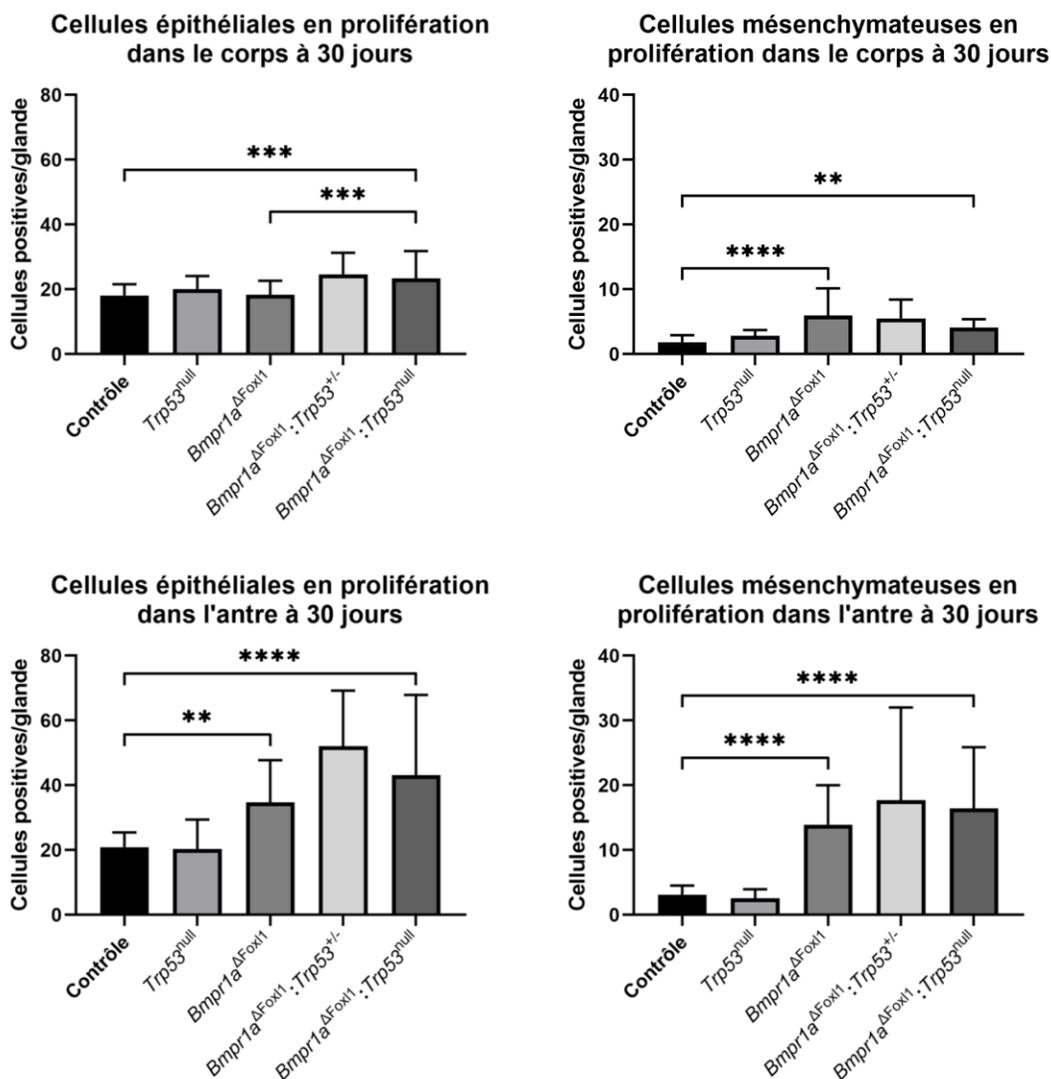


Figure 13. Nombre de cellules prolifératives dans les estomacs des souris *Bmpr1a^{ΔFoxl1}; Trp53^{null}* à l'âge de 30 jours

Quantification du nombre de cellules positives pour PCNA par glande gastrique des IHC en A. Analyse statistique ANOVA à deux voies, test à comparaison multiple de Tukey, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

8.2.2 Présence de lésions préneoplasiques chez les souris *Bmpr1a* ^{Δ Foxl1}; *Trp53*^{null} âgées de 30 jours

8.2.2.1 Diminution du nombre de cellules pariétales

La perte de cellules pariétales, cellules sécrétant l'acide gastrique, est une des premières lésions préneoplasiques qui peut être observée dans le corps de l'estomac. Un marquage de la pompe H⁺/K⁺ ATPase (pompe à protons) permet d'observer la présence des cellules pariétales ainsi que leur dénombrement. La figure 14A montre les images d'une IF contre la pompe à protons sur des coupes du corps de l'estomac de souris âgées de 30 jours. Les décomptes du nombre de cellules pariétales par glande du corps montrent une diminution de 20,8% (p<0,0001) du nombre de cellules pariétales chez les souris *Bmpr1a* ^{Δ Foxl1} comparativement aux souris contrôles, une diminution de 36,8% (p<0,0001) chez les souris *Bmpr1a* ^{Δ Foxl1}; *Trp53*^{null} comparativement aux souris contrôles et une diminution de 20,2% (p<0,0001) en comparant les souris *Bmpr1a* ^{Δ Foxl1}; *Trp53*^{null} aux souris *Bmpr1a* ^{Δ Foxl1} (figure 14B).

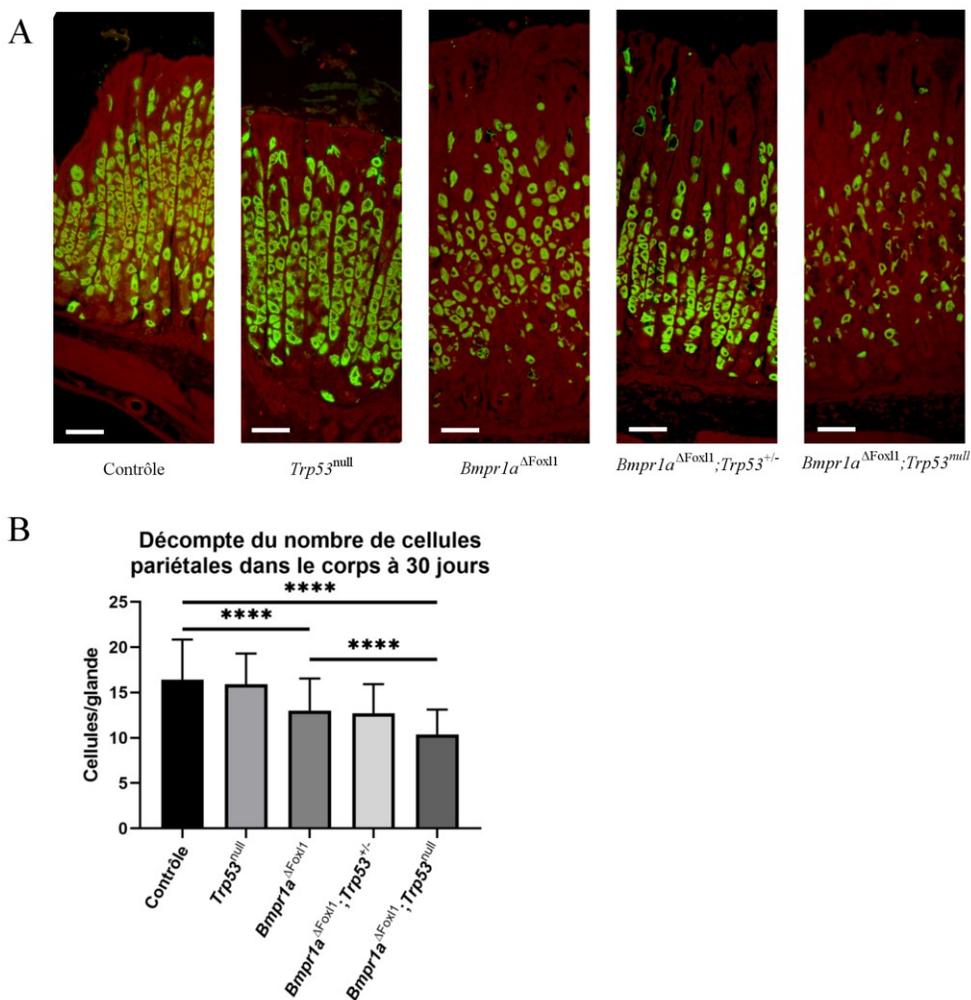


Figure 14. Diminution du nombre de cellules pariétales dans le corps des souris *Bmpr1a^{ΔFoxl1};Trp53^{null}* à l'âge de 30 jours

A. IF contre la pompe H^+/K^+ ATPase (en vert) sur des coupes du corps de l'estomac de souris âgées de 30 jours. Contre-coloration à l'évan bleu (en rouge). Barre d'échelle = $50\mu m$. B. Quantification du nombre de cellules positives par glande de l'IF en A. Analyse statistique ANOVA à deux voies, test à comparaison multiple de Tukey, **** $p < 0,0001$.

8.2.2.2 Spasmolytic peptide expressing metaplasia

Pour évaluer s'il y a présence de SPEM dans les estomacs des souris âgées de 30 jours, une IF a été effectuée sur des coupes de tissu du corps de l'estomac. La lectine GS-II couplée à un fluorophore a été utilisée pour marquer les cellules à mucus du collet alors qu'un anticorps dirigé contre GIF a été utilisé pour observer les cellules zymogéniques. Ainsi, chez les souris contrôles, *Trp53^{null}* et *Bmpr1a^{ΔFoxl1}*, il est possible d'observer la présence de

deux zones distinctes sans chevauchement des marqueurs pour les cellules à mucus du collet (vert) et cellules zymogéniques (rouge). Pour les estomacs des souris *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{+/-}, quelques cellules doublement marquées (jaune) ont été observées alors que les estomacs des souris *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null} arborent une petite zone de cellules doublement positives (jaune) (figure 15). Donc, les estomacs des souris *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null} présentent une initiation précoce du SPEM, comparativement aux souris *Bmpr1a*^{ΔFox11} du même âge.

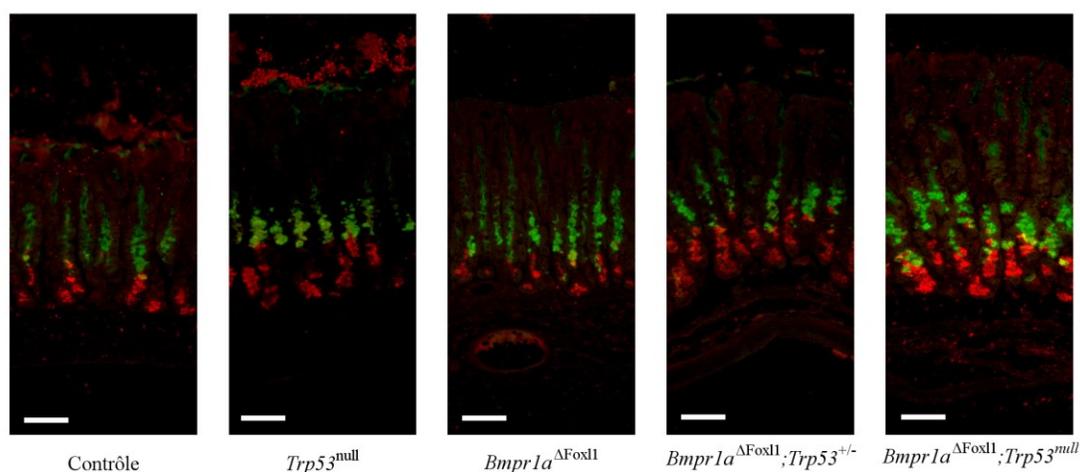


Figure 15. Initiation de SPEM dans le corps des souris *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null} à l'âge de 30 jours

Immunofluorescence contre GIF (en rouge) et la lectine GS-II (en vert) sur des coupes de tissu de corps à 30 jours. La zone de SPEM est visible en jaune par la superposition des marquages rouge et vert. Barre d'échelle = 50μm.

8.2.2.3 Métaplasie intestinale

Afin d'évaluer s'il y a présence de MI dans les estomacs de souris âgées de 30 jours, une coloration à l'alciyan bleu de coupes de tissu du corps a d'abord été effectuée. L'alciyan bleu est un colorant se fixant aux mucines acides qui sont sécrétées par les cellules caliciformes de l'intestin, donc aucun marquage n'est normalement observé dans un estomac sain. De ce fait, aucun marquage bleu n'est présent chez les souris contrôles, *Trp53*^{null} et *Bmpr1a*^{ΔFox11}. Cependant, la présence de coloration bleue dans les estomacs *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{+/-} et *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Trp53*^{null} montre qu'il y a sécrétion de mucines intestinales et donc métaplasie intestinale chez ces souris dès l'âge de 30 jours (figure 16A). Pour déterminer si la

métaplasie intestinale observée à la figure 16A est aussi accompagnée de l'expression d'enzymes intestinales, une RT-PCR a été effectuée sur des ADNc du corps de souris âgées de 30 jours afin d'amplifier les transcrits de la SI. Comme il est possible de voir à la figure 16B, aucun extrait d'estomac n'exprime la SI, contrairement au contrôle positif d'iléon qui l'exprime fortement. L'amplification de la SI a été normalisée par rapport à l'amplification de TBP.

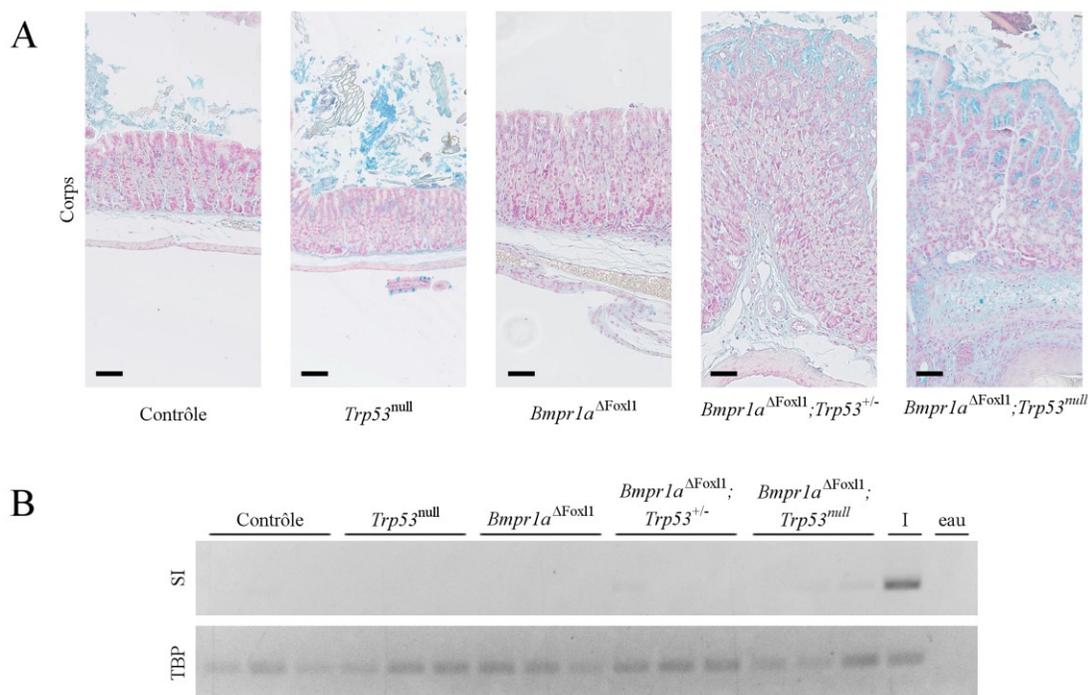


Figure 16. Présence de mucines intestinales dans le corps des souris *Bmpr1a^{ΔFoxl1};Trp53^{null}* à l'âge de 30 jours

A. Coloration à l'alcian bleu (en bleu) et contre-coloration avec le *nuclear fast red* (en rose) de coupes de tissu du corps de l'estomac de souris âgées de 30 jours. Barre d'échelle = 50µm. B. Migration sur gel d'agarose de la RT-PCR de la SI et de TBP à partir d'ADNc du corps de l'estomac de souris âgées de 30 jours. I = ADNc d'iléon de souris comme contrôle positif. Eau = contrôle négatif.

Afin de déterminer si la MI observée chez les souris *Bmpr1a^{ΔFoxl1};Trp53^{null}* est incomplète ou complète, une analyse des mucines gastriques a été effectuée par IF. La lectine UEA-1 est un marqueur utilisé pour visualiser l'ensemble des mucines sécrétées par les cellules à mucus de surface de l'estomac. Comme il est possible d'observer à la figure 17, les souris contrôles et *Trp53^{null}* montrent la présence d'une couche continue de mucus dans la région

du fovéole des glandes gastriques. Chez la souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11}$, la sécrétion de mucus semble être anormalement prolongée vers l'isthme. Cet élargissement est aussi présent chez les souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11};Trp53^{+/-}$ et $Bmpr1a^{\Delta Fox11};Trp53^{null}$ à la différence près qu'une sécrétion formant une couche de mucus plus importante est observée dans ces estomacs.

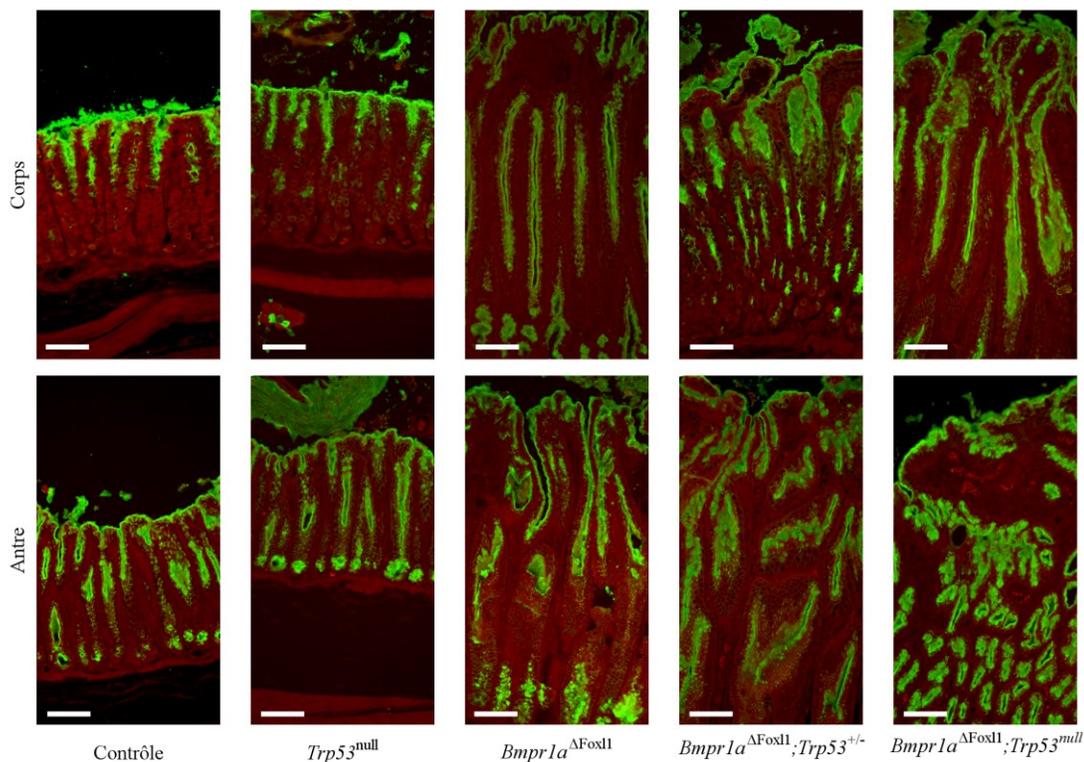


Figure 17. Analyse de la sécrétion des cellules à mucus de surface chez les souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11};Trp53^{null}$ âgées de 30 jours

IF utilisant la lectine UEA-1 (en vert) et une contre coloration au bleu d'évan (en rouge) sur des coupes de tissu du corps et de l'antré d'estomacs de souris âgées de 30 jours. Barre d'échelle = 50 μ m.

