

Université de Montréal

**INTERNALISATION D'ENZYMES PANCRÉATIQUES
PAR LA MUQUEUSE INTESTINALE**

Par

Maryse Cloutier

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès science (M.Sc.)

en Pathologie et Biologie Cellulaire

option Biologie Cellulaire

Décembre 2005

Copyright, Maryse Cloutier, 2005



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

INTERNALISATION D'ENZYMES PANCRÉATIQUES PAR LA MUQUEUSE INTESTINALE

Présenté par:

Maryse Cloutier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Jacques Paiement

.....
président-rapporteur

Dr Moïse Bendayan

.....
directeur de recherche

Dr Christiane Malo

.....
membre du jury

RÉSUMÉ

L'intestin grêle est le site majeur de digestion et d'absorption des nutriments. Sa muqueuse représente une barrière efficace aux macromolécules. Cependant, des évidences croissantes indiquent la capacité de certaines macromolécules à franchir cette muqueuse et à parvenir au sang. Les voies intestinales par lesquelles ce transfert s'effectue restent à être caractérisées. Ce travail révèle une voie permettant le transfert de l'amylase et de la lipase pancréatiques de la lumière intestinale à la circulation. Ces enzymes sont présentes en plus fortes concentrations dans la muqueuse intestinale et dans le sang de rats nourris par rapport aux rats à jeun. Sous stimulation de la sécrétion pancréatique par le carbachol, non seulement les concentrations sanguines des enzymes augmentent mais des évidences d'internalisations duodénales sont constatées. Des expériences complémentaires ont été effectuées avec des enzymes étiquetées au FITC. Après insertion des complexes amylase-FITC ou lipase-FITC dans la lumière intestinale de rats à jeun, les activités sériques des enzymes augmentent avec le temps. Les techniques de fluorescence et d'immunoperoxidase révèlent le cheminement des enzymes de la lumière intestinale à travers la muqueuse alors que les techniques immunocytochimiques à l'or colloïdal dévoilent la voie cellulaire permettant le transfert des enzymes au travers des entérocytes. De la lumière intestinale, les enzymes sont internalisées par les compartiments endosomaux, transférées à l'appareil de Golgi et à la membrane basolatérale. Une fois dans l'espace interstitiel, elles atteignent la circulation. Ainsi, la transcytose à travers la muqueuse intestinale représente une voie d'accès de la lumière intestinale à la circulation sanguine.

MOTS CLÉ: Enzymes pancréatiques, muqueuse intestinale, immunocytochimie, activités enzymatiques, transcytose.

ABSTRACT

The small intestine is the major site of nutriment digestion and absorption. Its mucosa is considered as a fine barrier to macromolecules present in the intestinal lumen. A growing set of evidence indicates that macromolecules can cross the intestinal mucosa to reach the blood. However, the pathways responsible for this transfer remain to be established. We herein report the transfer of amylase and lipase from the intestinal lumen to the blood circulation. Higher concentrations of both pancreatic enzymes were found in the intestinal mucosa and in blood of fed rats when compared to fasted ones. Upon carbachol stimulation of pancreatic secretion, not only enzymes concentrations in blood rose but evidence for internalization by duodenal enterocytes was obtained. Additional experiments were carried out with fluorochrome (FITC) tagged amylase and lipase. After duodenal insertion of enzyme-FITC complexes into the duodenal lumen of fasting rats, serum activities for corresponding enzymes clearly increased with time. Immunofluorescence and immunoperoxidase established the internalization of both proteins by the intestinal mucosa and immunogold techniques underlined the pathway taken by both proteins across the enterocytes. From the intestinal lumen the enzymes are channelled through the endosomal compartment, to the Golgi apparatus and to the basolateral membrane reaching the interstitial space and blood circulation. Thus, transcytosis of amylase and lipase through the intestinal mucosa represents one access route from the intestinal lumen to the blood circulation.