Comme UEA-1 est un marqueur général des mucines de surface de l'estomac, une IF avec un anticorps dirigé contre l'une des principales mucines gastriques, la mucine 5ac (MUC5AC), a été effectuée. La figure 18 permet d'observer que, chez les souris contrôles et $Trp53^{null}$, une fine couche de MUC5AC est présente au niveau apical des cellules du fovéole et ce, de manière continue sur toutes les glandes de l'estomac. Les estomacs des souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11}$ et $Bmpr1a^{\Delta Fox11};Trp53^{+/-}$ présentent aussi un marquage sur la totalité des glandes, mais ce marquage est plus important et est présent plus en profondeur vers le

fond de la glande. Les souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}$ et $Bmpr1a^{\Delta Foxl1};Trp53^{+/-}$ montrent donc une localisation de l'expression de MUC5AC qui est semblable au marquage de la lectine UEA-1 (figure 17). Les estomacs $Bmpr1a^{\Delta Foxl1};Trp53^{null}$ présentent aussi une zone de sécrétion de MUC5AC se prolongeant vers l'isthme, mais l'intensité de marquage semble plus mosaïque. En effet, dans certaines régions, les cellules à mucus de surface présentent une couche de MUC5AC plus épaisse que chez les souris contrôles alors que dans d'autres régions, le marquage est presque absent (figure 18). Cette sécrétion mosaïque de MUC5AC pourrait donc révéler une perte de certaines caractéristiques gastriques et donc un début de métaplasie intestinale complète dans les souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1};Trp53^{null}$, alors que les estomacs $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}$ montrent plutôt une métaplasie intestinale incomplète à 30 jours.

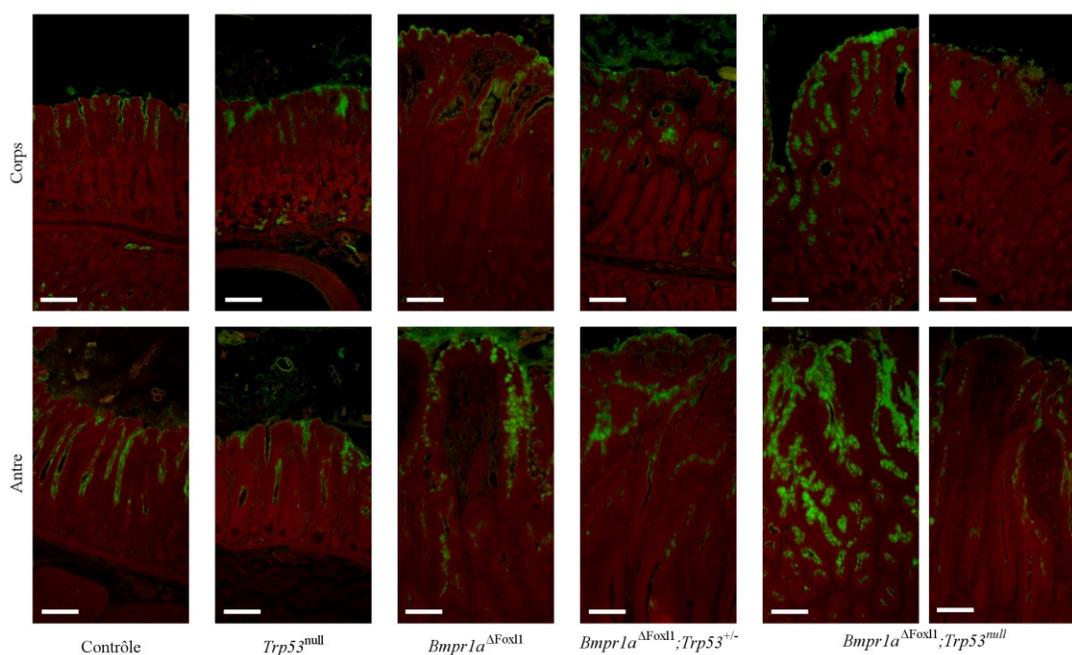


Figure 18. Analyse de la sécrétion de MUC5AC chez les souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1};Trp53^{null}$ âgées de 30 jours

IF contre MUC5AC (en vert) et contre-coloration au bleu d'évan (en rouge) sur des coupes de tissu du corps et de l'antra d'estomacs de souris âgées de 30 jours. Estomacs $Bmpr1a^{\Delta Foxl1};Trp53^{null}$: image de gauche = sécrétion forte, image de droite = sécrétion faible. Barre d'échelle = 50 μ m.

8.2.3 Analyses de CD44, marqueur de cellules souches cancéreuses gastriques dans les estomacs des souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}; Trp53^{null}$ âgées de 30 jours

Afin de déceler la présence possible de cellules souches cancéreuses, une IF dirigée contre CD44s (variant prédominant de CD44) a été effectuée. Ce marquage a permis d'observer qu'en condition basale, CD44s est retrouvé principalement à la membrane des cellules épithéliales de la base des glandes gastriques et très peu dans le mésenchyme. Ceci est observé chez les estomacs des souris contrôles et $Trp53^{null}$. Pour les souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}$ et $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}; Trp53^{+/-}$, une légère augmentation dans l'intensité du marquage des cellules épithéliales et la présence accrue de marquage dans le compartiment mésenchymateux est présente, surtout dans le fovéole. Cette augmentation est aussi présente chez les souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}; Trp53^{null}$ et ce, de manière plus importante. De plus, la zone de cellules épithéliales présentant CD44s à leur membrane est plus grande dans les estomacs des souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}; Trp53^{null}$ comparativement aux souris contrôles et $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}$ (figure 19).

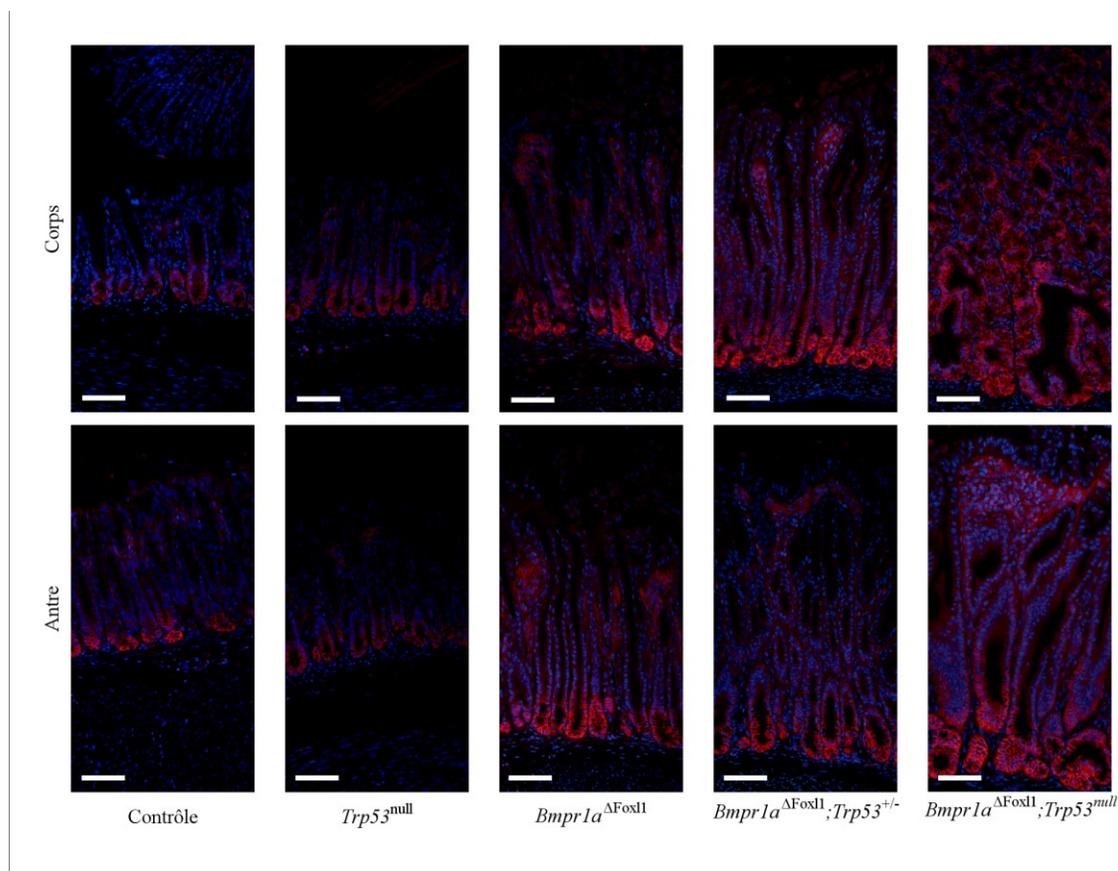


Figure 19. Augmentation de l'expression de CD44s dans l'estomac des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} à 30 jours

IF contre CD44s (en rouge) et contre coloration au DAPI marquant les noyaux en bleu sur des coupes du corps et de l'antra d'estomacs de souris âgées de 30 jours. Barre d'échelle = 50µm.

Comme CD44 est une protéine comportant plusieurs variants d'épissage et qu'un déséquilibre de l'expression de certains d'entre eux est connu pour être impliqué dans le cancer gastrique (Kodama et al. 2017), le variant 6 de CD44 (CD44v6) a été analysé en combinaison avec Ki67 afin d'évaluer la prolifération des cellules souches cancéreuses gastriques. Au niveau du corps, les souris contrôles et *Trp53*^{null} arborent très peu de marquage pour CD44v6 dans le bas des glandes avec aucun chevauchement du marquage avec la région proliférative de l'isthme. Le marquage pour ces mêmes souris dans l'antra est plus important et couvre toute la région du bas des glandes, mais chevauche que très peu l'isthme. Chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, la zone de chevauchement des deux marqueurs est plus importante tant dans le corps que dans l'antra. Ceci est dû à l'élargissement de la zone proliférative ainsi qu'à l'augmentation du marquage de CD44v6 vers l'isthme. Cette tendance est accentuée chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{+/-} alors que les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} montrent un marquage épithélial de CD44v6 sur presque toute la hauteur de la glande et une zone de marquage de Ki67 plus importante que le précédent génotype. D'ailleurs, presque aucun marquage de CD44v6 n'est observé dans le mésenchyme et ce, peu importe le génotype de la souris (figure 20).

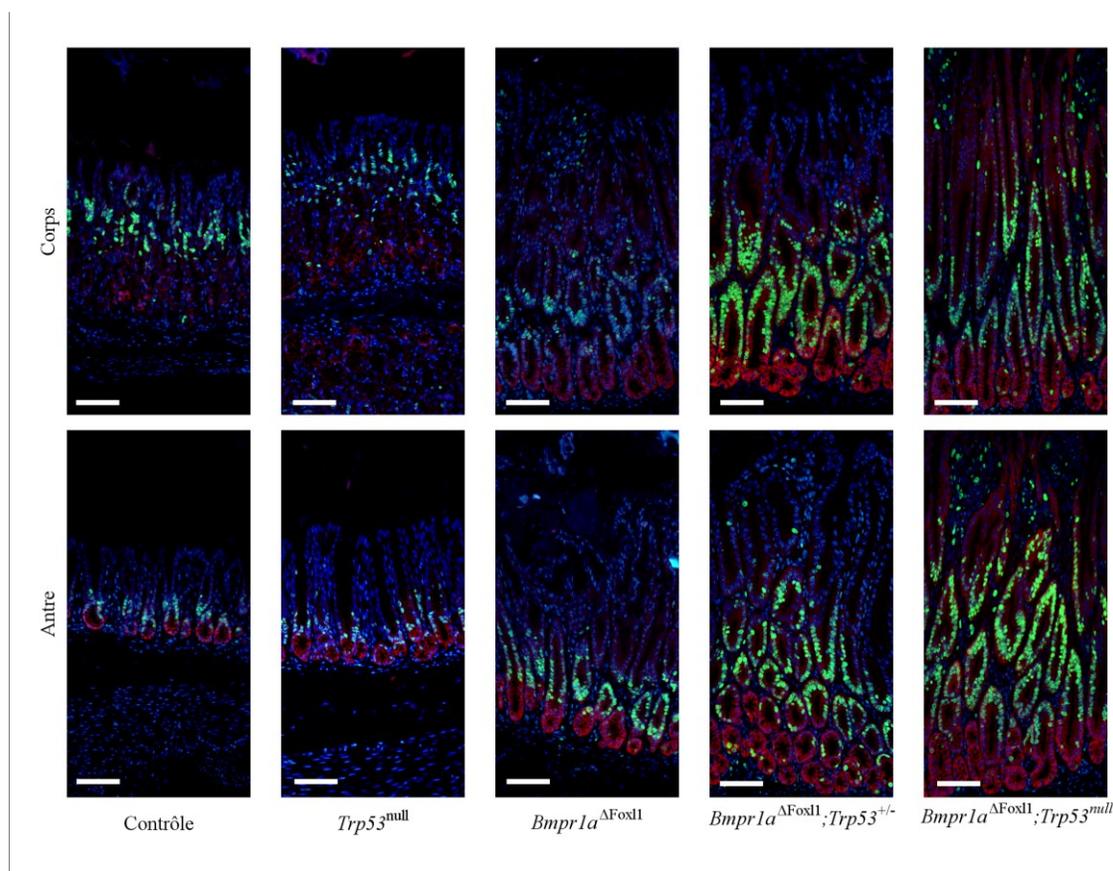


Figure 20. Augmentation du nombre de cellules souches cancéreuses prolifératives dans l'estomac des souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1};Trp53^{null}$ à 30 jours

IF contre CD44v6 (en rouge) et Ki67 (en vert) avec contre-coloration au DAPI (en bleu) sur des coupes de tissu du corps et de l'antre d'estomacs de souris âgées de 30 jours. Barre d'échelle = 50 μ m.

8.2.4 Analyses de l'identité des cellules mésenchymateuses des estomacs des souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1};Trp53^{null}$ âgées de 30 jours

Afin d'observer ainsi que de quantifier les fibroblastes et myofibroblastes dans le compartiment mésenchymateux de la muqueuse gastrique, une IF dirigée contre la vimentine et α SMA a été effectuée. Les fibroblastes sont positifs seulement pour la vimentine (en vert) alors que les myofibroblastes sont co-marqués par la vimentine (en vert) et α SMA (en rouge) pour une couleur finale jaune. À la figure 21A, il est possible d'observer que les souris contrôles et $Trp53^{null}$ présentent une quantité homéostatique de fibroblastes et de myofibroblastes le long des glandes de l'estomac. Chez les souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}$, un allongement et élargissement de la portion mésenchymateuse du fovéole

contenant en grande partie des fibroblastes accompagnés de quelques myofibroblastes est observé. La région de l'isthme et de la base de la glande ne présente pas de changement notable, seul le fovéole semble être affecté comparativement aux souris contrôles. Les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent une expansion plus importante de la région mésenchymateuse du fovéole que les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et cette région est peuplée elle aussi en majorité de fibroblastes. Au niveau de l'isthme et de la base des glandes, un certain élargissement du mésenchyme est visible et celui-ci contient des fibroblastes ainsi que des myofibroblastes. La souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{+/-} montre un phénotype intermédiaire entre les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} (figure 21A). Afin de déterminer de manière quantitative les modulations dans le nombre et l'identité des cellules mésenchymateuses, un décompte a été effectué sur les IF présentées plus haut. Les résultats de ce décompte (figure 21B) confirment qu'il n'y a pas de différence entre les souris contrôles et *Trp53*^{null} au niveau du nombre de fibroblastes ou myofibroblastes. La comparaison entre les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et les souris contrôles montre une augmentation de 179,4% (p=0,0008) du nombre de fibroblastes et une augmentation de 192,0% (p<0,0001) du nombre de myofibroblastes. La comparaison entre les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} et contrôles montre un profil semblable avec une augmentation de 173,8% (p=0,0023) du nombre de fibroblastes et une augmentation de 193,8% (p<0,0001) du nombre de myofibroblastes. Malgré le fait que les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} semblent montrer un nombre de fibroblastes et myofibroblastes plus important que les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, cette tendance n'est pas significative.

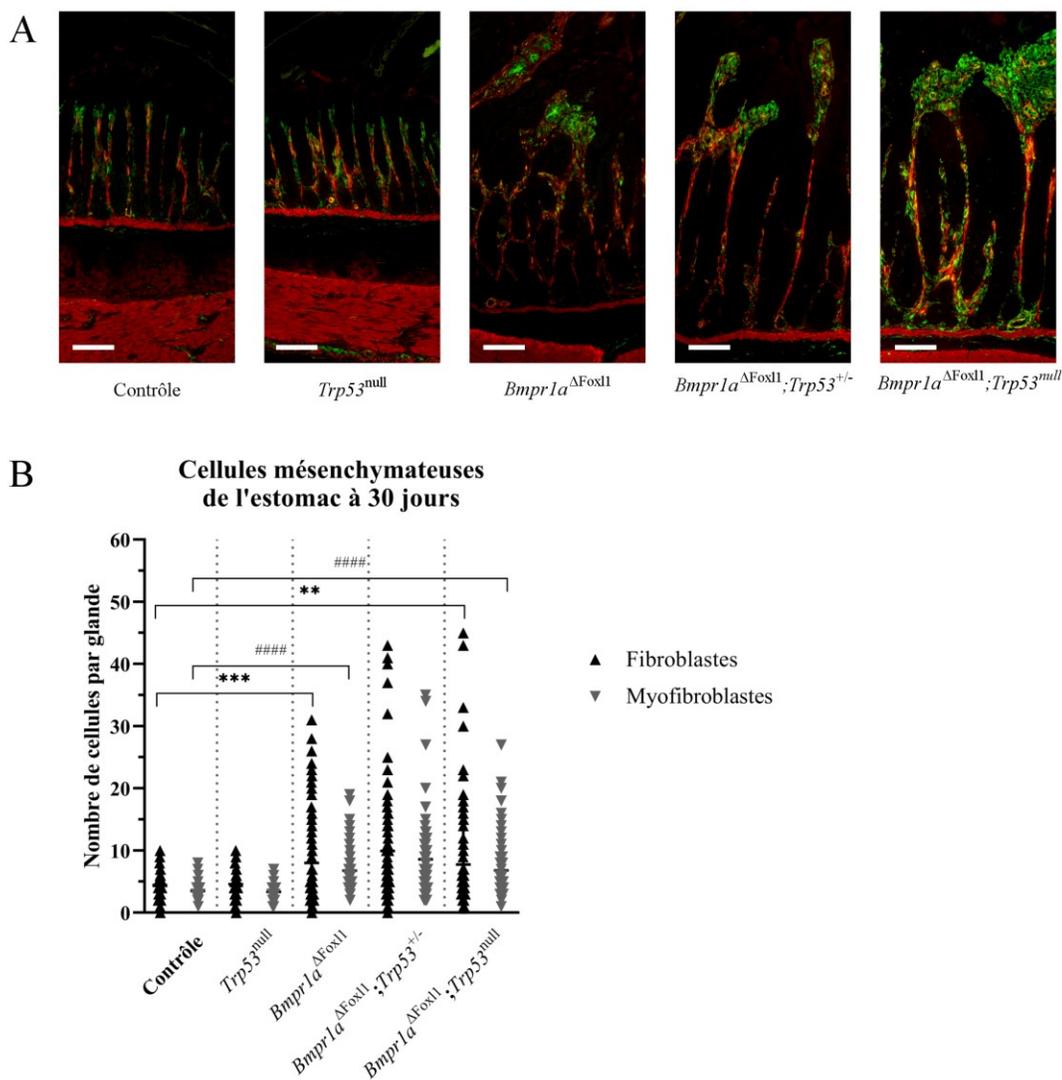


Figure 21. Analyse du nombre et de l'identité des cellules mésenchymateuses dans les estomacs des souris *Bmpr1a^{ΔFoxl1};Trp53^{null}* âgées de 30 jours

A. IF contre la vimentine (en vert) et α SMA (en rouge) sur des coupes de tissu d'estomacs de souris âgées de 30 jours. Les fibroblastes sont positifs pour la vimentine (vert) et les myofibroblastes sont co-marqués par la vimentine et α SMA (jaune). Barre d'échelle = 50 μ m. B. Quantification du nombre de fibroblastes et myofibroblastes en A. Analyse statistique ANOVA à deux voies, test à comparaison multiple de Tukey. Fibroblastes : ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Myofibroblastes : ##### $p < 0,0001$.

8.3 Analyse du transcriptome des carcinomes gastriques des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} âgées de 90 jours

Afin d'analyser de manière globale les tumeurs des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} et comprendre comment la perte de p53 permet un avancement de la cascade de la carcinogenèse gastrique à 90 jours, une analyse du transcriptome a été effectuée sur la muqueuse de l'antre des souris contrôles et les polypes de l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}. Pour cette analyse, l'antre gastrique a été ciblée parce qu'il s'agit de la région où les phénotypes d'initiation de la carcinogenèse gastrique est la plus précoce et où des tumeurs de stade avancé ont été observées lors de l'analyse histopathologique. Les résultats du séquençage d'ARN analysés par le logiciel *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) ont permis de trier les données selon les paramètres suivants : Fold change (FC) >2 ou <-2 et p-Value < 0,05. Ainsi, les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} présentent un total de 72 cibles modulées significativement (9 cibles à la hausse et 61 cibles à la baisse) lorsque comparées aux souris contrôles. Chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}, ce sont plutôt 2018 cibles qui sont modulées significativement (535 à la hausse et 1483 à la baisse) lorsque comparées aux souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}.

8.3.1 Analyses des caractéristiques générales du transcriptome des polypes de l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} âgées de 90 jours

Les listes de transcrits triés ont été analysées par IPA pour déterminer si les modulations observées sont associées à des maladies ou à des fonctions biologiques. Comme il est possible d'observer à la figure 22, les cibles modulées chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} comparativement aux souris contrôles sont associées à une diminution de l'homéostasie cellulaire et du maintien des filaments du cytosquelette avec un z-score de -0,44 et -1,04 respectivement (un z-score négatif prédit que la fonction en question est diminuée alors qu'un z-score positif prédit une fonction augmentée). Pour ce qui est de la comparaison entre les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, les cibles modulées sont plutôt associées à la perte d'homéostasie cellulaire et du maintien des filaments du cytosquelette avec un z-score plus élevé que la comparaison précédente (-3,08 et -2,98 respectivement). En plus de ces deux caractéristiques, les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent les caractéristiques d'adénocarcinomes (z-score 2,47), une diminution du niveau d'activation et transcription des gènes (z-scores de -2,55 à -6,31), une diminution de l'organisation du

cytosquelette (z-scores de -2,36 à -5,63) et une diminution des processus liés aux interactions cellulaires tant cellule-cellule que cellule-matrice (z-score de -2,16 à -3,18) (figure 22). Donc, les polypes de l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent des modifications du transcriptome plus importantes que celles des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} à 90 jours.

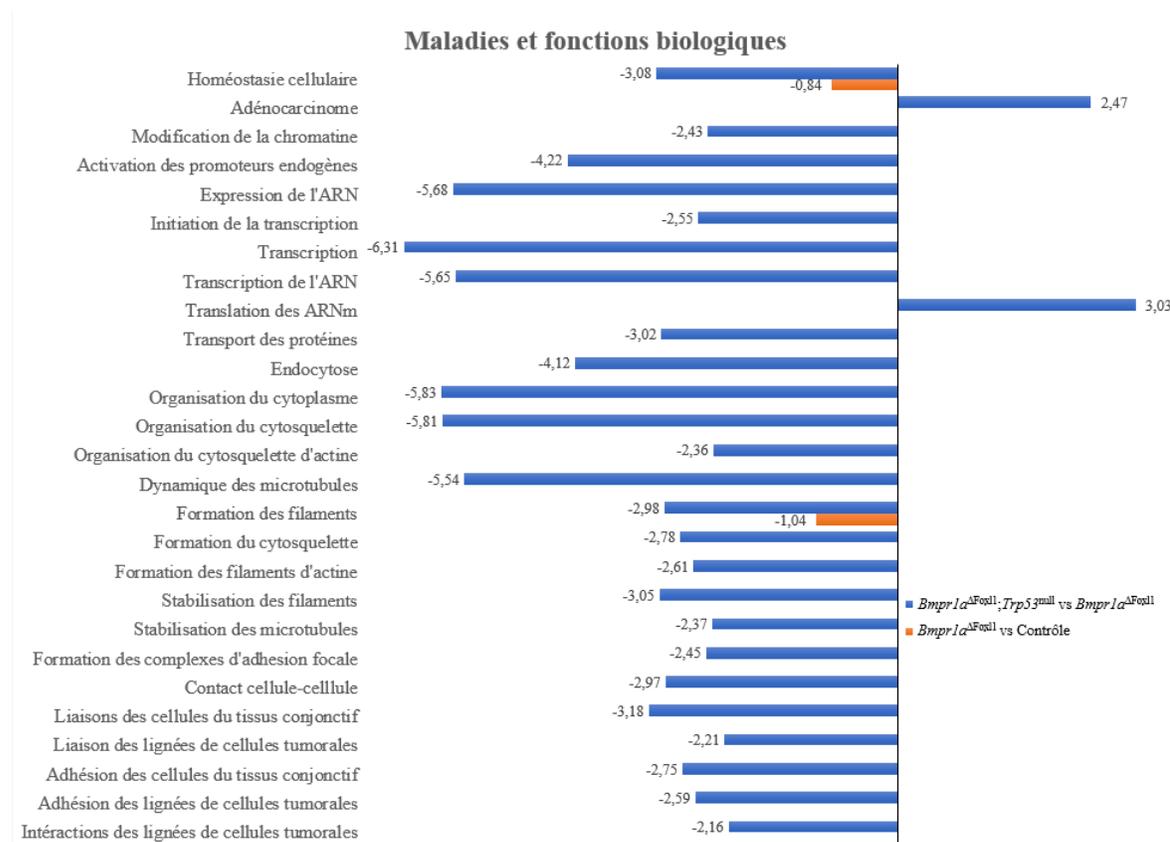


Figure 22. Analyse des caractéristiques générales du transcriptome de l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} à l'âge de 90 jours

Graphique des caractéristiques liées à des maladies et fonctions biologiques du transcriptome des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} comparées aux souris contrôles (barres oranges) et des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} comparées aux souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} (barres bleues). Un z-score négatif prédit une diminution de la fonction alors qu'un z-score positif prédit une augmentation de la fonction. Les ARNm proviennent tous de l'antre de souris âgées de 90 jours (n=3). L'analyse a été effectuée avec le logiciel IPA et seuls les transcrits avec un FC < -2 ou > 2 et ayant p-Value < 0,05 ont été utilisés.

8.3.2 Analyses des signatures des jonctions cellulaires dans le transcriptome des polypes de l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} âgées de 90 jours

Les données de séquençage des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} ont ensuite été analysées avec le logiciel *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), ce qui a permis de comparer les données non triées à des bases de données en lien avec la polarité et les jonctions cellulaires. Ainsi, les transcrits en lien avec l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire sont fortement diminués dans les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} comparativement aux souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} (*Normalized Enrichment Score* [NES] de -2,27 et -2,18 respectivement)(un NES négatif signifie un enrichissement négatif, donc expression à la baisse des transcrits liés à cette catégorie, alors qu'un NES positif signifie un enrichissement positif) (figure 23 A et B). Il en va de même avec les gènes associés à l'assemblage des jonctions cellulaires et leur organisation qui montrent des NES de -2,12 (figure 23 C et D). Voici quelques exemples de gènes dont l'expression est diminuée dans les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} : intégrines $\alpha 2$, $\alpha 6$, $\beta 1$ et $\beta 3$; claudine 9 et 5; plakofiline 2; laminine $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ et $\gamma 2$; Cadhérine 5 et 13 et la fibronectine 1.

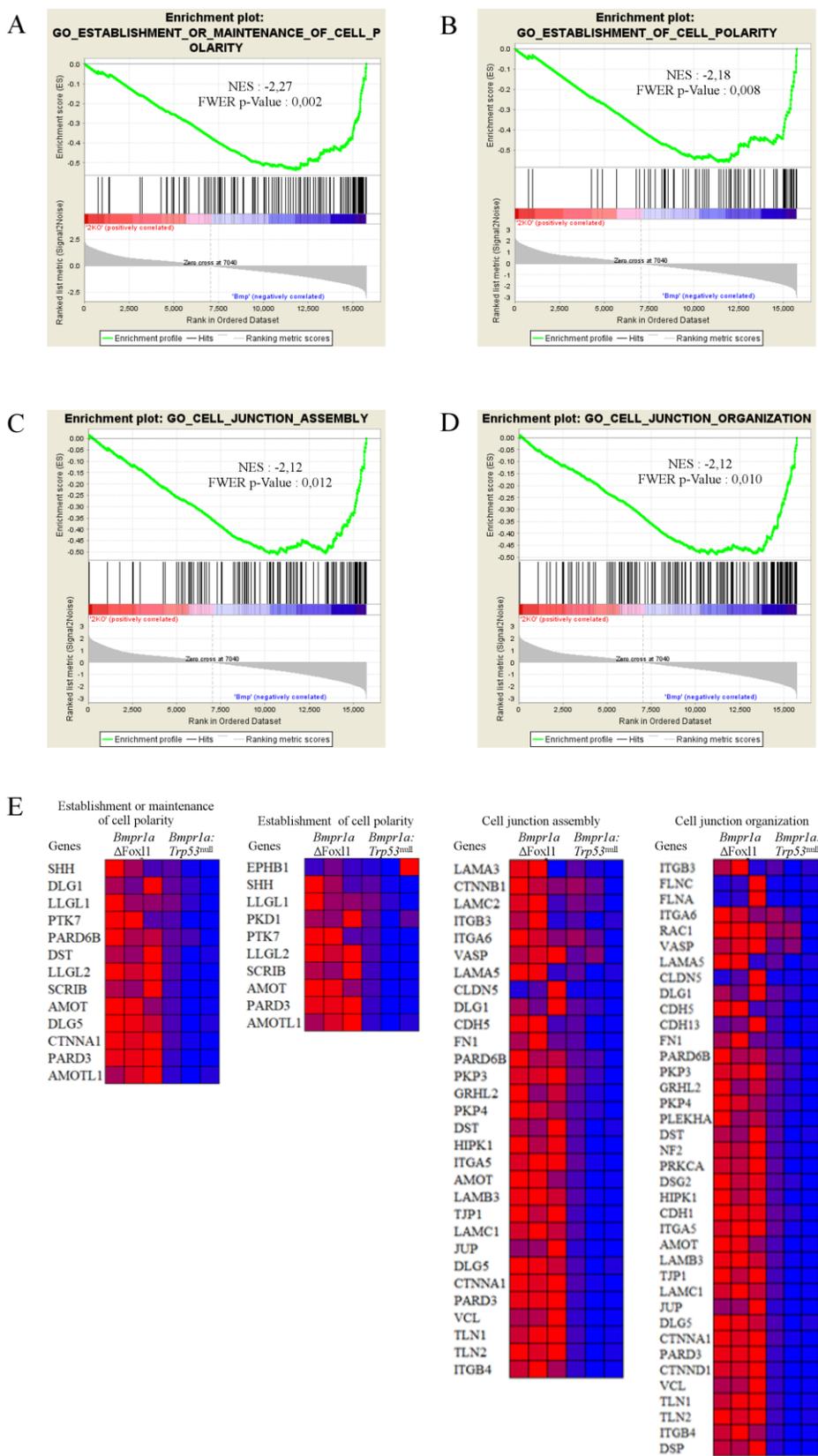


Figure 23. Analyse des signatures de polarité et jonctions cellulaires de l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null} à l'âge de 90 jours

Graphiques d'enrichissement obtenus à partir de l'analyse avec GSEA des résultats de séquençage non triés des polypes de l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null} âgées de 90 jours. A. Établissement ou maintien de la polarité cellulaire. Statistiques : NES = -2,27, FWER p-Value = 0,002. B. Établissement de la polarité cellulaire. Statistiques : NES = -2,18, FWER p-Value = 0,008. C. Assemblage des jonctions cellulaires. Statistiques : NES = -2,12, FWER p-Value = 0,012. D. Organisation des jonctions cellulaires. Statistiques : NES = -2,12, FWER p-Value = 0,010. E. Tableaux montrant une sélection des gènes utilisés pour générer les graphiques en A à D. Le niveau d'expression d'un gène donné pour chaque individu (n=3) est exprimé par un code de couleur où bleu = faible et rouge = fort.

Comme montré à la figure 23, les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null} montrent une dérégulation de leurs jonctions cellulaires. Une analyse plus approfondie a révélé que les transcrits de gènes reliés aux jonctions adhérentes et à leur assemblage sont diminués dans les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null} comparativement aux souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} selon trois bases de données de GSEA (NES de -2,28 ; -2,27 et -2,17) (figure 24A à C). Les transcrits de gènes dont l'expression est diminuée dans les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null} sont entre-autres des caténines ($\alpha 1$, $\beta 1$ et $\delta 1$), la E-cadhérine, la vinculine, la desmocolline et la desmoplakine (figure 24D).

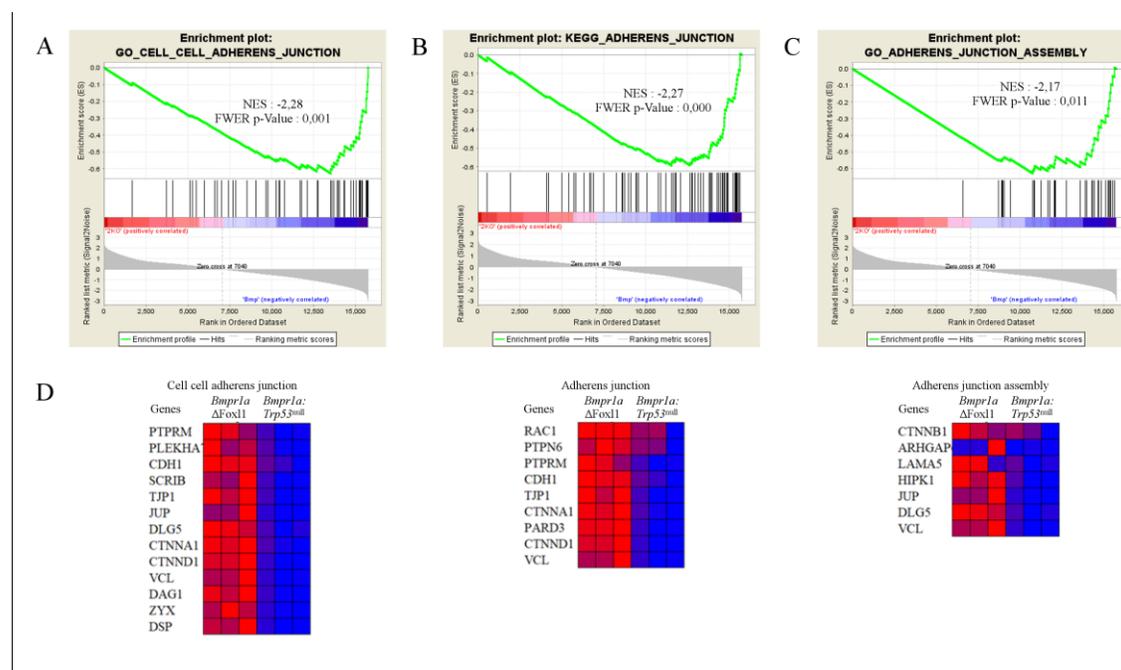


Figure 24. Analyse des signatures des jonctions adhérentes de l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} à l'âge de 90 jours

Graphiques d'enrichissement obtenus à partir de l'analyse avec GSEA des résultats de séquençage des polypes de l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} comparées aux souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} âgées de 90 jours. A. Jonctions adhérentes cellule-cellule. Statistiques : NES = -2,28, FWER p-Value = 0,001. B. Jonctions adhérentes. Statistiques : NES = -2,27, FWER p-Value = 0,000. C. Assemblage des jonctions adhérentes. Statistiques : NES = -2,17, FWER p-Value = 0,011. D. Tableaux montrant une sélection des gènes utilisés pour générer les graphiques en A à C. Le niveau d'expression d'un gène donné pour chaque individu (n=3) est exprimé par un code de couleur où bleu = faible et rouge = fort.

Par la suite, les analyses avec GSEA ont montré qu'en plus des jonctions cellules-cellules, les gènes en lien avec les jonctions cellules-matrice extracellulaire sont aussi modulés. De ce fait, la figure 25 montre que les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent une diminution de l'expression des gènes liés à la régulation des adhésions cellule-substrat (NES : -2,20), à l'assemblage des jonction cellule-substrat (NES : -2,16), à la régulation des adhésions cellule-matrice (NES : -2,25) et à la signalisation des intégrines (NES : -1,88) (figure 25 A à D) comparativement aux souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. Des exemples de gènes dont les transcrits sont diminués chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} sont des laminines ($\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\gamma 2$), des collagènes (1 et 16), la fibronectine 1 et des intégrines ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$ et $\beta 3$).

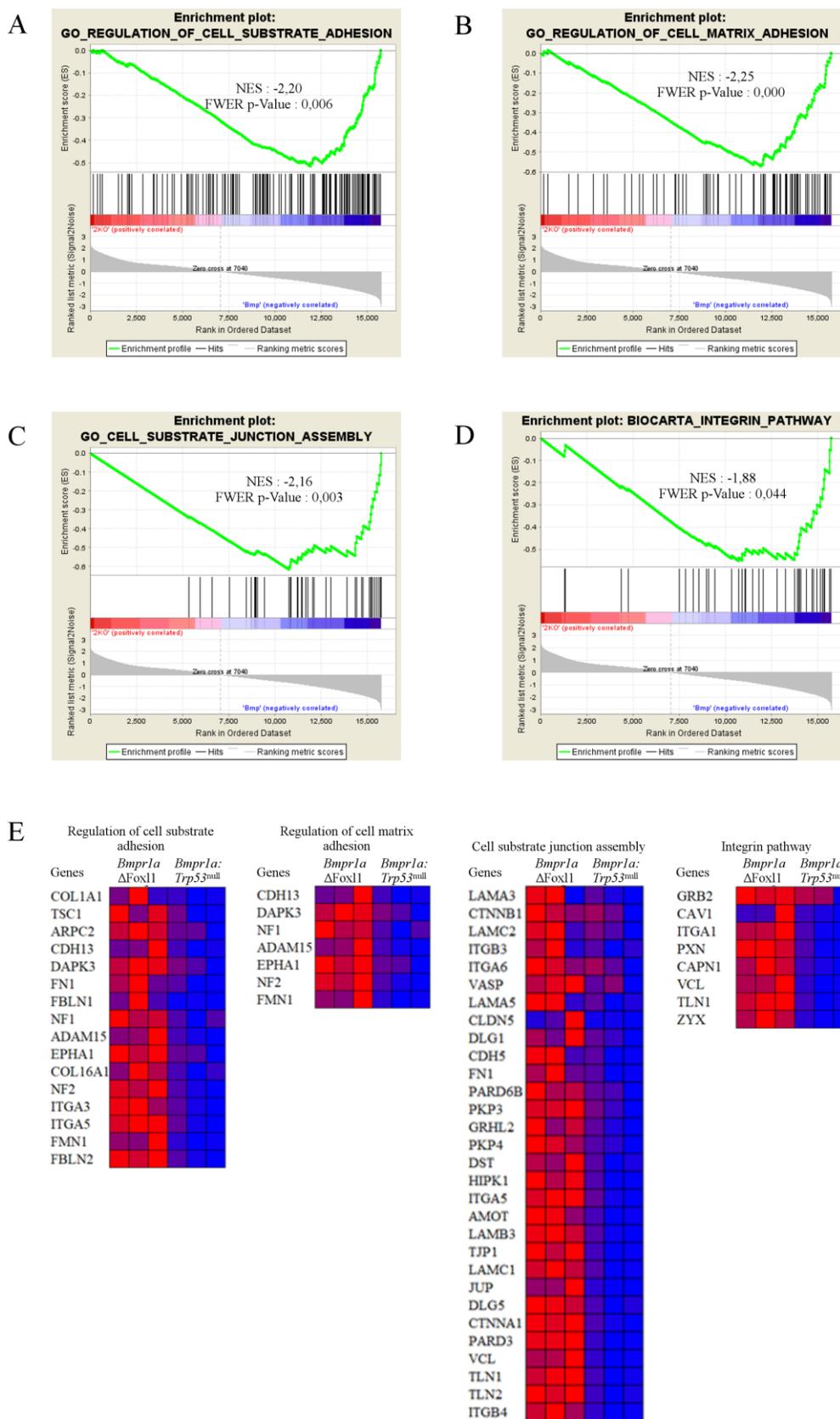


Figure 25. Analyse des signatures des jonctions cellule-matrice de l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} à l'âge de 90 jours

Graphiques d'enrichissement obtenus avec GSEA à partir des résultats de séquençage des polypes de l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} comparées aux souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} âgées de 90 jours. A. Régulation des adhésions cellule-substrat. Statistiques : NES = -2,20, FWER p-Value = 0,006. B. Régulation des adhésions cellule-matrice. Statistiques : NES = -2,25, FWER p-Value = 0,000. C. Assemblage des jonctions cellules-substrat. Statistiques : NES = -2,16, FWER p-Value = 0,003. D. Signalisation des intégrines. Statistiques : NES = -1,88, FWER p-Value = 0,044. E. Tableaux montrant une sélection des gènes utilisés pour générer les graphiques en A à D. Le niveau d'expression d'un gène donné pour chaque individu (n=3) est exprimé par un code de couleur où bleu = faible et rouge = fort.