KEYWORDS: Pancreatic enzymes, intestinal mucosa, transcytosis, immunocytochemistry, enzymes blood activities

TABLES MATIÈRES

Page titre.....	I
Identification du jury.....	II
Résumé et Mots clés.....	III
Abstract and key words.....	V
Table des matières.....	VI
Liste des figures.....	VIII
Liste des abréviations.....	XI
Dédicace.....	XV
Introduction.....	1
1. Amylase et lipase pancréatiques.....	1
2. Production, stockage et sécrétion de l'amylase et de la lipase par le pancréas exocrine.....	3
3. Présence de l'amylase et de la lipase pancréatiques dans la circulation sanguine.....	6
4. Sécrétion endocrine du pancréas exocrine.....	10
5. Fuite du canal pancréatique.....	14
6. Absorption duodénale de macromolécules.....	16
A. Absorption duodénale d'enzymes digestives.....	16
B. Voies cellulaires permettant l'absorption duodénale de macromolécules.....	18
C. Évidences directes de l'existence des voies pour l'absorption de macromolécules.....	23

7. Le travail.....	25
Article.....	29
1. Title page.....	30
2. Abstract and Keywords.....	31
3. Introduction.....	32
4. Materials and Methods.....	35
5. Results.....	42
6. Discussion.....	50
7. Acknowledgments and Grants.....	55
8. Literature Cited.....	56
9. Legends.....	63
10. Figures.....	67
Discussion et conclusions.....	75
1. Discussion générale des résultats.....	75
2. Un clin d’œil à l’endocytose spécifique.....	81
3. L’implication de l’appareil de Golgi dans la transcytose.....	85
4. Fonction et stabilité des enzymes dans la circulation sanguine.....	90
5. Avenues futures, la Cpn60.....	91
6. Conclusion.....	93
Bibliographie.....	94
Remerciements.....	XVI
Curriculum vitae.....	XVII

LISTE DES FIGURES

MÉMOIRE

	Page	
Figure 1.	19	Voies cellulaires de l'absorption duodénale.
Figure 2.	21	Illustration de la muqueuse intestinale de rat; jonctions serrées et desmosomes dans les cellules entérocytaires.
Figure 3.	78	Cellules acineuses sous condition de stimulation de la sécrétion pancréatique par des doses maximales de carbachol.

ARTICLE

Figure 1.	67	Immunohisto-detection of amylase and lipase in the intestinal mucosa of fasted and fed rats. (A) Amylase; fasted conditions. (B) Amylase; fed conditions. (C) Lipase; fed conditions.
Figure 2.	67	Immunohisto-detection of amylase and lipase in the duodenal mucosa of carbachol treated rats. (A,B) Amylase detection. (C) Lipase detection.
Figure 3.	67	Direct detection of FITC on duodenal tissue before and after the insertion of amylase-FITC in the intestinal lumen. (A) Before insertion. (B) 15 minutes after insertion. (C) 60 minutes after insertion.
Figure 4.	68	Direct detection of FITC in duodenal tissue before and after the insertion of lipase-FITC in the intestinal lumen. (A)

Before insertion. **(B)** Duodenal tissue 5 minutes after insertion. **(C)** 15 minutes after insertion. **(D)** 30 minutes after insertion.

- Figure 5.** 69 Immunoperoxidase labeling revealing lipase in duodenal tissue before and after the insertion of lipase-FITC into the duodenal lumen. **(A)** Before lipase insertion. **(B)** 5 minutes after insertion. **(C)** 30 minutes after insertion. **(D)** 60 minutes after insertion.
- Figure 6.** 70 Immunocytochemical detection of amylase-FITC in duodenal enterocytes **(A, B, C)**.
- Figure 7.** 71 Immunocytochemical detection of lipase-FITC in duodenal enterocytes.
- Figure 8.** 72 Immunocytochemical detection of amylase and lipase-FITC in duodenal tissue. **(A)** Amylase-FITC experiment. **(B)** Lipase-FITC experiment.
- Figure 9.** 73 Densities of labeling obtained with the anti-FITC antibody over different cellular compartments of the rat enterocytes. **(A)** Amylase-FITC experiment. **(B)** Lipase-FITC experiment.
- Figure 10.** 74 Immunoblot detection of amylase-FITC **(A, B)** and lipase-FITC **(C)** in serum sampled 60 minutes after insertion of the enzymes-FITC solutions.

Figure 11. 74 Enzymes activities of serum samples from duodenal solution insertion experiments. (A) Amylase-FITC experiment. (B) Lipase-FITC experiment.

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

MÉMOIRE

%	Pourcentage
α -1,4	Liens glucosidiques alpha 1-4
α -amylase	Alpha-amylase
α -globuline	Alpha-globuline
β -lactam	Bêta-lactam
Δ	Delta
γ -globuline	Gamma-globuline
μ m	Micromètre
<i>amy1</i>	Gène amylase 1
<i>amy2</i>	Gène amylase 2
Asn-X-Ser	Séquence asparagine-acide aminé aléatoire-sérine
Asn-X-Thr	Séquence asparagine-acide aminé aléatoire-thréonine
BSDL	Lipase dépendante des sels biliaires
ca	Cellule centro-acineuse
CAPAN-1	Cellules dérivées d'un adénocarcinome du canal pancréatique
carbachol	Chlorure de carbamyl β -methylcholine
Cpn60	Chaperonine 60
d	Desmosomes
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
G	Appareil de Golgi
Grp94	Protéine de 94kDa régulée par le glucose

gz	Grain de zymogènes
HRP	Peroxydase de raifort
INT407	Lignée cellulaire intestinale humaine
js	Jonction serrée
L	Lumière
LDL	Lipoprotéine de faible densité
M	Mitochondrie
mbl	Membrane basolatérale
MTP	Protéine microsomale de transfert des triglycérides
Munc18	Protéine de liaison de la syntaxine soluble
mv	Microvillosités
N	Noyau
Ox-LDL	Lipoprotéine de faible densité oxydée
SNARE	Récepteur de protéine d'attachement soluble NSF (protéine de fusion sensible au N-éthyl-maléimide)
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité

ARTICLE

%	Percentage
±	Plus or minus
α-(1,4)	α-(1,4) glycosidic linkage
μm	Micrometer
μm ²	Square Micrometer

blm	Basolateral membrane
BSDL	Bile salt dependent lipase
bw	Body weight
C	Celsius degree
Caco-2	Human colorectal carcinoma cell line
CL	Capillary lumen
DAB	3,3'-diaminobenzidine
e ou endo	Endosomal compartments
g	Gram
G	Golgi apparatus
Grp94	Glucose-regulated protein 94kDa
h	Hour
IgG	Immunoglobulin G
IP	Intraperitoneal
IT	Interstitial tissue
IU	International unit
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogram
LDL	Low density lipoprotein
LOX-1	Lectin-like oxidized-LDL receptor
m ou M	Mitochondria
mg	Milligram
min	Minute

mL	Milliliter
MW	Molecular weight
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffer saline
POD	peroxidase
RT	Room temperature
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SEM	Standard error to the mean
TIU	Trypsin inhibitor unit
TRITC	Tetramethylrhodamine isothiocyanate
v	Plasmalemmal vesicles
VLDL	Very low density lipoprotein

DÉDICACE

À mes parents, Paulette et Jacques, qui m'ont encouragée et soutenue tout au long de mes études. Je vous en remercie, merci de votre appui inconditionnel.

À mes grands-parents, Madeleine et Maurice, qui ont créé la plus belle des familles et qui sont fières de leurs petits enfants. Merci, je vous aime.