8.3.3 Analyses des signatures de carcinogenèse gastrique dans le transcriptome des polypes de l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} âgées de 90 jours

Avec GSEA, il a été possible de déterminer que plusieurs signalisations impliquées dans la carcinogenèse gastrique sont prédites pour être modulées dans les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} lorsque comparées aux souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. D'abord, les transcrits de gènes impliqués dans la voie de signalisation Hedgehog (HH) sont à la baisse chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} comparativement aux souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} comme le montrent les analyses GSEA pour la signalisation Hedgehog (NES : -2,24) et smoothed (NES : -2,26) (figure 26A et B). Ensuite, GSEA montre un enrichissement des cibles de MYC (NES 1,70) dans les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} (figure 26C). Parmi les gènes cibles de MYC enrichis, on retrouve des initiateurs de la traduction comme EIF1AX ainsi que des régulateurs du cycle cellulaire comme CDK4.

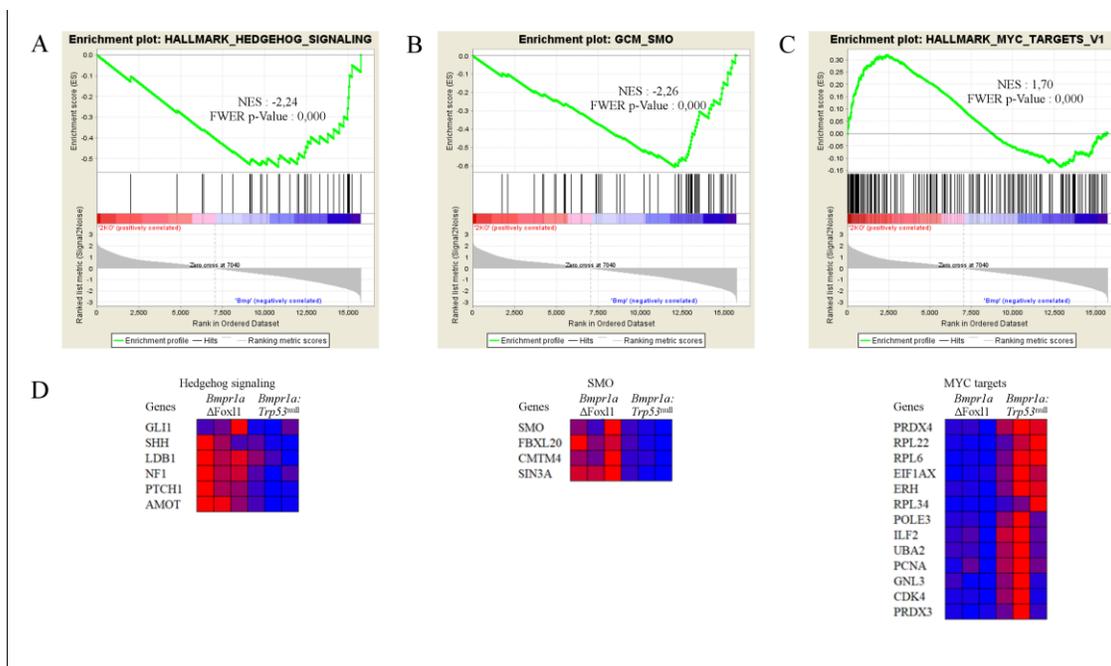


Figure 26. Analyse des signatures de marqueurs de cancer gastrique de l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null} à l'âge de 90 jours

Graphiques d'enrichissement obtenus à partir de l'analyse avec GSEA des résultats de séquençage des polypes de l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null} comparées aux souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} âgées de 90 jours. A. Signalisation Hedgehog. Statistiques : NES = -2,24, FWER p-Value = 0,000. B. Smoothened. Statistiques : NES = -2,26, FWER p-Value = 0,000. C. Cibles de MYC. Statistiques : NES = 1,70, FWER p-Value = 0,000. D. Tableaux montrant une sélection des gènes utilisés pour générer les graphiques en A à C. Le niveau d'expression d'un gène donné pour chaque individu (n=3) est exprimé par un code de couleur où bleu = faible et rouge = fort.

L'analyse avec GSEA a aussi permis de mettre en évidence la modulation de cibles connues pour être diminuées dans le cancer gastrique en plus d'interagir avec p53 afin de réguler la croissance cellulaire. Ainsi, ces cibles sont enrichies dans les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et pourraient empêcher la progression des adénomes chez ces souris alors que dans les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null}, ces cibles et p53 sont diminués et permettent l'avancement de la cascade de la carcinogenèse gastrique vers le carcinome. La figure 27 montre les enrichissements GSEA pour CSNK1D (NES : -2,10), MYST2 (NES : -2,09) et ING1 (NES : -2,06) dans les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null} comparativement aux souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}.

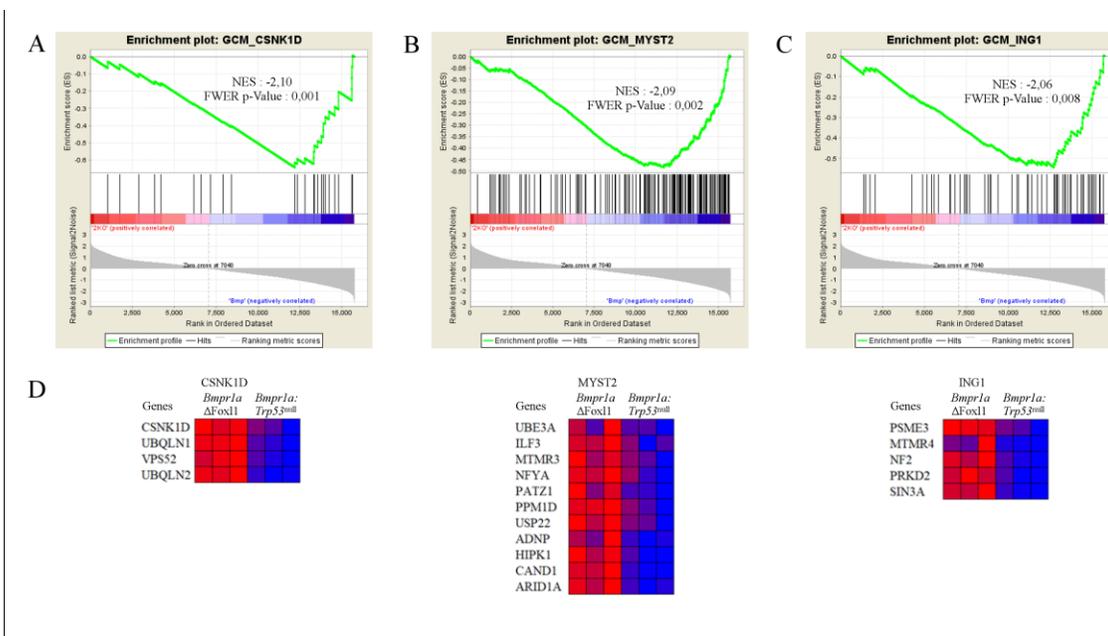


Figure 27. Analyse des signatures de marqueurs de cancer gastrique en lien avec p53 dans l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFox11}; *Trp53*^{null} à l'âge de 90 jours

Graphiques d'enrichissement obtenus à partir de l'analyse avec GSEA des résultats de séquençage des polypes de l'antre des souris *Bmpr1a*^{ΔFox11}; *Trp53*^{null} comparées aux souris *Bmpr1a*^{ΔFox11} âgées de 90 jours. A. CSNK1D. Statistiques : NES = -2,10, FWER p-Value = 0,001. B. MYST2. Statistiques : NES = -2,09, FWER p-Value = 0,002. C. ING1. Statistiques : NES = -2,06, FWER p-Value = 0,008. D. Tableaux montrant une sélection des gènes utilisés pour générer les graphiques en A à C. Le niveau d'expression d'un gène donné pour chaque individu (n=3) est exprimé par un code de couleur où bleu = faible et rouge = fort.

9. DISCUSSION

L'importance de la communication entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses dans le maintien de l'homéostasie tissulaire a été clairement démontrée dans divers organes. La réciprocité entre ces cellules est tout aussi importante dans le système gastrointestinal où les cellules mésenchymateuses et épithéliales ont la capacité de détecter le microenvironnement les entourant et générer une réponse en sécrétant différentes molécules signalétiques ou facteurs modifiant la MEC (Sailaja, He, et Li 2016; Valkenburg, de Groot, et Pienta 2018). Dans l'intestin, la membrane basale, les cellules mésenchymateuses péricryptales et les cellules épithéliales forment la niche des cellules souches, soit le microenvironnement idéal au bon fonctionnement des cellules souches intestinales (Greicius et Virshup 2019). De ce fait, les cellules mésenchymateuses péricryptales semblent jouer un rôle particulièrement important dans l'homéostasie de la niche épithéliale intestinale en sécrétant entre-autres des facteurs WNT (Kabiri et al. 2014; Yen et Wright 2006). Au niveau de l'estomac, les interactions entre les compartiments épithélial et mésenchymateux sont connues depuis longtemps comme des éléments essentiels à la différenciation des cellules épithéliales adultes chez le poulet (Yasugi 1993) et chez le rat (Tsukada et al. 1998). Depuis, plusieurs études se sont intéressées à ces interactions dans la muqueuse gastrique sous différents contextes, mais la compréhension de cette communication au niveau moléculaire et à l'échelle tissulaire est restée peu explorée. Comme dans l'intestin, plusieurs études ont établi hors de tout doute que les cellules mésenchymateuses gastriques sont particulièrement importantes dans la régulation de l'épithélium, même si l'identité de la niche des cellules souches gastriques reste largement inconnue. Une étude en ce sens a utilisé un système de co-culture en trois dimensions afin de démontrer que les myofibroblastes gastriques sont nécessaires au maintien à long terme des organoïdes d'estomac et participent à la prolifération des cellules souches épithéliales et à la différenciation des cellules progénitrices (Katano et al. 2015).

Dans l'estomac, il est connu que le facteur de transcription *Foxl1* est exprimé dans le mésoderme (Kaestner et al. 1997) et que des télocytes sont présents dans le mésenchyme

adjacent à l'épithélium (Pieri, Vannucchi, et Faussonne-pellegrini 2008). Cependant, les fonctions de ces cellules mésenchymateuses n'ont pas été mises en lumière à ce jour dans la muqueuse gastrique. De plus, aucune étude n'a déterminé si les télocytes gastriques expriment *Foxl1* comme c'est le cas dans l'intestin et le côlon (Shoshkes-Carmel et al. 2018). Heureusement, les télocytes FOXL1⁺ de l'intestin et du côlon ont été étudiés par plusieurs groupes de recherche et ont permis de mettre en évidence leur rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie épithéliale et tissulaire (Aoki et al. 2016), mais aussi leur implication dans plusieurs pathologies dont la fibrose (Ibba-manneschi, Rosa, et Manetti 2016). Un nombre grandissant d'études relate à quel point les télocytes sont liés à différents processus assurant une homéostasie tissulaire tels que l'inflammation, la fibrose, la réparation de dommages tissulaires, l'angiogenèse et la niche des cellules souches épithéliales. Comme tous ces éléments sont liés d'une manière ou d'une autre au développement de néoplasies et que les télocytes régulent aussi l'activation des cellules mésenchymateuses en CAF, il est pertinent d'analyser leur rôle dans le développement des tumeurs d'origine épithéliale (Díaz-flores et al. 2016). De plus, il a été mis en évidence que les télocytes sécrètent plusieurs facteurs de croissance à destination des cellules épithéliales intestinales, dont les ligands BMP qui sont connus pour réguler la différenciation des cellules épithéliales le long de la villosité (Shoshkes-Carmel et al. 2018).

La signalisation des BMP a d'ailleurs été un élément central de plusieurs projets de notre laboratoire. Ces projets ont démontré l'importance de la voie des BMP dans la différenciation terminale de la lignée sécrétrice des cellules épithéliales intestinales (Auclair et al. 2007), mais aussi de son rôle de suppresseur de tumeur dans le système gastrointestinal (Allaire et al. 2016; S. A. B. Roy et al. 2016). Dans l'estomac, plusieurs études suggèrent que la délétion de la voie des BMP mène à la formation de tumeurs (Bleuming et al. 2007; Oshima et al. 2009). Cependant, dans toutes ces études, l'atteinte à la voie des BMP affecte tous les types cellulaires de l'estomac. Comme la voie des BMP est une signalisation autocrine et paracrine permettant la communication entre l'épithélium et le mésenchyme, notre laboratoire s'est demandé si ces tumeurs découlent de la perte des BMP au niveau du compartiment épithélial ou au niveau du compartiment mésenchymateux. Même si les carcinomes gastriques sont majoritairement de nature

épithéliale, un projet de notre laboratoire a permis de déterminer que la perte de la voie des BMP dans les cellules épithéliales seulement ne permet pas d'initier la polypose gastrique chez la souris (Maloum et al. 2011). Alors sachant que l'importance du compartiment mésenchymateux dans l'homéostasie tissulaire gastrointestinale est souvent négligée à tort, notre laboratoire a entrepris d'étudier la signalisation des BMP dans les télocytes FOXL1⁺. Ce projet a mis en évidence que dans l'estomac, la perte de la voie des BMP dans les télocytes FOXL1⁺ (*Bmpr1a*^{ΔFoxl1}) permet l'initiation de la polypose et que des adénomes de type intestinal sont présents chez ces souris dès l'âge de 90 jours (S. A. B. Roy et al. 2016). Cette étude démontre sans équivoque qu'un microenvironnement altéré (ici le mésenchyme délété en signalisation BMP) peut avoir une influence énorme sur la muqueuse en entier jusqu'à transformer un épithélium sain et non-muté en adénome gastrique de type intestinal. Les études de Maloum et Roy ont donc permis d'établir que c'est bien la perte de la signalisation des BMP dans le compartiment mésenchymateux et non dans l'épithélium qui permet l'initiation de la polypose gastrique observée dans les modèles ayant une délétion plus générale de la signalisation (Bleuming et al. 2007). Cependant, bien que le modèle murin *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} permet de recréer *in vivo* la cascade de la carcinogenèse gastrique de type intestinal jusqu'au stade d'adénome, il ne permet pas d'étudier le processus de la carcinogenèse en entier. En effet, à partir de l'âge de 90 jours, les polypes gastriques des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} sont bloqués au stade d'adénome et aucune progression n'est observée chez des souris plus âgées. Cette observation illustre bien la théorie voulant que la formation de tumeurs se produise à la suite d'une accumulation de modifications génétiques (Hao, Wang, et Di 2016), donc qu'il serait nécessaire d'ajouter une seconde altération pour observer le développement de carcinomes gastriques dans le contexte des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. Dans le but de déterminer quel gène entravait la progression des tumeurs des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} âgées de 90 jours, nous avons remarqué qu'il y avait une accumulation nucléaire de p53 dans les cellules épithéliales gastriques. Il est fréquent de voir une accumulation de p53 dans les tumeurs de plusieurs tissus et ceci peut survenir soit en réponse à un stress cellulaire ou en présence d'une mutation de *Trp53* qui génère une protéine plus stable que celle de type sauvage (Yue et al. 2017). Dans notre cas, le test utilisé ne permet pas de déterminer l'état de p53 dans ces tumeurs puisque l'anticorps utilisé pour l'IHC est polyclonal et peut donc détecter p53 comme p53 muté. De plus, le

gène *TP53* est un des gènes les plus impliqués dans la carcinogenèse gastrique et des mutations ou différences d'expression sont surtout observées dans les tumeurs de type intestinal (Maleki et Röcken 2017).

Dans la littérature scientifique, la grande majorité des études démontrant l'implication de différents gènes dans la carcinogenèse se contentent d'analyser un seul gène à la fois. Ces études utilisent des lignées cellulaires ou des modèles murins dont seul le gène d'intérêt est altéré afin d'identifier les effets cellulaires et physiologiques de cette altération. Cependant, ces modèles restent très loin de la réalité des tumeurs où plusieurs gènes sont altérés au sein d'une même cellule cancéreuse. Quelques rares études se sont pourtant intéressées à l'effet de la combinaison de deux altérations géniques dans l'analyse de différents cancers et la plupart ont observé un effet synergique dans leurs modèles double mutants. Par exemple, dans les conduits biliaires, l'oncogène *K-ras*^{v12} a peu d'effet sur l'épithélium et la perte de *PTEN* mène au développement de lésions néoplasiques de bas grade, mais en combinant ces deux éléments, les auteurs ont observé le développement de carcinomes invasifs (Marsh et al. 2013). Plusieurs autres études ont elles aussi observé un effet synergique entre différents acteurs de la carcinogenèse comme *p53* et *E-cadhérine* ou *MET* dans le sein (Derksen et al. 2006; Knight et al. 2013), *L1CAM* et *HER2* dans l'endomètre (Abdel Azim et al. 2017), *RAD51C* et *p53* dans les glandes sébacées (Tumiati et al. 2015) et *PIK3CA* et *APC* dans le côlon (Deming et al. 2014). Ceci démontre que des études analysant l'implication de plus d'un gène dans les différentes étapes de la carcinogenèse sont nécessaires à la compréhension approfondie de la dynamique tumorale et ainsi à l'élaboration de traitements de médecine personnalisée. Un point en commun qu'ont plusieurs de ces études est que la modification du gène cible se trouve toujours soit dans les cellules épithéliales ou dans l'entièreté du tissu, mais jamais dans le compartiment mésenchymateux.

Hors, le rôle du mésenchyme dans la polypose a été largement démontré et plusieurs études de notre laboratoire ont mis en évidence sa capacité à initier la néoplasie dans le système gastrointestinal. Alors, pour étudier la progression des adénomes gastriques *Bmpr1a*^{ΔFox11}, nous avons croisé ces souris avec une souris *Trp53*^{null}. Ce modèle murin comporte donc une

invalidation de la voie des BMP dans le mésenchyme (télocytes FOXL1⁺) qui favorise l'initiation de la polypose et une délétion de *Trp53* dans tous les tissus qui permet une progression vers le carcinome invasif. Afin de soustraire la réponse antitumorale générée par l'épithélium gastrique en présence d'un mésenchyme délété en signalisation BMP, une délétion de *Trp53* dans l'épithélium seulement aurait été un modèle idéal. Cependant, le système Cre-loxP est déjà utilisé pour la délétion de *Bmpr1a* dans les télocytes et il est impossible avec ce système de déléter deux gènes différents avec l'utilisation d'une recombinase sous le contrôle de deux promoteurs différents. C'est pourquoi la souris *Trp53*^{null} restait la meilleure alternative pour invalider *Trp53* dans notre modèle.

À la suite de l'analyse des tumeurs gastriques *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}, il est possible d'affirmer que la voie mésenchymateuse des BMP et de p53 agissent en synergie dans la carcinogénèse gastrique. En effet, la perte seule de la voie des BMP dans les télocytes FOXL1⁺ mène au développement d'adénomes chez des souris de 90 jours et la perte de *Trp53* à lui seul ne permet pas l'initiation de la néoplasie gastrique (Jacks et al. 1994), alors que leur combinaison permet la progression des tumeurs vers le carcinome invasif chez des souris aussi âgées de 90 jours. Bien que cette progression soit observable au niveau histologique et soit confirmée par analyse histopathologique, celle-ci se reflète de la même façon dans l'analyse du transcriptome des tumeurs gastriques. De manière générale, la comparaison du transcriptome des tumeurs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} avec celui des tumeurs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} de l'autre révèle un dérèglement de plusieurs mécanismes tissulaires et cellulaires associés à la progression tumorale ainsi que la modulation de certains gènes impliqués dans le cancer gastrique. De ce fait, parmi les gènes étant modulés exclusivement dans les tumeurs des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}, nous retrouvons *Arid1a*, gène dont la perte de transcription dans l'estomac est observée seulement à partir du stade de carcinome et non dans les adénomes et autres stades précoces (Han et al. 2016; Kim et al. 2017). De plus, une diminution de la transcription d'*Adnp*, *Cav1*, *Ephb1*, *Flna* et *Nfl* ainsi qu'une augmentation de *Ilf2* sont toutes des modulations connues pour être présentes dans des tumeurs gastriques de stade tardif ou lors de la formation de métastases (Jo et al. 2016; Sun et al. 2014; J. D. Wang et al. 2008; S. Wang et al. 2016; Yin et al. 2017; Zhao et al. 2013). D'autre part, le tissu des adénomes gastriques de type intestinal est hautement différencié et

est composé des structures tubulaires ressemblant aux cryptes du côlon alors que celui des carcinomes gastriques de type intestinal est plutôt peu différencié, caractéristique permettant aux cellules cancéreuses d'envahir la *lamina propria* et favorisant la formation de métastases. Des études analysant des tumeurs gastriques à différents stades ont permis de corrélérer plusieurs gènes avec le niveau de différenciation de ces tumeurs. Certains de ces gènes sont modulés en ce sens dans les carcinomes *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} tels *Adam15*, *Arid1a*, *Cdh1* et *Ptk7* dont l'expression est diminuée comparativement aux adénomes (Han et al. 2016; Kim et al. 2017; Lin et al. 2012; Toquet et al. 2012; Q. Wang et al. 2016). Tous ces éléments sont en concordance avec les observations qui ont été effectuées au niveau histologique, et par conséquent confirment que la perte de *Trp53* dans les adénomes gastriques *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} mène bel et bien à la progression vers le stade de carcinome.

Malgré tout, ces marqueurs de progression et d'état peu différencié ne permettent pas d'expliquer les mécanismes cellulaires et tissulaires qui ont permis la formation de ces carcinomes invasifs. Au niveau cellulaire, les analyses avec les logiciels IPA et GSEA ont soulevé des signatures d'instabilité du cytosquelette, une perte de la polarité cellulaire liée à une diminution des adhésions cellule-cellule et cellule-matrice dont les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les adhésions focales. Hors, plusieurs de ces signatures ont un point en commun et font partie de processus essentiels à la progression tumorale et la formation de métastases : la migration et l'invasion. Dans les carcinomes, le mode de migration le plus étudié est l'EMT qui permet aux cellules tumorales épithéliales d'adopter une forme plus allongée et ainsi envahir la *lamina propria*. Cependant, plusieurs autres types de migration existent et donc une tumeur primaire peut former des métastases sans l'EMT (Pastushenko et Blanpain 2019). De ce fait, les carcinomes *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent des signatures transcriptomiques de perte de polarité, première étape de la migration cellulaire (Friedl et Wolf 2010; Lo et Zhang 2018). Cette perte de polarité se traduit par la diminution de l'expression des gènes liés au complexe de polarité apicale Par6 (*Pard6b*, *Pard3* et *Prkca*) et du complexe de polarité basolatérale Scribble (*Scrib*, *Llg1*, *Llg2*, *Dlg1* et *Dlg5*). Cette perte de polarité entraîne une diminution de la transcription des gènes liés aux jonctions cellule-cellule nécessaire à l'EMT (Pal et al. 2018), signature observée dans les estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}. En effet, les analyses

du transcriptome montrent une diminution de l'expression des gènes associés aux jonctions serrées (*Pard3*, *Cldn5*, *Tjp1*, *Rac1* et *Plekha7*), aux jonctions adhérentes (*Cdh1*, les caténines *Ctnd1* et *Ctnna1*, *Vcl*, *Fmn1*, *Zyx* et *Arp2/3*) ainsi qu'aux desmosomes (*Dsg2*, *Jup*, *Pkp3-4* et *Dsp*). Donc, la perte des adhésions cellule-cellule permet de supposer que les cellules tumorales *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} migrent davantage de manière individuelle que collective.

Lors du processus d'EMT, la cellule épithéliale doit à la fois acquérir des caractéristiques mésenchymateuses et perdre ses attributs épithéliaux. L'analyse du transcriptome des carcinomes gastriques montrent bel et bien une diminution de l'expression des gènes associés aux caractéristiques épithéliales citées précédemment (polarité, jonctions serrées, jonctions adhérentes et desmosomes). Cependant, aucun gène associé à l'EMT n'est augmenté, que ce soit des gènes caractéristiques des cellules mésenchymateuses (*Cdh2*, *Vim*) ou même des gènes répresseurs de la E-cadhérine (*Twist1*, *Snai1-2*, *Zeb1-2* et *Prrx1*) (Pastushenko et Blanpain 2019). De plus, l'analyse du transcriptome des tumeurs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} suggère une diminution de l'adhésion cellule-matrice, adhésion pourtant nécessaire au phénotype mésenchymateux (Palecek et al. 1997; Paňková et al. 2010). Cette perte d'interaction des cellules épithéliales tumorales avec la membrane basale se traduit par une diminution de l'expression des gènes associés aux hémidesmosomes et aux adhésions focales. En effet, les gènes *Itga6* et *Itgb4* codant pour l'intégrine α6β4 et composant les desmosomes montrent une diminution de leur expression dans les tumeurs gastriques *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}. Les gènes codant pour les protéines adaptatrices des hémidesmosomes (*Plec* et *Dst*) de même que ceux codant pour certains ligands des intégrines (*Lama3-5*, *Lamb1-2-3* et *Lamc1-2*) voient leur expression diminuée. De plus, l'expression des gènes liés aux adhésions focales comme les intégrines (*Itga1-3-5-6*, *Itgb3-4*), *Tln1-2*, *Vcl* et *Pxn* est aussi diminuée. Ainsi, l'invasion de la *lamina propria* par les cellules tumorales gastriques chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} n'est pas due à une migration majoritairement de type mésenchymateuse puisqu'aucun marqueur d'EMT n'est augmenté et que plusieurs articles ont montré qu'une forte adhésion à la MEC par les adhésions focales est essentielle à ce type de migration (Palecek et al. 1997; Paňková et al. 2010). Cette invasion serait donc attribuable à une migration de type individuelle

indépendante des adhésions focales, autrement dit une migration de type amiboïde qui est caractérisée par une faible adhésion cellule-cellule et cellule-matrice (Paňková et al. 2010). Comparativement à l'EMT, le mode de déplacement amiboïde permet une migration plus rapide et indépendante des enzymes de dégradation de la MEC (Liu et al. 2015).

Il est connu que la perte de *Trp53* déclenche une augmentation de la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Jolly et al. 2019). Cependant, le type de migration impliqué semble être tissu et contexte dépendant (Muller, Vousden, et Norman 2011). Certaines études ont démontré que la perte de p53 favorise la transition vers le type amiboïde (Gadea et al. 2007).

Hors, les tumeurs sont de composition souvent hétérogène et plusieurs études ont d'ailleurs montré que l'invasion de la *lamina propria* peut être causée par plusieurs types de migrations à la fois et que ces cellules cancéreuses peuvent facilement changer de mode migratoire selon leur environnement (Hecht et al. 2015; Liu et al. 2015; Paňková et al. 2010). Cette plasticité serait même une stratégie migratoire hautement efficace puisque les cellules EMT et amiboïdes ont la capacité d'établir une coopération afin d'optimiser leur invasion (Hecht et al. 2015). De plus, la survie des cellules tumorales, malgré une diminution importante de l'adhésion par les intégrines à la MEC, est un signe de résistance à l'anoïkose, le mécanisme le plus puissant contre la formation des métastases. Aussi, il a été démontré que les cellules invalidées pour p53 survivent plus facilement à la perte de la signalisation des intégrines (Ilic et al. 1998) et qu'une combinaison de la perte de p53 avec une diminution de la E-cadhérine induit une résistance à l'anoïkose (Yu et Elble 2016).

L'analyse du transcriptome des tumeurs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null} suggère de plus une perméabilité accrue des vaisseaux sanguins. En effet, plusieurs gènes en lien avec l'étanchéité et les jonctions entre les cellules endothéliales voient leur expression diminuée. Une diminution de la VE-cadhérine (*Cdh5*), présente exclusivement dans les jonctions adhérentes des cellules endothéliales, est un signe d'une vascularisation fenestrée qui facilite l'intravasation des cellules immunitaires mais aussi des cellules cancéreuses (Chrifi et al. 2019; F. Van Roy 2014). D'autres gènes liés à la fonction barrière des cellules

endothéliales sont aussi régulés à la baisse comme des composantes des jonctions serrées (*Cldn5*), de l'internalisation des cadhérines (*Cmtm4*) et du maintien de la polarité (*Amot* et *Amotl1*). Une diminution des transcrits des laminines composant le microenvironnement des cellules endothéliales est aussi observée (*Lama5* et *Lamc1*).

Tous les éléments précédemment mentionnés nous mènent à déduire que la perte de p53 permet aux tumeurs gastriques de développer les caractéristiques nécessaires à la migration, l'invasion, l'intravasation et la survie en indépendance d'ancrage, tous des processus pouvant mener à la formation de métastases.

Puisque les capacités du suppresseur de tumeur p53 sont attribuables en partie à ses fonctions dans l'arrêt du cycle cellulaire (Solozobova et Blattner 2011) et que les marqueurs de prolifération comme Ki67 et PCNA sont des marqueurs de récurrence et d'un mauvais taux de survie dans l'estomac (N. Li et al. 2015), le taux de prolifération cellulaire des tissus gastriques a été mesuré par le marquage de PCNA. Ces résultats nous montrent que les tumeurs des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} âgées de 90 jours présentent de l'hyperprolifération dans l'épithélium et le mésenchyme de l'estomac glandulaire comparativement aux estomacs contrôles. De plus, plusieurs gènes connus pour réguler la prolifération dans le cancer gastrique sont modulés en ce sens dans l'analyse du transcriptome des polypes *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}. Certains de ces gènes sont impliqués dans le cycle cellulaire (*Cdk4*), sont des facteurs de transcription (*Grhl2*), sont des phosphatases de phospholipides (*Mtmr3*), interagissent avec p53 (*Ing1*) ou sont des gènes cibles de p53 (*PCNA*). Cependant, malgré le fait que les données de transcriptomique montre une signature d'hyperprolifération chez les tumeurs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} comparativement aux tumeurs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, cette tendance n'est pas observée au niveau du tissu à 90 jours par le marquage de PCNA tant chez les cellules épithéliales que mésenchymateuses. Compte tenu qu'en histologie, le nombre de cellules prolifératives n'est pas statistiquement différent avec ou sans *Trp53*, il est possible d'affirmer que la limitation de la progression des adénomes *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} vers un carcinome n'est pas due à un contrôle de la prolifération par p53. Afin de mieux comprendre le rôle de la prolifération dans le développement des tumeurs gastriques, ce même marquage et décompte de PCNA a

été effectué sur des estomacs de souris âgées de 30 jours. Les résultats montrent la même tendance que pour les souris âgées de 90 jours, sauf pour les cellules épithéliales du corps où une augmentation significative de la prolifération est observée entre les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. Alors même au niveau de l'initiation tumorale, la perte de p53 n'induit pas une prolifération accrue dans l'estomac. Ces résultats nous mènent donc à supposer que ce n'est pas la régulation du cycle cellulaire, mais bien une autre fonction de p53 qui limiterait la progression des adénomes gastriques chez nos souris, comme son rôle dans l'anoïkose tel que mentionné plus haut.

Si nous regardons les résultats de la comparaison des transcriptomes des polypes de l'antré des estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, nous remarquons que plusieurs des signatures obtenues sont des signalisations ayant un lien quelconque avec p53. L'une de ces signalisations est celle de la caséine kinase 1 delta (CK1δ), du gène *Csnk1d*, qui est une kinase régulant l'activité de p53. Cette régulation s'effectue soit par phosphorylation activatrice de p53 en N-terminal ou soit en phosphorylant MDM2, ce qui empêche sa liaison à p53 et stabilise donc p53 (Schitteck et Sinnberg 2014). De plus, CD1δ et p53 induisent mutuellement l'expression d'un et l'autre en cas de stress génotoxique, ce qui pourrait expliquer la diminution de l'expression de *Csnk1d* dans les souris invalidées pour *Trp53*. De plus, il a été démontré que les tumeurs intestinales où l'expression de diverses caséines kinases 1 et de *Trp53* est diminuée montrent une invasion plus importante (Schitteck et Sinnberg 2014). Donc, l'expression moindre de *Csnk1d* pourrait expliquer la progression des tumeurs des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null} vers le carcinome invasif. Toujours dans l'analyse du transcriptome des tumeurs gastriques *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null}, l'expression de *Myst2* (aussi appelée *Hbo1*) et de quelques autres gènes en lien avec cette protéine est diminuée. *Myst2* est la sous-unité catalytique d'un complexe protéique composé d'*Ing4-5* et de *Jade1-2-3* qui possède une activité d'histone acétyltransférase (HAT) permettant de moduler l'accès aux gènes lors de la réplication de l'ADN et de l'expression génique. Il a aussi été établi que MYST2 est un co-activateur de la transcription de *Trp53*. Bien que le mécanisme soit encore mal compris, ce complexe est prédit pour agir de concert avec p53. Cependant, il est certain que p53 interagisse directement avec MYST2 lors d'un blocage des fourches de réplication et que cette interaction a pour conséquence d'inhiber son

activité HAT (Iizuka et al. 2008). Parmi les transcrits dont le logiciel GSEA s'est servi pour déterminer une diminution significative de l'expression de *MYST2*, nous retrouvons plusieurs gènes en lien avec le suppresseur de tumeur p53. Certains sont des régulateurs en aval de p53 (*Nfya*), des régulateurs de l'activité même de p53 (*Patz1*, *Usp22*, *Ube3a*, *Adnp*, *Hipk1*, *Brpf3* et *Cand1*), des gènes dont la transcription dépend de p53 (*Ppm1d* et *Rbm25*) ou nécessitent une interaction avec p53 pour leur activité (*Arid1a* et *Phf2*). Ensuite, l'analyse du transcriptome montre une diminution des transcrits en lien avec *Ing1*, un suppresseur de tumeur impliqué dans le cancer gastrique et dans la formation de métastases (X. B. Guo et al. 2011; Lv et al. 2012). En situation normale, l'isoforme p33 d'ING1 coopère avec p53 afin d'activer p21/WAF et ainsi limiter la croissance (Oki et al. 1999). L'activité d'ING1 en tant que cofacteur de p53 permet aussi de réguler le cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation des dommages à l'ADN, tous des éléments impliqués dans la formation de tumeurs et pouvant expliquer la progression des tumeurs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} en carcinomes chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null}.

La comparaison du transcriptome des tumeurs des estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} avec le logiciel GSEA a aussi soulevé l'implication de différentes voies de signalisation connues pour être impliquées dans la carcinogenèse dont une augmentation des cibles de MYC et une diminution de la signalisation HH. L'oncogène *Myc* est connu pour être amplifié dans plusieurs types de cancer et promeut la formation de tumeurs plus agressives et peu différenciées (Khaleghian et al. 2015). L'amplification de *Myc* est présente dans 40% des cancers gastriques et corrèle avec une invasion tumorale profonde et un taux de survie bas (Khaleghian et al. 2015), ce qui pourrait expliquer la progression des tumeurs chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null}. De plus, plusieurs des cibles transcriptionnelles de ce facteur de transcription sont impliquées dans le cancer gastrique. Par exemple, une augmentation d'*Ilf2* ou de *PCNA* sont des marqueurs d'invasion profonde et de métastases aux ganglions lymphatiques (Kuang et al. 2013; Yin et al. 2017), une augmentation de *Gnl3* prédit une mauvaise survie (J. Chen et al. 2015) et une augmentation de *Cdk4* combinée à une perte de p53 promeut l'invasion locale (He et al. 2018). Ensuite, nous avons remarqué que plusieurs protéines régulant la stabilité de MYC sont modulées dans les tumeurs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Trp53*^{null}. En effet, l'expression de plusieurs calpaïnes qui

inactiver MYC en le clivant est diminuée (*Capn1*, *Capn2*, *Capn5*). Il en va de même pour d'autres gènes codant pour des protéines ayant pour fonction de déstabiliser MYC et favoriser sa dégradation (*Trpc4ap*, *Trim32*, *Fbxw8* et *Nedd4*). Ainsi, une perte des régulateurs négatifs de MYC diminue sa dégradation et permet donc une accumulation protéique de MYC, ce qui pourrait expliquer l'expression plus élevée de ses gènes cibles. De plus, il est possible de faire un lien entre la perte de *Trp53* et l'augmentation de l'activité de MYC. En effet, Solozobova et collaborateurs ont démontrés que la perte de p53 provoque une augmentation de l'expression de *cMyc* (Solozobova et Blattner 2011), ce qui est en concordance avec une autre étude qui a montré que l'amplification de *cMyc* est généralement accompagnée par la perte de *Trp53* dans les tumeurs gastriques (Chivu-Economescu et al. 2018). Donc, la perte de p53 dans les tumeurs gastriques provoquerait une augmentation de l'activité de cMYC, un oncogène favorisant la progression tumorale des adénomes *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} en carcinomes invasifs.

Finalement, une diminution de la signalisation HH et des gènes associés au récepteur *smoothed (Smo)* a été identifiée par le logiciel GSEA dans les tumeurs gastriques des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} âgées de 90 jours. Il n'est pas surprenant de voir une dérégulation de ces signalisations chez ces souris puisque la voie Sonic Hedgehog (SHH) est cruciale au maintien de l'homéostasie et à la réparation tissulaire de l'estomac en plus de réguler la fonction sécrétrice des glandes gastriques (Wessler et al. 2017). De plus, la signalisation SHH sert entre-autres à la communication entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses puisque le ligand est exprimé et sécrété par l'épithélium et que les cellules mésenchymateuses expriment les récepteurs PTCH et SMO (Merchant et Saqui-Salces 2014). Dans la carcinogenèse gastrique, la signalisation HH, plus particulièrement celle du ligand SHH, est impliquée dès la formation de lésions préneoplasiques. Puisque SHH est sécrété principalement par les cellules pariétales gastriques, les étapes d'initiations du cancer gastrique comme l'atrophie des cellules pariétales provoque une importante diminution de la signalisation HH dans l'estomac (Merchant et Saqui-Salces 2014). Comme le gradient de ligand SHH sécrété par les cellules pariétales est important pour la différenciation des cellules sécrétrices de l'estomac, la perte des cellules pariétales altère la différenciation des cellules épithéliales gastriques et peut provoquer l'apparition de lésions

prénéoplasiques (Wessler et al. 2017), mais cela sera discuté en détails plus loin. Cependant, comme le séquençage de l'ARN a été effectué sur les tumeurs de l'antra de l'estomac et que les cellules pariétales se situent exclusivement dans le corps de l'estomac, la perte des cellules pariétales ne peut pas expliquer la diminution de signalisation HH observée dans l'analyse du transcriptome. Mais, il a été observé que la signalisation SHH est diminuée aussi pendant la métaplasie intestinale (MI), processus pré-cancéreux qui se produit autant dans l'antra que le corps de l'estomac (Akyala et Peppelenbosch 2018). Cette diminution serait due à une inhibition de la transcription de *Shh* par CDX2, un des facteurs de transcription le plus important dans le développement de la MI (Hiroyuki Mutoh et al. 2010). Bien que Roy et collaborateurs ont montré que les estomacs des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} âgées de 90 jours présentent déjà des signes de MI au stade de l'adénome (S. A. B. Roy et al. 2016), les auteurs n'ont pas précisé l'avancement de cette néoplasie. De plus, les résultats obtenus sur des souris âgées de 30 jours nous montrent que la MI survient de manière précoce dans les estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} (sujet abordé en détail plus loin dans la discussion) et l'analyse du transcriptome des souris âgées de 90 jours montre une augmentation du *lysozyme* et une diminution de *Muc6* chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}, deux gènes impliqués dans la MI. Nous pouvons donc supposer que la MI des adénomes *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} s'est aggravée avec la progression vers le carcinome chez les estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}, ce qui expliquerait la diminution des signalisations HH et SMO observée.