Nos histoires d'aujourd'hui
n'ont pas besoin d'avoir lieu maintenant

Günter Grass

INTRODUCTION

1. Amylase et lipase pancréatiques

L' α -amylase est une enzyme dont la fonction est d'hydrolyser les liens α -1,4 présents dans diverses sources de carbohydrates afin de libérer le D-glucose, une source d'énergie utilisable par l'organisme (MacDonald *et al*, 1980, Ferey-Roux *et al*, 1998, Rydberg *et al*, 1999). L' α -amylase est produite par différents organes, principalement par le pancréas et les glandes salivaires, mais aussi par les glandes mammaires, lacrymales et par le foie (MacDonald *et al*, 1980, Ferey-Roux *et al*, 1998). Le pancréas ainsi que la glande parotide (une des glandes salivaires) constituent les principales sources d' α -amylase sécrétée par voie exocrine dans le système digestif (MacDonald *et al*, 1980). L' α -amylase produite par ces différents organes provient de l'expression de deux gènes distincts, l'*amy1* et l'*amy2* (Yokouchi *et al*, 1990, Darnis *et al*, 1999). Alors que le gène *amy1* codant pour l' α -amylase salivaire, mammaire, lacrymale et hépatique est exprimé dans ces différentes glandes, le gène *amy2* codant pour l' α -amylase pancréatique est exprimé seulement dans le pancréas (Yokouchi *et al*, 1990, Ferey-Roux *et al*, 1998, Hokari *et al*, 2003). Pour cette raison, il est possible d'identifier par analyses immunologiques la présence de l'amylase pancréatique dans divers tissus en évitant de confondre cette dernière avec l' α -amylase provenant des autres tissus (MacDonald *et al*, 1980, Young *et al*, 1996).

La triglycéride lipase pancréatique aussi nommée la lipase-colipase-dépendante est une enzyme pancréatique sécrétée de manière exocrine par les

cellules acineuses du pancréas (Lowe, 1997, Marcil *et al*, 2004). Les cellules du pancréas exocrine sécrètent en fait plusieurs lipases distinctes: la triglycéride lipase, la phospholipase et la lipase dépendante des sels biliaires (BSDL). Ces différentes lipases possèdent des fonctions chevauchantes permettant une digestion efficace des lipides alimentaires. Seule, la triglycéride lipase assure l'hydrolyse des liens ester de 70 à 75% des triglycérides et des diacylglycérols dans le tube digestif (Lowe, 1997, Marcil *et al*, 2004). Ainsi une déficience de cette enzyme résulte en une malabsorption du gras alimentaire (Lowe, 1997, 2002).

Outre ces lipases chargées de la digestion des lipides de la diète, le corps produit aussi la lipase hépatique et la lipoprotéine lipase. Ces dernières, présentes dans la circulation sanguine, démontrent une grande similarité avec la triglycéride lipase au niveau de la structure tridimensionnelle tout en étant dissociables une de l'autre par analyses immunologiques (Tietz et Shuey, 1993).

2. Production, stockage et sécrétion de l'amylase et de la lipase par le pancréas exocrine

Le pancréas est un organe hétérogène possédant des composantes endocrines et exocrines (Bockman, 1993). Le pancréas endocrine est constitué de cellules sécrétant des hormones qui sont dispersées dans le tissu exocrine pour former les îlots de Langerhans (Korc, 1993). Les îlots de Langerhans sont des structures complexes formées de différents types de cellules endocrines et de cellules nerveuses qui possèdent un apport riche en vaisseaux sanguins (Korc, 1993). Les différentes cellules endocrines sont les cellules α qui sécrètent le glucagon, les cellules Δ qui sécrètent la somatostatine et les cellules β qui sécrètent l'insuline (Like et Orci, 1972). Les composantes structurales principales du pancréas exocrine sont les unités acinaires et le système ductal (Kern, 1993). Le système ductal est responsable de la sécrétion de bicarbonate, d'ions et de fluide ainsi que de l'acheminement du jus pancréatique à la lumière duodénale (Harperr et Scratcherd, 1979, Schulz, 1981, Argent *et al.*, 1992). Les unités de sécrétions enzymatiques, nommées les acini, sont composées de cellules épithéliales organisées autour d'une lumière acineuse commune (Kern, 1993, Murtaugh et Melton, 2003). Les cellules acineuses du pancréas sont les cellules responsables de la synthèse, du stockage et de la libération sous commandes des enzymes digestives (Kern, 1993, Wasle et Edwardson, 2002, Murtaugh et Melton, 2003, Gingras et Bendayan, 2005). Elles représentent plus de 95 % du tissu pancréatique (Murtaugh et Melton, 2003). Les cellules acineuses sont des cellules polarisées possédant une grande surface basolatérale qui occupe environ 90% de la surface totale de la cellule (Wasle et