En résumé, la perte de p53 et de la signalisation mésenchymateuses de la voie des BMP a un effet synergique sur la carcinogenèse gastrique puisque les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} âgées de 90 jours présentent des carcinomes invasifs, comparativement à leur congénères *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} qui montrent des adénomes. Ainsi, en comparant les tumeurs des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} à celles des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, il a été possible de déterminer que les mécanismes permettant cette progression sont associés à la diminution d'expression de suppresseurs de tumeurs liés au cancer gastrique de stade avancé, la perte de polarité et des jonctions cellule-cellule et cellule-matrice favorisant une migration rapide des cellules cancéreuses et les modulations à la hausse de la signalisation MYC et à la baisse de la signalisation HH. Tous ces éléments mettent en évidence une augmentation de l'agressivité

tumorale et un risque accru de formation de métastases, et ce dès l'âge de 90 jours chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}.

Maintenant que nous avons démontré que *Trp53* est un des facteurs limitant de la progression des adénomes gastriques des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} à 90 jours et qu'enlever ce frein mène au développement de carcinomes invasifs, il serait intéressant de comprendre les évènements précoces menant à cette initiation tumorale. Nous avons analysé les estomacs des mêmes souris utilisées précédemment, mais cette fois-ci à l'âge de 30 jours. D'abord, dès l'observation macroscopique des estomacs, il a été possible d'observer que la perte de *Trp53* a des effets précoces sur le développement de la néoplasie puisque les estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} ne présentent aucun polype contrairement à ceux *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}. Cependant, au niveau histologique, l'architecture tissulaire n'est pas aussi perturbée que nous laissait présager les observations macroscopiques. Tant les estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} que *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} montrent un épaississement de la muqueuse et une augmentation du compartiment mésenchymateux semblables, alors que les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent en plus un allongement du fovéole et une légère inflammation. Notre laboratoire a déjà rapporté un accroissement du compartiment mésenchymateux chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} âgées de 30 jours, mais cela n'avait jamais été étudié en combinaison avec la perte de *Trp53*.

Puisque la taille du compartiment mésenchymateux ne semble pas être différente avec ou sans *Trp53*, nous nous sommes demandé si l'identité des cellules mésenchymateuses n'était pas affectée par cette perte. En effet, même si la quantité de cellules mésenchymateuses ou de MEC reste la même, une augmentation du ratio myofibroblastes-fibroblastes peut signifier la transformation de certaines cellules mésenchymateuses en CAF. Les CAF sont des éléments décisifs du microenvironnement épithélial de par leur rôle important à différentes étapes de la carcinogenèse, tant en favorisant l'initiation tumorale qu'en augmentant le potentiel métastatique (Murata, Mekada, et Hoffman 2017; Nissen, Karsdal, et Willumsen 2019). Le marquage de α SMA et vimentine ayant permis de quantifier le nombre de fibroblastes et myofibroblastes par glande gastrique a permis de relever une différence statistique en comparant les estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et contrôles ainsi que

Bmpr1a^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} et contrôles, mais pas en comparant les tissus *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. Donc, tant les estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} que *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} ont la possibilité de comporter des CAF, mais leur nombre n'est pas statistiquement différent entre les deux souris mutantes. Ceci corrobore d'ailleurs avec les résultats obtenus lors de l'analyse du transcriptome des souris âgées de 90 jours puisqu'aucun marqueur de CAF (*Fsp1*, *Fap*, *Acta1*, *Tnc*) n'est augmenté dû à la perte de p53 (Nissen, Karsdal, et Willumsen 2019). Alors, puisque le nombre de myofibroblastes reste inchangé à 30 jours et que les marqueurs des CAF ne sont pas augmentés à 90 jours, il nous est impossible de supposer qu'une augmentation du nombre de CAF est responsable de l'initiation précoce et du stade avancé observé chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}. Cependant, compte tenu que les CAF sont une population hétérogène d'origine diverse, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les CAF de ces deux lignées de souris soient de nature différente, que leur microenvironnement qu'ils remodelent ne soit pas du tout le même et donc que leur impact sur les cellules épithéliales soit tout aussi distinct (Bussard et al. 2016; Nissen, Karsdal, et Willumsen 2019).

Un des facteurs qui a été démontré pour favoriser la conversion des fibroblastes en myofibroblastes est une accumulation d'acide hyaluronique (HA) dans la MEC (Theocharis, Manou, et Karamanos 2019). McCarthy et collaborateurs ont aussi démontré que les CAF se servent de la HA pour la migration et l'invasion et que la HA favorise aussi la migration des cellules épithéliales cancéreuses, ce qui contribue à la formation de tumeurs agressives (McCarthy, El-Ashry, et Turley 2018). Situé tant sur les cellules mésenchymateuses qu'épithéliales, le principal récepteur de la HA est CD44. Important acteur de l'adhésion cellule-matrice, CD44 est présent dans les cellules souches LGR5 et une augmentation de son marquage épithélial est associé à la présence de CSC (Hirata et al. 2013; Hoffmann 2012). Dans le cancer gastrique, l'augmentation de CD44 corrèle avec le type intestinal et, tout comme pour son ligand, favorise l'invasion et la formation de métastases (Hirata et al. 2013; Nosrati et al. 2014). Le marquage de l'isoforme standard de CD44 (CD44s) dans les estomacs des souris âgées de 30 jours a révélé une augmentation du marquage épithélial et mésenchymateux chez les souris mutantes comparativement aux contrôles et cette augmentation est plus importante chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}

que *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. Cependant, ce ne sont pas toutes les cellules CD44⁺ de l'estomac qui sont des CSC et c'est plutôt la combinaison du marquage de CD44 et de CD133 qui identifie les CSC (Hirata et al. 2013). Cependant, une augmentation du marquage de CD44 dans le tissu gastrique est un signe d'une augmentation du nombre de CSC dans les tumeurs, donc la perte de *Trp53* dans les estomacs des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} permet la formation d'un plus grand nombre de CSC gastriques dès l'âge de 30 jours. De plus, l'augmentation du marquage de CD44s au niveau du mésenchyme est probablement signe d'un changement de dynamique chez les cellules mésenchymateuses comme par exemple, une plus grande motilité (Cichy et Puré 2003). Cependant, bien qu'une augmentation générale de CD44 donne des informations pertinentes sur le processus cancéreux, c'est plutôt un dérèglement des différents variants de CD44 qui est le plus révélateur (Prochazka, Tesarik, et Turanek 2014). L'un des variants le plus étudié dans le cancer gastrique et qui est augmenté de façon importante tant de manière précoce que tardive est CD44v6 (da Cunha et al. 2010). Nous avons donc évalué la présence de CD44v6 dans les estomacs de nos souris et avons obtenu un résultat similaire à celui de CD44s au niveau de l'épithélium, mais avec une augmentation beaucoup plus importante lorsque combiné à la perte de *Trp53*. En effet, chez les estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, CD44v6 marque les cellules épithéliales de la base de la glande jusqu'à la partie inférieure de l'isthme alors que chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}, ce marquage est détecté jusqu'au fovéole. Le co-marquage de CD44v6 et Ki67 nous a aussi permis d'identifier les potentielles CSC prolifératives. Les cellules CD44⁺/Ki67⁺ sont absentes des estomacs contrôles, sont présentes en faible quantité chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et forment une partie significative du tissu gastrique chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}. Puisque les CSC prolifératives sont des actrices importantes de la croissance tumorale (Lathia et Liu 2017), il est fort possible que cette augmentation importante du nombre de CSC prolifératives CD44v6⁺ explique pourquoi des polypes sont observés dans les estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} à 30 jours et non pas chez leurs congénères *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. Ces observations concordent d'ailleurs avec plusieurs articles relatant les capacités de p53 de limiter la formation ou la prolifération des CSC dans différents tissus afin de bloquer l'initiation tumorale (Charni et al. 2016; Powell, Piwnica-worms, et Piwnica-worms 2014).

Ensuite, nous avons évalué à quel stade de la carcinogenèse gastrique se situent les tumeurs des estomacs ayant la double délétion de la voie des BMP dans les télocytes FOXL1⁺ et de *Trp53*. Nous avons analysé le statut des cellules pariétales du corps puisqu'il s'agit de la première lésion préneoplasique observable dans l'estomac. Le marquage et dénombrement des cellules pariétales a permis d'établir que la perte de la signalisation télocytaire des BMP était suffisante à elle seule pour induire une diminution du nombre de cellules pariétales, mais que la combinaison avec l'inactivation de *Trp53* provoque une atrophie plus sévère de ces cellules. La perte des cellules pariétales chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} a été rapportée par notre laboratoire chez ces mêmes souris âgées de 30 et 90 jours (S. A. B. Roy et al. 2016) et est conforme à ce qui est décrit dans la littérature en cas d'inhibition de la signalisation des BMP (Todisco 2017). Cependant, la contribution de p53 dans l'atrophie des cellules pariétales n'a jamais été documentée à ce jour et aucun mécanisme connu ne permet d'expliquer ce phénotype. Dans le tissu gastrique, la perte des cellules pariétales n'est pas sans conséquence. Principales sécrétrices de SHH, leur atrophie signifie une perte du gradient de ligands SHH essentiel à la différenciation adéquate des cellules sécrétrices gastriques (Wessler et al. 2017). En effet, une grande concentration de SHH a pour conséquence d'inhiber la différenciation des cellules à mucus de surface jusqu'à l'extrémité supérieure de la glande et participe à la différenciation des cellules à mucus du collet en cellules zymogéniques lors de leur migration vers le bas de la glande. Un dérèglement de la différenciation des cellules zymogéniques est à l'origine d'un autre type de lésion préneoplasique gastrique : le SPEM. Roy et collaborateurs ont d'ailleurs rapporté la présence de SPEM dans les estomacs des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} âgées de 90 jours (S. A. B. Roy et al. 2016) et nous avons donc voulu déterminer si le même phénotype était présent chez ces souris dès l'âge de 30 jours. Le marquage des cellules à mucus du collet avec la lectine GS-II et des cellules zymogéniques avec GIF nous a permis de déterminer que seules les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} montrent une initiation précoce de SPEM, mais pas un phénotype complet. Sachant que la perte des cellules pariétales à elle seule n'est pas suffisante pour induire le SPEM (Burclaff et al. 2017), cela nous indique que la perte de p53 permet une initiation précoce des lésions préneoplasiques gastriques. En effet, la légère inflammation rapportée dans les analyses histologiques des tissus gastriques en combinaison avec l'atrophie des cellules pariétales pourraient être suffisante au

développement de SPEM et serait en accord avec certaines études (Burclaff et al. 2017). De plus, il a été démontré que les souris invalidées pour *Trp53* dans l'estomac surexpriment *Tff2*, un marqueur des cellules à mucus du collet mais aussi de SPEM (Tu et al. 2009). Tous ces éléments viennent confirmer que la perte de p53 favorise la formation de SPEM puisqu'il favorise l'inflammation et l'augmentation de *Tff2*.

L'étape suivant le SPEM dans la cascade de la carcinogenèse gastrique de type intestinal est la métaplasie intestinale (MI). Des travaux précédents de notre laboratoire ont rapporté la présence de MI dans les estomacs des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} à 90 jours. Afin d'évaluer s'il y a ou non présence de MI dans les estomacs des souris à 30 jours, nous avons d'abord vérifié si les estomacs de nos souris mutantes produisent des mucines acides, mucines normalement absentes de l'estomac. La coloration à l'alcian bleu nous indique que seules les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} à 30 jours expriment ces mucines acides et aucun des autres génotypes. Cependant, malgré la présence de mucines intestinales, nous n'avons pu détecter l'expression de la SI, une enzyme exclusivement intestinale, dans les estomacs de ces souris. Ceci nous indique que les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} ne présentent pas de MI alors que les estomacs des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent un début de MI puisque la muqueuse gastrique a seulement acquis une partie des marqueurs nécessaires au phénotype intestinal. Cependant, une seconde caractéristique de la MI est la perte de l'identité gastrique. Les marquages des estomacs avec la lectine UEA-1 nous a permis d'étudier l'ensemble des mucines sécrétées par les cellules à mucus de surface. Les résultats nous montrent que chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et de manière plus prononcée chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}, il existe un marquage important des cellules à mucus de surface qui ne se limite pas qu'au fovéole mais descend profondément dans la glande. Cette augmentation serait due au fait que les cellules à mucus de surface se divisent et viennent combler l'espace laissé par les cellules pariétales à la suite de leur atrophie (Goldenring et Nam 2010). Cependant, le marquage de la MUC5AC, une des mucines sécrétées par les cellules à mucus de surface, montre un résultat légèrement différent. Effectivement, dans certaines régions, nous observons la même augmentation qu'avec la lectine UEA-1 chez tous les génotypes de souris. Mais dans certaines régions néoplasiques des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null}, la MUC5AC est presque totalement absente. Ainsi, les souris

Bmpr1a^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent à l'âge de 30 jours une initiation de la MI accompagnée d'une légère perte des caractéristiques gastriques, donc il y aurait présence de MI incomplète chez ces souris. Chez l'humain, la MI n'est pas à prendre à la légère puisqu'elle augmente de 25 fois les chances de développer une dysplasie de bas grade dans les deux ans et demi suivant le diagnostic (D. Li et al. 2016). Ainsi, nous pouvons affirmer que puisque les estomacs des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent une atrophie des cellules pariétales importante, une initiation de SPEM et de MI incomplète alors que leurs congénères *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} ne montrent qu'une légère atrophie des cellules pariétales, la perte de *Trp53* permet l'initiation précoce de la carcinogenèse gastrique.

10. CONCLUSION

En résumé, la communication entre le compartiment épithélial et mésenchymateux est d'une importance cruciale et une dérégulation de cette dynamique peut entraîner le développement de pathologies dont le cancer. Notre laboratoire a démontré l'importance de la signalisation BMP dans les télocytes FOXL1⁺ dans l'initiation de la polypose gastrique et ce présent mémoire avait pour but d'étudier davantage les étapes tardives de la carcinogenèse gastrique. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle murin combinant une double délétion de *Bmpr1a* dans les télocytes FOXL1⁺ et de *Trp53* dans tous les tissus. L'analyse des estomacs à 90 jours nous a permis de déterminer que les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} développent des carcinomes invasifs et qu'il existe donc une synergie entre la signalisation des BMP et p53 dans la carcinogenèse gastrique. Les analyses du transcriptome ont révélé une modulation des marqueurs de tumeurs gastriques peu différenciées et aux stades tardifs. Une diminution de l'expression des gènes associés à la polarité, aux jonctions cellule-cellule et cellule-matrice pointent vers une migration rapide de type amiboïde ainsi que la présence de vaisseaux sanguins plus perméables permettant l'intravasation des cellules tumorales. Nous avons aussi mis en évidence l'implication de signalisations associées au cancer comme la signalisation MYC et HH. L'analyse des estomacs de 30 jours a permis d'établir que la perte de p53 permet une initiation précoce de la polypose puisque les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} présentent une perte des cellules pariétales plus importante, de SPEM et une MI incomplète accompagnée d'une perte des mucines gastriques en zones dysplasiques. Ce projet a donc permis de comprendre davantage la dynamique tissulaire gastrique en plus d'établir l'existence d'une synergie entre la signalisation télocytaire des BMP et p53 dans l'initiation et la progression de la carcinogenèse gastrique.

11. PERSPECTIVES

Pour mener ce projet plus loin, il serait intéressant en premier lieu de comprendre le statut de p53 dans les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. L'accumulation observée par IHC ne nous permet pas de savoir si ce dernier est de type sauvage ou muté. De plus, évaluer l'expression de certains gènes cibles classiques ou ceux responsables de la stabilité de p53 comme p21 ou MDM2 permettrait de dresser un portrait plus détaillé de son rôle dans le maintien des tumeurs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} au stade d'adénome. Plusieurs autres questions restent à élucider dans ce projet, notamment comment la perte de *Bmpr1a* dans les télocytes FOXL1⁺ engendre un phénotype néoplasique aussi marquant dans l'épithélium et de quelle nature est la pression exercée par le mésenchyme réactif sur l'épithélium sain. Pour répondre à ces questions, il serait judicieux de regarder du côté des marques épigénétiques des cellules épithéliales gastriques. L'hyperméthylation est entre-autres un des aspects qui semble être bien connu de la littérature et jouer un rôle particulièrement important dans le cancer gastrique. De plus, la grande majorité des gènes de l'analyse du transcriptome sont modulés à la baisse et pourraient donc être hyperméthylés. Cependant, pour faire cette analyse, nous avons besoin d'isoler seulement les cellules épithéliales du tissu gastrique. Pour ce faire, nous pourrions utiliser la culture d'organoïdes gastriques murins à partir de tissu sain et de polypes *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, technique mise au point au cours de ma maîtrise.

En utilisant toujours la culture d'organoïdes d'estomacs murins, il serait intéressant de cultiver des organoïdes de tumeurs d'estomacs *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{null} pour la première fois et ainsi de les comparer à ceux provenant d'estomacs sains et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. De plus, les organoïdes *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} en combinaison avec un inhibiteur de p53 comme la pifithrin-α pourrait nous permettre d'éliminer p53 dans l'épithélium seulement, épithélium qui a été préalablement conditionné par un mésenchyme réactif. Ceci nous rapprocherait donc davantage du modèle murin idéal *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Trp53*^{ΔIEC} qui nous est malheureusement impossible d'obtenir avec le système de recombinaison Cre-loxP. L'utilisation d'un inhibiteur de p53 serait aussi un grand avantage pour déterminer si les changements apportés par la perte de p53 sont de nature réversibles ou irréversibles et donc pourrait mener vers une avenue thérapeutique possible.

Ensuite, il serait pertinent d'étudier les télocytes FOXL1⁺ dans le tissu gastrique murin puisqu'aucun article ne s'y est encore attardé à ce jour chez la souris ni chez l'humain. Comme il est difficile de travailler avec les anticorps contre FOXL1, je propose d'utiliser la souris mTmG combinée avec la souris *Foxl1-Cre* que nous possédons déjà afin d'observer les cellules exprimant FOXL1. De cette façon nous pourrions localiser les télocytes FOXL1⁺ dans la muqueuse gastrique et déterminer leur identité avec différents marqueurs de cellules mésenchymateuses (vimentine, α -SMA, CD34, PDGFR α , GLI1). Nous pourrions aussi déterminer comment ceux-ci réagissent en situation pathologique dans les souris *Bmpr1a* ^{Δ Foxl1} et *Bmpr1a* ^{Δ Foxl1}; *Trp53*^{3null} âgée de 30 et de 90 jours afin d'expliquer les phénotypes observés. En complément à ces expériences, une analyse de la MEC par spectroscopie de masse serait un atout considérable afin de comprendre en détail quelles sont les molécules de la MEC qui sont modulées par la perte de la signalisation télocytaire des BMP. Cela nous permettrait de comprendre davantage quelles modifications du microenvironnement tissulaire joue un rôle clé dans la polypose et la carcinogenèse.

Concernant l'analyse de l'initiation de la néoplasie à 30 jours, il serait nécessaire de caractériser plus en profondeur les différents marqueurs de MI (SI, CDX2, TFF3, MUC2, LYZ) par marquage sur tissu (IF, IHC ou western blot) ou par RT-qPCR. Il serait aussi intéressant d'analyser d'autres mucines gastriques, plus précisément celles sécrétées par les cellules à mucus du collet (MUC6) puisque seulement celles des cellules à mucus de surface ont été analysées dans ce mémoire.

Également, vérifier la relevance biologique de plusieurs phénomènes soulevés par l'analyse du transcriptome des tumeurs gastriques serait pertinent. Ceci permettrait de confirmer l'impact des modulations observées et nous donnerait aussi de plus amples détails sur les modifications biologiques prédites comme la diminution de la polarité ou des jonctions cellulaires, le type de migration des cellules tumorales et l'augmentation de perméabilité des vaisseaux sanguins. Finalement, vérifier la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques, le foie ou les poumons chez les souris *Bmpr1a* ^{Δ Foxl1}; *Trp53*^{3null} âgées de 90

jours permettrait de déterminer l'ampleur de la synergie entre la signalisation BMP et p53 en précisant le stade des tumeurs gastriques de ces souris.

12. REMERCIEMENTS

Tout d'abord, merci du fond du cœur à la P^{re} Nathalie Perreault de m'avoir accueillie dans son laboratoire en tant que stagiaire et ensuite pour la belle aventure qu'est la maîtrise. Merci au Pr François Boudreau d'avoir co-dirigé mes travaux de maîtrise avec intérêt et passion. Vous m'avez montré à voir la recherche autrement. L'ambiance familiale et la dimension humaine de vos laboratoires est quelque chose de rare dans le domaine, c'est une fierté pour moi d'en avoir fait partie.

Merci à la Pre Véronique Giroux d'avoir corrigé avec intérêt mon mémoire en tant que correctrice interne au programme. Merci au Pr Benoît Paquette d'avoir pris le temps de corriger mon mémoire comme évaluateur externe au programme.

Aux membres du laboratoire Perreault, Véronique, Vilcy, Raphaëlle et Ariane, merci d'avoir rendu notre laboratoire de filles si agréable. J'ai particulièrement apprécié l'entraide et les sessions de discussions sur nos projets ou toutes autres facettes de notre vie. Merci pour les très beaux moments passés dans les divers congrès, j'en garde de très beaux souvenirs.

Merci aux membres présents et passés du laboratoire Boudreau, Christine, Jean-Philippe, Romain, Sarah, Mia, Andréanne et Samuel d'avoir mis de la vie dans le labo et pour les petites jasettes durant les temps d'incubation. Un merci plus particulier à Jean-Philippe et Christine qui m'ont initié au fabuleux monde des organoïdes. Merci de ta patience Jean-Philippe lors du développement des protocoles d'organoïdes d'estomac, je garde de beaux souvenirs de nos conversations quasi-philosophiques sur le rôle des télocytes dans l'homéostasie de l'épithélium.

Merci à mes amis qui sont arrivés dans ma vie à l'adolescence (Joanie, Ariane, Julie, Alexandra, Gabrielle, Anne-Marie, Valérie, Émilie) et durant le baccalauréat (Mikaël, Charlotte, Laurence, Camille, Cyntia). Votre support m'a permis de me changer les idées et de me recentrer sur moi-même dans ce parcours complètement fou qu'a été les dernières années.

Finalement un immense merci à mes parents, ma sœur, mes grands-parents et autres membres de ma famille qui m'ont donné la chance de faire des études universitaires. Merci d'avoir pris le temps de vous intéresser à mes recherches même si ce n'était pas toujours facile à comprendre. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenu peu importe les obstacles.

13. LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abdel Azim, Samira et al. 2017. « L1CAM and HER2 Expression in Early Endometrioid Uterine Cancer ». *International Journal of Gynecological Pathology* 36(4): 356-63.
- Ahn, Sangjeong, et Do Youn Park. 2016. « Practical points in gastric pathology ». *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 140(5): 397-405.
- Akyala, Adamu Ishaku, et Maikel P Peppelenbosch. 2018. « Gastric cancer and Hedgehog signaling pathway : emerging new paradigms ». *Genes and Cancer* 9(January).
- Allaire, J.M. Joannie M. J.M. Joannie M. et al. 2016. « Bmp signaling in colonic mesenchyme regulates stromal microenvironment and protects from polyposis initiation ». *International Journal of Cancer* 138(11): 2700-2712.
- Alsafadi, S. et al. 2009. « P53 Family: At the Crossroads in Cancer Therapy ». *Current Medicinal Chemistry* 16(32): 4328-44.
- Aoki, Reina et al. 2016. « Fox11-Expressing Mesenchymal Cells Constitute the Intestinal Stem Cell Niche ». *Cmgh* 2(2): 175-88.
- Arnold, Katrin et al. 2011. « Sox2+ adult stem/progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice ». *Cell Stem Cell* 9(4): 317-29.
- Attieh, Youmna, Danijela Matic Vignjevic, et Danijela Matic. 2016. « The hallmarks of CAFs in cancer invasion ». *European Journal of Cell Biology* 95(11): 493-502.
- Aubrey, Brandon J. et al. 2018. « How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? » *Cell Death and Differentiation* 25(1): 104-13.
- Auclair, Benoit A. et al. 2007. « Bone Morphogenetic Protein Signaling Is Essential for Terminal Differentiation of the Intestinal Secretory Cell Lineage ». *Gastroenterology* 133(3): 887-96.
- Babu, Subramani Durai et al. 2006. « Expression profile of mucins (MUC2, MUC5AC and MUC6) in Helicobacter pylori infected pre-neoplastic and neoplastic human gastric epithelium ». *Molecular Cancer* 5: 1-7.
- Bai, Yun-qing, Hiroshi Yamamoto, Yoshimitsu Akiyama, et Hiroyuki Tanaka. 2002. « Ectopic expression of homeodomain protein CDX2 in intestinal metaplasia and carcinomas of the stomach ». 176: 47-55.

- Balemans, Wendy, et Wim Van Hul. 2002. « Extracellular Regulation of BMP Signaling in Vertebrates : A Cocktail of Modulators ». *Developmental Biology* 250: 231-50.
- Barak, Yaacov, Tamar Juven, Rebecca Haffner, et Moshe Oren. 1993. « mdm2 expression is induced by wild type p53 activity ». *The EMBO Journal* 12(2): 461-68.
- Barcellos-Hoff, Mary Helen, et Shraddha A. Ravani. 2000. « Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells ». *Cancer Research* 60(5): 1254-60.
- Barker, Nick et al. 2010. « Lgr5+ve Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro ». *Cell Stem Cell* 6(1): 25-36.
- Barros, Rita et al. 2010. « Pathophysiology of intestinal metaplasia of the stomach: emphasis on CDX2 regulation. » *Biochemical Society transactions* 38(2): 358-63.
- Bass, Adam J. Thorsson, Vesteynn V?steinn et al. 2014. « Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma ». *Nature* 513(7517): 202-9.
- Batlle, Eduard, et Hans Clevers. 2017. « Cancer stem cells revisited ». *Nature medicine* 23(10).
- Bellini, Marilanda Ferreira et al. 2012. « Alterations of the TP53 gene in gastric and esophageal carcinogenesis ». *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012.
- Bhowmick, N. A. 2004. « TGF- Signaling in Fibroblasts Modulates the Oncogenic Potential of Adjacent Epithelia ». *Science* 303(5659): 848-51.
- Bleuming, Sylvia A. et al. 2007. « Bone morphogenetic protein signaling suppresses tumorigenesis at gastric epithelial transition zones in mice ». *Cancer Research* 67(17): 8149-55.
- Bragdon, Beth et al. 2011. « Bone Morphogenetic Proteins: A critical review ». *Cellular Signalling* 23(4): 609-20.
- Bredemeyer, Andrew J. et al. 2009. « The gastric epithelial progenitor cell niche and differentiation of the zymogenic (chief) cell lineage ». *Developmental Biology*.
- Bremnes, Roy M et al. 2011. « The Role of Tumor Stroma in Cancer Progression and prognosis - Emphasis on Carcinoma-Associated Fibroblasts and Non-small Cell Lung Cancer ». *J Thorac Oncol* 6(1): 209-17.
- Burclaff, Joseph et al. 2017. « Targeted Apoptosis of Parietal Cells Is Insufficient to Induce Metaplasia in Stomach ». *Gastroenterology* 152(4): 762-66.

- Bussard, Karen M. et al. 2016. « Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment ». *Breast Cancer Research* 18(1): 1-11.
- Canadian Cancer Society's Advisory Committee. 2018. *Canadian Cancer Statistics 2018*.
- Chang, Yuqiao et al. 2015. « Multiple immunophenotypes of cardiac telocytes ». *Experimental Cell Research* 338(2): 239-44.
- Charni, Meital, Ronit Aloni-grinstein, Alina Molchadsky, et Varda Rotter. 2016. « p53 on the crossroad between regeneration and cancer ». *Nature Publishing Group* 24(1): 8-14.
- Chen, Jing et al. 2015. « Guanine nucleotide binding protein-like 3 is a potential prognosis indicator of gastric cancer. » *International journal of clinical and experimental pathology* 8(10): 13273-78.
- Chen, Shi et al. 2013. « Clinicopathologic significance of putative stem cell marker, CD44 and CD133, in human gastric carcinoma ». *Journal of Surgical Oncology* 107(8): 799-806.
- Chen, Tao, Xiao Yue Xu, et Ping Hong Zhou. 2016. « Emerging molecular classifications and therapeutic implications for gastric cancer ». *Chinese Journal of Cancer*: 1-10.
- Chivu-Economescu, Mihaela et al. 2018. « New therapeutic options opened by the molecular classification of Gastric cancer ». *World Journal of Gastroenterology* 24(18): 1942-61.
- Cho, Jae Yong et al. 2011. « Gene expression signature-based prognostic risk score in gastric cancer ». *Clinical Cancer Research* 17(7): 1850-57.
- Chrifi, Ihsan et al. 2019. « CMTM4 regulates angiogenesis by promoting cell surface recycling of VE-cadherin to endothelial adherens junctions ». *Angiogenesis* 22(1): 75-93.
- Chu, Shijian, et Mitchell L Schubert. 2012. « Gastric secretion ». *Current Opinion in Gastroenterology*: 587-93.
- Cichy, Joanna, et Ellen Puré. 2003. « The liberation of CD44. » *The Journal of cell biology* 161(5): 839-43.
- Compare, D, A Rocco, et G Nardone. 2010. « Risk factors in gastric cancer ». *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 14(4): 302-8.
- Correa, Pelayo, et M. Blanca Piazuelo. 2012. « The gastric precancerous cascade ». *Journal*

- of Digestive Diseases* 13(1): 2-9.
- Cristescu, Razvan et al. 2015. « Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes ». *Nature Medicine* 21(5).
- da Cunha, Cristiana Branco et al. 2010. « De novo expression of CD44 variants in sporadic and hereditary gastric cancer ». *Laboratory Investigation* 90(11): 1604-14.
- Cutsem, Eric Van et al. 2016. « Gastric cancer ». *The Lancet* 388(10060): 2654-64.
- Darby, Ian A., et Tim D. Hewitson. 2007. « Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis ». *International Review of Cytology*.
- Deming, D. A. et al. 2014. « PIK3CA and APC mutations are synergistic in the development of intestinal cancers ». *Oncogene* 33(17): 2245-54.
- Derksen, Patrick W.B. et al. 2006. « Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis ». *Cancer Cell* 10(5): 437-49.
- Díaz-flores, Lucio et al. 2016. « Behaviour of telocytes during physiopathological activation ». *Seminars in Cell and Developmental Biology* 55: 50-61.
- Dressman, Jennifer B et al. 1990. « Upper Gastrointestinal (GI) pH in Yong, Healthy Men and Women ». *Pharmaceutical Research*.
- El-deiry, Wafik S et al. 1992. « Definition of a consensus binding site for p53 ». *Nature Genetics* 1(april): 45-49.
- Endoh, Yasushi et al. 2000. « Cellular phenotypes of differentiated-type adenocarcinomas and precancerous lesions of the stomach are dependent on the genetic pathways ». *Journal of Pathology*.
- Feng, Dan et al. 2015. « Comparative transcriptome analysis between metastatic and non-metastatic gastric cancer reveals potential biomarkers ». *Molecular Medicine Reports* 11(1): 386-92.
- Fenoglio-Preiser, C. M., J. Wang, G. N. Stemmermann, et A. Noffsinger. 2003. « TP53 and gastric carcinoma: A review ». *Human Mutation* 21(3): 258-70.
- Ferlay, Jacques et al. 2015. « Cancer incidence and mortality worldwide : Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 ». 386.
- Frank, Bernd et al. 2012. « Polymorphisms in MUC1 , MUC2 , MUC5B and MUC6 genes are not associated with the risk of chronic atrophic gastritis ». *European Journal of*

- Cancer* 8: 11-13.
- Friedl, Peter, et Katarina Wolf. 2010. « Plasticity of cell migration: A multiscale tuning model ». *Journal of Cell Biology* 188(1): 11-19.
- Gadea, Gilles, Marion De Toledo, Christelle Anguille, et Pierre Roux. 2007. « Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices ». *Journal of Cell Biology* 178(1): 23-30.
- Gandellini, Paolo et al. 2015. « Complexity in the tumour microenvironment: Cancer associated fibroblast gene expression patterns identify both common and unique features of tumour-stroma crosstalk across cancer types ». *Seminars in Cancer Biology* 35: 96-106.
- Gao, Jian-Peng et al. 2018. « Tumor heterogeneity of gastric cancer: From the perspective of tumor-initiating cell ». *World journal of gastroenterology* 9(9): 157-64.
- Giroux, Veronique, et Anil K. Rustgi. 2017. « Metaplasia: Tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia-cancer sequence ». *Nature Reviews Cancer* 17(10): 594-604.
- Goldenring, James R., et Ki Taek Nam. 2010. « Oxyntic atrophy, metaplasia and gastric cancer ». *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 96: 117-31.
- Grabsch, Heike I., et Patrick Tan. 2013. « Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms ». *Digestive Surgery* 30(2): 150-58.
- Greicius, Gediminas, et David M Virshup. 2019. « Stromal control of intestinal development and the stem cell niche ». *Differentiation* (December 2018): 0-1.
- Le Guen, Ludovic, Stéphane Marchal, Sandrine Faure, et Pascal de Santa Barbara. 2015. « Mesenchymal – epithelial interactions during digestive tract development and epithelial stem cell regeneration ». *Cellular and Molecular Life Sciences*: 3883-96.
- Guo, Dan, Jiayi Huang, et Jianping Gong. 2012. « Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is required for migration and invasion of breast cancer ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 363(1-2): 179-90.
- Guo, Xiao Bo et al. 2011. « Down-regulation of mir-622 in gastric cancer promotes cellular invasion and tumor metastasis by targeting ING1 gene ». *World Journal of Gastroenterology* 17(14): 1895-1902.
- Hafner, Antonina, Martha L Bulyk, Ashwini Jambhekar, et Galit Lahva. 2019. « The

- multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Hamidi, Hellyeh, et Johanna Ivaska. 2018. « Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis ». *Nature Reviews Cancer*.
- Han, Nayoung, Min A Kim, Hye Seung Lee, et Woo Ho Kim. 2016. « Loss of ARID1A Expression is Related to Gastric Cancer Repair Deficiency ». *Applied immunohistochemistry & molecular morphology*.
- Hao, Dapeng, Li Wang, et Li Jun Di. 2016. « Distinct mutation accumulation rates among tissues determine the variation in cancer risk ». *Scientific Reports* 6(December 2015): 1-5.
- Haupt, Ygal, Ruth Mayat, Anat Kazazt, et Moshe Orent. 1997. « Mdm2 promotes the rapid degradation of p53 ». *Nature* 387115(May): 0-3.
- Hawinkels, L J A C et al. 2014. « Interaction with colon cancer cells hyperactivates TGF- β signaling in cancer-associated fibroblasts. » *Oncogene* 33(1): 97-107.
- Hayakawa, Yoku et al. 2015. « Mist1 Expressing Gastric Stem Cells Maintain the Normal and Neoplastic Gastric Epithelium and Are Supported by a Perivascular Stem Cell Niche ». *Cancer Cell* 28(6): 800-814.
- Hayakawa, Yoku, James G. Fox, et Timothy C. Wang. 2017. « Isthmus Stem Cells Are the Origins of Metaplasia in the Gastric Corpus ». *Cmgh* 4(1): 89-94.
- He, Jia et al. 2018. « Double amplifications of CDK4 and MDM2 in a gastric inflammatory myofibroblastic tumor mimicking cancer with local invasion of the spleen and diaphragm ». *Cancer Biology and Therapy* 19(11): 967-72.
- Hecht, Inbal et al. 2015. « Tumor invasion optimization by mesenchymal-amoeboid heterogeneity ». *Scientific Reports* 5: 1-12.
- Hirata, K et al. 2013. « CD44 variant 9 expression in primary early gastric cancer as a predictive marker for recurrence ». *British Journal of Cancer* 109(2).
- Hoffmann, Werner. 2012. « Stem cells, self-renewal and cancer of the gastric epithelium. » *Current medicinal chemistry* 19(35): 5975-83.
- . 2013. « Self-renewal of the gastric epithelium from stem and progenitor cells ». *Frontiers in Bioscience*: 720-31.
- Horn, H F, et K H Vousden. 2007. « Coping with stress: multiple ways to activate p53 ».

- Oncogene* 26(9).
- Huijbers, A et al. 2013. « The proportion of tumor-stroma as a strong prognosticator for stage II and III colon cancer patients : validation in the VICTOR trial ». (August 2012): 179-85.
- Hussey, George S., Timothy J. Keane, et Stephen F. Badylak. 2017. « The extracellular matrix of the gastrointestinal tract: a regenerative medicine platform ». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.
- Ibba-manneschi, Lidia, Irene Rosa, et Mirko Manetti. 2016. « Telocyte implications in human pathology: An overview ». *Seminars in Cell and Developmental Biology* 55: 62-69.
- Iizuka, M. et al. 2008. « Hbo1 Links p53-Dependent Stress Signaling to DNA Replication Licensing ». *Molecular and Cellular Biology* 28(1): 140-53.
- Ilic, Dusko et al. 1998. « Extracellular Matrix Survival Signals Transduced by Focal Adhesion Kinase Suppress p53-mediated Apoptosis ». *Journal of Cell Biology* 143(2): 547-60.
- Jacks, T et al. 1994. « Tumor spectrum analysis in p53- mutant mice ». *Current Biology* 4(1): 1-7.
- Jo, Yun Sol et al. 2016. « ADNP encoding a transcription factor interacting with BAF complexes exhibits frameshift mutations in gastric and colorectal cancers ». *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 51(10): 1269-71.
- Joerger, Andreas C., et Alan R. Fersht. 2016. « The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches ». *Annual Review of Biochemistry* 85(1): 375-404.
- Jolly, Mohit Kumar et al. 2019. « Hybrid epithelial/mesenchymal phenotypes promote metastasis and therapy resistance across carcinomas ». *Pharmacology and Therapeutics* 194: 161-84.
- Kabiri, Z. et al. 2014. « Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts ». *Development* 141(11): 2206-15.
- Kaestner, Klaus H. et al. 1997. « The mesenchymal winged helix transcription factor Fkh6 is required for the control of gastrointestinal proliferation and differentiation ». *Genes and Development* 11(12): 1583-95.

- Kaiser, Alyssa M., et Laura D. Attardi. 2018. « Deconstructing networks of p53-mediated tumor suppression in vivo ». *Cell Death and Differentiation* 25(1): 93-103.
- Kalluri, Raghu, et Michael Zeisberg. 2006. « Fibroblasts in cancer ». *Nature Reviews Cancer* 6(May).
- Karam, Sherif M., et Charles Philippe Leblond. 1993. « Dynamics of Epithelial Cells in the Corpus of the Mouse Stomach I. Identification of Proliferative Cell Types and Pinpointing of the Stem Cell ». *The Anatomical Record* 340(2): 333-40.
- Katano, Takahito et al. 2015. « Gastric mesenchymal myofibroblasts maintain stem cell activity and proliferation of murine gastric epithelium in vitro ». *American Journal of Pathology* 185(3): 798-807.
- Kaukonen, Riina et al. 2016. « Normal stroma suppresses cancer cell proliferation via mechanosensitive regulation of JMJD1a-mediated transcription ». *Nature Communications* 7.
- Khaleghian, Malihea, Abbas Shakoory, Amirnader Emami Razavi, et Cyrus Azimi. 2015. « Relationship of amplification and expression of the C-MYC gene with survival among gastric cancer patients ». *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16(16): 7061-69.
- Kim, Young-Sik et al. 2017. « Unique characteristics of ARID1A mutation and protein level in gastric and colorectal cancer: A meta-analysis ». *Saudi Journal of Gastroenterology*.
- Knight, J. F. et al. 2013. « Met synergizes with p53 loss to induce mammary tumors that possess features of claudin-low breast cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(14): E1301-10.
- Kodaira, Hisamasa et al. 2000. « Reaction of Various Lectins to Mucin Derived from the Different Layers of Rat Gastric Mucosa: Comparison of Enzyme-Linked Lectin Binding Assay with Lectin Histochemistry ». *Biol Pharm Bull* (43): 2091.
- Kodama, Hirokazu et al. 2017. « Prognostic impact of CD44-positive cancer stem-like cells at the invasive front of gastric cancer ». *British Journal of Cancer* 116(2): 186-94.
- Kojima, Y. et al. 2010. « Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(46):

20009-14.