Edwardson, 2002). Les enzymes pancréatiques sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique rugueux sous forme de pro-enzymes; en effet, elles possèdent un signal peptidique en N-terminal qui permet leur translocation à l'intérieur de la citerne du réticulum endoplasmique rugueux et ainsi les destine à la sécrétion (Jamieson et Palade, 1967, Delvillers-Thiery *et al*, 1975). Elles sont déplacées vers l'appareil de Golgi où elles subissent certaines modifications dont des glycosilations et sulfonations et sont par la suite emmagasinées dans des vacuoles de condensation (Jamieson et Palade, 1977, Palade 1975, Farquhar, 1985). L'amylase et la lipase pancréatiques possèdent des sites susceptibles d'être glycosilés au niveau de l'appareil de Golgi (Tietz et Shuey, 1993, Doyon *et al*, 2002). Suite à la maturation des vésicules impliquant l'augmentation de la concentration des zymogènes et la réduction de la surface membranaire des vacuoles, les grains de zymogènes matures sont dirigés vers la membrane apicale où ils demeurent en réserve jusqu'à la stimulation de la sécrétion (Jamieson et Palade, 1977, Palade, 1975). La sécrétion pancréatique est provoquée par l'action de sécrétagogues sur la cellule acineuse (Chey, 1993, Wasle et Edwardson, 2002). La cholécystokinine, la sécrétine et la gastrine représentent quelques sécrétagogues qui, en interagissant avec leurs récepteurs situés sur la membrane basolatérale, génèrent des seconds messagers dans la cellule (Slack, 1995, Wasle et Edwardson, 2002, Gaisano *et al*, 2004). La présence de ces seconds messagers dans la cellule est responsable de l'activation de l'exocytose à la membrane apicale via l'activation des SNAREs à cette membrane et ainsi du déversement du contenu des grains de zymogènes dans la lumière acineuse (Gaisano *et al*, 2004). De la lumière acineuse, les enzymes

digestives parviennent à de petits canaux formés par les cellules ductales (Kodoma, 1983, Kern, 1993, Gaisano *et al*, 2004). Ces canaux viennent par la suite à confluence pour former le canal pancréatique principal qui déverse son contenu dans la lumière duodénale au niveau des papilles duodénales majeures et mineures (Kodoma, 1983).

3. Présence de l'amylase et de la lipase pancréatiques dans la circulation sanguine

Outre la présence de l'amylase et de la lipase dans la lumière duodénale clairement indispensable à la digestion et à l'absorption des nutriments, l' α -amylase pancréatique et la triglycéride lipase pancréatique sont aussi naturellement dans la circulation sanguine (Rothman et Grendell, 1983, Isenman *et al*, 1999). La présence de ces enzymes dans le sang est bien documentée au niveau de diverses pathologies (Lott et Carrie, 1991, Isenman *et al*, 1999). En effet, la présence de l' α -amylase sanguine est utilisée comme outil diagnostique en pathologie depuis plus de 50 ans (Janowitz et Dreiling, 1959).