- Kuang, Rong-guang et al. 2013. « Expression and significance of IGF-2 , PCNA , MMP-7 , and α -actin in gastric carcinoma with Lauren classification ». *The Turkish Journal of Gastroenterology* 2013(2): 99-108.
- Lane, D P, et LV Crawford. 1979. « T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells ». *Nature* 22(19): 2617-20.
- Lathia, Justin D., et Huiping Liu. 2017. « Overview of Cancer Stem Cells and Stemness for Community Oncologists ». *Targeted Oncology* 12(4): 387-99.
- Lau, Wen Min et al. 2014. « CD44v8-10 is a cancer-specific marker for gastric cancer stem cells ». *Cancer Research* 74(9): 2630-41.
- Lauren, Pekka. 1965. « The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. an Attempt At a Histo-Clinical Classification. » *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 64: 31-49.
- Leushacke, Marc et al. 2013. « Lgr5+ Gastric Stem Cells Divide Symmetrically to Effect Epithelial Homeostasis in the Pylorus ». *Cell Reports* 5(2): 349-56.
- Levine, Arnold J., et Moshe Oren. 2009. « The first 30 years of p53: growing ever more complex ». *Nature Reviews Cancer* 9(10): 749-58.
- Li, Dan et al. 2016. « Risks and Predictors of Gastric Adenocarcinoma in Patients with Gastric Intestinal Metaplasia and Dysplasia : A Population-Based Study ». *American Journal of Gastroenterology* 111(8): 1104-13.
- Li, Ning et al. 2015. « Prognostic evaluation of Nanog, Oct4, Sox2, PCNA, Ki67 and E-cadherin expression in gastric cancer ». *Medical Oncology* 32(1): 1-9.
- Li, Wenqing et al. 2017. « Membrane targeting of inhibitory Smads through palmitoylation controls TGF- β /BMP signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(50): 13206-11.
- Li, Xiangchun et al. 2016. « Distinct subtypes of gastric cancer defined by molecular characterization include novel mutational signatures with prognostic capability ». *Cancer Research* 76(7): 1724-32.
- Li, Xianju et al. 2018. « A time-resolved multi-omic atlas of the developing mouse stomach ». *Nature Communications* (2018).
- Lin, Y I et al. 2012. « PTK7 as a Novel Marker for Favorable Gastric Cancer Patient

- Survival ». *Journal of Surgical Oncology* (May): 880-86.
- Liu, Yan Jun et al. 2015. « Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells ». *Cell* 160(4): 659-72.
- Lo, Hin Ching, et Xiang H.F. Zhang. 2018. « EMT in Metastasis: Finding the Right Balance ». *Developmental Cell* 45(6): 663-65.
- Lv, Yifei et al. 2012. « Adenovirus-mediated expression of p33ING1b induces apoptosis and inhibits proliferation in gastric adenocarcinoma cells in vitro ». *Gastric Cancer* 15(4): 355-62.
- Maleki, Saffiyeh Saboor, et Christoph Röcken. 2017. « Chromosomal Instability in Gastric Cancer Biology ». *Neoplasia* 19(5): 412-20.
- Malkin, David et al. 1990. « Germ Line p53 Mutations in a Familial Syndrome of Breast Cancer , Sarcomas , and Other Neoplasms ». *Science* (November).
- Maloum, F. et al. 2011. « Epithelial BMP signaling is required for proper specification of epithelial cell lineages and gastric endocrine cells ». *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 300(6): 1065-79.
- Manetti, Mirko, Irene Rosa, Luca Messerini, et Lidia Ibba-manneschi. 2015. « Telocytes are reduced during fibrotic remodelling of the colonic wall in ulcerative colitis ». 19(1): 62-73.
- Marsh, Victoria, Emma J. Davies, Geraint T. Williams, et Alan R. Clarke. 2013. « PTEN loss and KRAS activation cooperate in murine biliary tract malignancies ». *Journal of Pathology* 230(2): 165-73.
- Massarrat, Sadegh, et Manfred Stolte. 2014. « Development of Gastric Cancer and Its Prevention ». *Arch Iran Med* 17(7).
- Matsuoka, Tasuku, et Masakazu Yashiro. 2018. « Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective ». *World Journal of Gastroenterology*.
- McCarthy, James B., Dorraya El-Ashry, et Eva A. Turley. 2018. « Hyaluronan, cancer-associated fibroblasts and the tumor microenvironment in malignant progression ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6(05): 1-13.
- Mccracken, Kyle W., et James M. Wells. 2017. « Mechanisms of embryonic stomach development ». *Seminars in Cell and Developmental Biology* 66: 36-42.
- Merchant, Juanita L., et Milena Saqui-Salces. 2014. « Inhibition of Hedgehog Signaling in

- the Gastrointestinal Tract: Targeting the Cancer Microenvironment ». *Cancer Treatment Reviews* 40(1).
- Milia, Anna Franca et al. 2013. « Telocytes in Crohn's disease ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 17(12): 1525-36.
- Mills, Jason C., et Ramesh A. Shivdasani. 2011. « Gastric epithelial stem cells ». *Gastroenterology* 140(2): 412-24.
- Mishina, Yuji, Atsushi Suzuki, Naoto Ueno, et Richard R. Behringer. 1995. « Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis ». *Genes & Development*: 3027-37.
- Miyazono, Kohei, Yuto Kamiya, et Masato Morikawa. 2010. « Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction ». *Journal of Biochemistry* 147(1): 35-51.
- Miyazono, Kohei, Shingo Maeda, et Takeshi Imamura. 2005. « BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk ». *Cytokine and Growth Factor Reviews* 16(3 SPEC. ISS.): 251-63.
- Morath, I., T. N. Hartmann, et V. Orian-rousseau. 2016. « CD44: More than a mere stem cell marker ». *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 81: 166-73.
- Mouw, Janna K et al. 2014. « Tissue mechanics modulate microRNA-dependent PTEN expression to regulate malignant progression ». *Nature medicine* 20(4): 360-67.
- Muller, Patricia A.J., Karen H. Vousden, et Jim C. Norman. 2011. « P53 and Its Mutants in Tumor Cell Migration and Invasion ». *Journal of Cell Biology* 192(2): 209-18.
- Murata, Takuya, Eisuke Mekada, et Robert M. Hoffman. 2017. « Reconstitution of a metastatic-resistant tumor microenvironment with cancer-associated fibroblasts enables metastasis ». *Cell Cycle* 16(6): 533-35.
- Mutoh, H et al. 2005. « Pericryptal fibroblast sheath in intestinal metaplasia and gastric carcinoma ». *Gut* 54(1): 33-39.
- Mutoh, Hiroyuki et al. 2010. « Direct repression of Sonic Hedgehog expression in the stomach by Cdx2 ». 434: 423-34.
- Narita, T., et H. Numao. 1992. « Lectin binding patterns in normal, metaplastic, and neoplastic gastric mucosa ». *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 40(5): 681-87.
- Nawaz, Muhammad et al. 2018. « Extracellular Vesicles and Matrix Remodeling Enzymes:

- The Emerging Roles in Extracellular Matrix Remodeling, Progression of Diseases and Tissue Repair ». *Cells* 7(10): 167.
- Ni, Xiaotian et al. 2019. « A region-resolved mucosa proteome of the human stomach ». *Nature Communications* (2019): 1-11.
- Nissen, Neel I., Morten Karsdal, et Nicholas Willumsen. 2019. « Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology ». *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 38(1): 1-12.
- Nosrati, Anahita, Farshad Naghshvar, Somaieh Khanari, et Imam Khomeini Hospital. 2014. « Cancer Stem Cell Markers CD44, CD133 in Primary Gastric Adenocarcinoma ». *Int J Mol Cell Med* (4).
- Nozaki, Koji et al. 2008. « A Molecular Signature of Gastric Metaplasia Arising in Response to Acute Parietal Cell Loss ». *Gastroenterology* 134(2): 511-22.
- Oki, Eiji et al. 1999. « Reduced expression of p33(ING1) and the relationship with p53 expression in human gastric cancer ». *Cancer Letters* 147(1-2): 157-62.
- Oshima, Hiroko et al. 2009. « Induction of prostaglandin E2 pathway promotes gastric hamartoma development with suppression of bone morphogenetic protein signaling ». *Cancer Research* 69(7): 2729-33.
- Pal, Mintu, Sourya Bhattacharya, Gazal Kalyan, et Saugata Hazra. 2018. « Cadherin profiling for therapeutic interventions in Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) and tumorigenesis ». *Experimental Cell Research* 368(2): 137-46.
- Palecek, Sean P S.P. et al. 1997. « Integrin – ligand binding properties govern cell migration speed through cell – substratum adhesiveness Total synthesis of the potential anticancer vaccine KH-1 adenocarcinoma antigen Integrin – ligand binding properties govern cell migration speed through ». *Nature* 388(July): 537–540.
- Panani, Anna D. 2008. « Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: Clinical implications ». *Cancer Letters* 266(2): 99-115.
- Paňková, K., D. Rösel, M. Novotný, et Jan Brábek. 2010. « The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(1): 63-71.
- Pastushenko, Ievgenia, et Cédric Blanpain. 2019. « EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis ». *Trends in Cell Biology* 29(3): 212-26.

- Petersen, Christine P., Jason C. Mills, et James R. Goldenring. 2017. « Murine Models of Gastric Corpus Preneoplasia ». *Cmgh* 3(1): 11-26.
- Pieri, Laura, Maria Giuliana Vannucchi, et Maria Simonetta Faussone-pellegrini. 2008. « Histochemical and ultrastructural characteristics of an interstitial cell type different from ICC and resident in the muscle coat of human gut ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12(5): 1944-55.
- Pietras, Kristian, et Arne Östman. 2010. « Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma ». *Experimental Cell Research* 316(8): 1324-31.
- Powell, Emily, David Piwnica-worms, et Helen Piwnica-worms. 2014. « Contribution of p53 to Metastasis ». *Cancer Discovery* 4(April): 405-15.
- Prochazka, Lubomir, Radek Tesarik, et Jaroslav Turanek. 2014. « Regulation of alternative splicing of CD44 in cancer ». *Cellular Signalling* 26(10): 2234-39.
- Quante, Michael, Frederic Marrache, James R. Goldenring, et Timothy C. Wang. 2010. « TFF2 mRNA transcript expression marks a gland progenitor cell of the gastric oxyntic mucosa ». *Gastroenterology* 139(6): 2018-2027.e2.
- Ramsey, V. G. et al. 2007. « The maturation of mucus-secreting gastric epithelial progenitors into digestive-enzyme secreting zymogenic cells requires Mist1 ». *Development* 134(1): 211-22.
- Reis, Celso A. et al. 2000. « Immunohistochemical study of the expression of MUC6 mucin and co- expression of other secreted mucins (MUC5AC and MUC2) in human gastric carcinomas ». *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 48(3): 377-88.
- Van Roy, Frans. 2014. « Beyond E-cadherin: Roles of other cadherin superfamily members in cancer ». *Nature Reviews Cancer* 14(2): 121-34.
- Roy, S.A.B. et al. 2016. « Loss of mesenchymal bone morphogenetic protein signaling leads to development of reactive stroma and initiation of the gastric neoplastic cascade ». *Scientific Reports* 6.
- Sackett, Sara D., James T. Fulmer, Joshua R Friedman, et Klaus H. Kaestner. 2007. « Foxl1-Cre BAC Transgenic Mice: A New Tool for Gene Ablation in the Gastrointestinal Mesenchyme ». *Genesis* 45(6): 418-26.
- Sailaja, Badi Sri, Xi C. He, et Linheng Li. 2016. « The regulatory niche of intestinal stem cells ». *Journal of Physiology* 594(17): 4827-36.

- Sams, Laura, Julie Paume, Jacqueline Giallo, et Frédéric Carrière. 2016. « Relevant pH and lipase for in vitro models of gastric digestion ». *Food and Function*: 30-45.
- Schittek, Birgit, et Tobias Sinnberg. 2014. « Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis ». *Molecular Cancer* 13(1): 1-14.
- Schneeman, Barbara O. 2002. « Gastrointestinal physiology and functions ». *British Journal of Nutrition*: 159-63.
- Schweiger, Pawel J et al. 2018. « Lrig1 marks a population of gastric epithelial cells capable of long-term tissue maintenance and growth in vitro ». *Scientific Reports* (October): 1-11.
- Shinohara, Masahiko et al. 2010. « Bone morphogenetic protein signaling regulates gastric epithelial cell development and proliferation in mice ». *Gastroenterology* 139(6): 2050-2060.e2.
- Shoshkes-Carmel, Michal et al. 2018. « Subepithelial telocytes are an important source of Wnts that supports intestinal crypts ». *Nature*.
- Singh, Shree Ram. 2014. « Gastric cancer stem cells : A novel therapeutic target ». *Cancer letters* 338(1): 110-19.
- Solozobova, Valeriya, et Christine Blattner. 2011. « P53 in Stem Cells ». *World Journal of Biological Chemistry* 2(9): 202.
- Stange, Daniel E. et al. 2013. « Differentiated Troy⁺ Chief Cells Act as Reserve Stem Cells to Generate All Lineages of the Stomach Epithelium ». *Cell* 155(2): 357-68.
- Sun, G G, S H Sheng, S W Jing, et W N Hu. 2014. « An antiproliferative gene FLNA regulates migration and invasion of gastric carcinoma cell in vitro and its clinical significance ». *Tumor Biology*: 2641-48.
- Theocharis, Achilleas D, Dimitra Manou, et Nikos K Karamanos. 2019. « The extracellular matrix as a multitasking player in disease ». *The FEBS Journal*.
- Todisco, Andrea. 2017. « Regulation of Gastric Metaplasia, Dysplasia, and Neoplasia by Bone Morphogenetic Protein Signaling ». *Cmgh* 3(3): 339-47.
- Toquet, Claire et al. 2012. « ADAM15 to $\alpha 5\beta 1$ integrin switch in colon carcinoma cells: A late event in cancer progression associated with tumor dedifferentiation and poor prognosis ». *International Journal of Cancer* 130(2): 278-87.
- Tsukada, Shinko et al. 1998. « Induction of precocious pepsinogen synthesis by

- glucocorticoids in fetal rat gastric epithelium in organ culture: Importance of mesenchyme for epithelial differentiation ». *Differentiation* 62(5): 239-47.
- Tu, Shui Ping et al. 2009. « p53 inhibition of AP1-dependent TFF2 expression induces apoptosis and inhibits cell migration in gastric cancer cells ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 297(2): G385-96.
- Tumiati, Manuela et al. 2015. « Loss of Rad51c accelerates tumorigenesis in sebaceous glands of Trp53-mutant mice ». *Journal of Pathology* 235(1): 136-46.
- Valkenburg, Kenneth C., Amber E. de Groot, et Kenneth J. Pienta. 2018. « Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy ». *Nature Reviews Clinical Oncology*: 1.
- Varga, Ivan et al. 2019. « Recently Discovered Interstitial Cell Population of Telocytes : Distinguishing Facts from Fiction Regarding Their Role in the Pathogenesis of Diverse Diseases Called Telocytopathies ». *Medicina*: 1-14.
- Wang, Diane Catherine, et Xiangdong Wang. 2017. « Systems heterogeneity: An integrative way to understand cancer heterogeneity ». *Seminars in Cell and Developmental Biology* 64: 1-4.
- Wang, Jian Dong et al. 2008. « Loss of expression of EphB1 protein in gastric carcinoma associated with invasion and metastasis ». *Oncology* 73(3-4): 238-45.
- Wang, Qiang, Bing Wang, Yun Mei Zhang, et Wei Wang. 2016. « The association between CDH1 promoter methylation and patients with ovarian cancer: A systematic meta-analysis ». *Journal of Ovarian Research* 9(1): 1-7.
- Wang, R N et al. 2014. « Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases ». *Genes Dis* 1(1): 87-105.
- Wang, Shizhi et al. 2016. « MiR-107 regulates tumor progression by targeting NF1 in gastric cancer ». *Scientific Reports* 6(October): 1-8.
- Wang, Xiangdong, et Dragos Cretoiu. 2016. *Telocytes : Connecting cells*.
- Werb, Zena, et Pengfei Lu. 2015. « The Role of Stroma in Tumor Development ». *Cancer Journal* 21(4): 250-53.
- Wessler, Silja, Linda M. Krisch, Dominik P. Elmer, et Fritz Aberger. 2017. « From inflammation to gastric cancer - The importance of Hedgehog/GLI signaling in Helicobacter pylori-induced chronic inflammatory and neoplastic diseases ». *Cell Communication and Signaling* 15(1): 1-13.

- De Wever, Olivier, Pieter Demetter, Marc Mareel, et Marc Bracke. 2008. « Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth ». *International Journal of Cancer* 123(10): 2229-38.
- Winograd-katz, Sabina E, Reinhard Fassler, Benjamin Geiger, et Kyle R Legate. 2014. « The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Yasugi, Sadao. 1993. « Role of Epithelial-Mesenchymal Interactions in Differentiation of Epithelium of Vertebrate Digestive Organs: morphogenesis/cytodifferentiation/inductive information ». *Development, Growth & Differentiation* 35(1): 1-9.
- Ye, Lin, Howard Kynaston, et Wen G. Jiang. 2009. « Bone Morphogenetic Protein-10 Suppresses the Growth and Aggressiveness of Prostate Cancer Cells Through a Smad Independent Pathway ». *Journal of Urology* 181(6): 2749-59.
- Yen, Tzung-hai, et Nicholas A Wright. 2006. « The Gastrointestinal Tract Stem Cell Niche ». *Stem Cell Reviews* 00: 203-12.
- Yin, Zi-huan et al. 2017. « Expression and clinical significance of ILF2 in gastric cancer ». *Disease Markers*.
- Yoshioka, Takuto et al. 2019. « Bmi1 marks gastric stem cells located in the isthmus in mice ». *Journal of Pathology*.
- Yu, Yang, et Randolph Elble. 2016. « Homeostatic Signaling by Cell–Cell Junctions and Its Dysregulation during Cancer Progression ». *Journal of Clinical Medicine* 5(2): 26.
- Yue, Xuetian, Yuhan Zhao, Yang Xu, et Min Zheng. 2017. « Mutant p53 in Cancer : Accumulation , Gain-of-Function , and Therapy ». *Journal of Molecular Biology* 429(11): 1595-1606.
- Zakhem, Elie, Shreya Raghavan, Khalil N Bitar, et Riley A Suhar. 2019. « Bioengineering and regeneration of gastrointestinal tissue: where are we now and what comes next? » *Expert Opinion on Biological Therapy* 0(0): 1.
- Zavros, Yana. 2018. « The Novel Role of Lgr5 as a Regulator of Cell Homeostasis and Disease of the Gastric Oxyntic Mucosa ». *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 5(4): 645-46.
- Zhao, Xianda et al. 2013. « Caveolin-1 Expression Level in Cancer Associated Fibroblasts

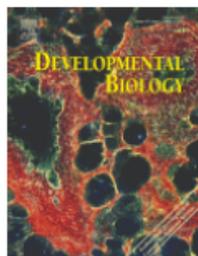
Predicts Outcome in Gastric Cancer ». *PLoS ONE* 8(3).

Zheng, Yonghua, Miaomiao Zhang, Mengjia Qian, et Lingyan Wang. 2013. « Genetic comparison of mouse lung telocytes with mesenchymal stem cells and fibroblasts ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 17(4): 567-77.

Zhou, Xiao-Ping P et al. 2001. « Germline Mutations in BMPR1A/ALK3 Cause a Subset of Cases of Juvenile Polyposis Syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndromes ». *American journal of human genetics* 69(4): 704-11.

14. ANNEXES

Annexe 1 – Licence pour la figure 5



Title: Extracellular Regulation of BMP Signaling in Vertebrates: A Cocktail of Modulators
Author: Wendy Balemans, Wim Van Hul
Publication: Developmental Biology
Publisher: Elsevier
Date: 15 October 2002

Logged in as:
 Camille Ouellet
 Université de Sherbrooke
 Account #:
 3001445879

LOGOUT

Copyright © 2002 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Université de Sherbrooke -- Camille Ouellet ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

[printable details](#)

License Number	4597721245899
License date	May 28, 2019
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Developmental Biology
Licensed Content Title	Extracellular Regulation of BMP Signaling in Vertebrates: A Cocktail of Modulators
Licensed Content Author	Wendy Balemans, Wim Van Hul
Licensed Content Date	Oct 15, 2002
Licensed Content Volume	250
Licensed Content Issue	2
Licensed Content Pages	20
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Original figure numbers	Figure 1
Title of your thesis/dissertation	Effet synergique de la signalisation des BMP dans les cellules Foxl1 et de Trp53 dans l'initiation et la progression de la carcinogenèse gastrique
Expected completion date	Aug 2019
Estimated size (number of pages)	100
Requestor Location	Université de Sherbrooke 3001, 12e avenue Nord
	Sherbrooke, QC J1H 5N4 Canada Attn: Université de Sherbrooke