L'un des meilleurs exemples est celui de la pancréatite aigue. Elle est diagnostiquée par des taux circulants élevés et fortement fluctuants de l'amylase et de la lipase pancréatiques (Lott et Carrie, 1991, Isenman *et al*, 1999, Gaisano *et al*, 2004). Les événements cellulaires initiaux associés à la pancréatite sont une régulation anormale de la production, de la maturation et de la sécrétion des zymogènes (Gaisano, 2000). Ces altérations permettent l'accumulation et l'activation des protéases et des phospholipases faisant partie des zymogènes (Steer, 1993, Gaisano, 2000). Ainsi, l'accumulation et l'activation de ces protéines, à la fois dans les vésicules cytoplasmiques et dans l'espace interstitiel, engendrent un dommage cellulaire et la propagation de ce dernier dans le tissu (Steer, 1993, Gaisano, 2000). L'inflammation et la nécrose du pancréas aboutissant au déversement du contenu des cellules acineuses dans la circulation expliquent les

taux sanguins élevés des enzymes pancréatiques lors du développement de la pancréatite (Papp *et al*, 1971, Gaisano, 2000, Takacs *et al*, 2001).

Un autre exemple de pathologie affectant les taux circulants de l'amylase et de la lipase pancréatiques est le diabète (Bendayan et Levy, 1988, Semakula *et al*, 1996). Une déficience en insuline présente dans les cas de diabètes insulino-dépendants est accompagnée d'anormalités au niveau du pancréas exocrine (Lee *et al*, 1995). En effet, en conditions normales, l'insuline exerce une régulation sur l'expression de certains gènes dans les cellules acineuses du pancréas exocrine (Bendayan et Gregoire, 1987, Bendayan et Levy, 1988, Mori *et al*, 2003). Cette régulation par l'insuline s'observe au niveau même du tissu en comparant l'expression de ces gènes dans les cellules acineuses des régions éloignées et en périphérie des îlots de Langerhans (Bendayan et Gregoire, 1987). Ainsi la sécrétion des cellules acineuses en périphérie des îlots semble être plus étroitement contrôlée par un effet paracrine de l'insuline (Gregoire et Bendayan, 1987, Bertelli et Bendayan, 2005). Chez les patients atteints du diabète insulino-dépendant, la production d'amylase diminue (Williams et Goldfine, 1993) alors que celle de la lipase augmente en réponse à la diminution du niveau d'insuline. Ce phénomène est également observable chez les rats dont le diabète est induit par l'alloxane (Mori *et al*, 2003) ou la streptozotocine (Gregoire et Bendayan, 1986, Bendayan et Gregoire, 1987, Bendayan et Levy, 1988, Mori *et al*, 2003). Cette modification de l'expression génétique des deux enzymes est accompagnée d'une modification parallèle des taux sanguins de l'amylase (Mori *et al*, 2003) et de la lipase (Lee *et al*, 1995) sans être le résultat apparent d'une nécrose ou d'une inflammation du pancréas exocrine.

La présence d'activités amylasiques et lipasiques dans le sang fut longtemps attribuée aux autres sources de ces enzymes tel que le foie. Or, plusieurs travaux suggèrent que la lipase pancréatique représente 99% de l'activité enzymatique sanguine (Apple et Preese, 1992, Tietz et Shuey, 1993). Un article paru en 1996 rapporte que l'amylase sérique, chez les individus normaux, est d'origine pancréatique à 40% et d'origine salivaire à 60% (Semakula *et al*, 1996). Ces auteurs montrent que la diminution de l'activité de l'amylase sérique au cours du diabète est exclusivement due à une diminution de l'activité de l'amylase pancréatique alors que l'activité de l'amylase salivaire demeure constante (Semakula *et al*, 1996).

La présence normale de ces enzymes digestives dans le sang fut longtemps considérée comme l'expression d'une "pathologie minimale", une apparition accidentelle due à la détérioration des cellules acineuses ou d'une fuite du canal pancréatique (Rothman et Grendell, 1983). De nos jours, elle est considérée chose normale et non accidentelle bien que toutes significations fonctionnelles de leur présence dans le sang demeurent encore très controversées (Rohr et Scheele, 1983, Rothman et Grendell, 1983).

Plusieurs théories ont été avancées pour expliquer la présence des enzymes pancréatiques dans la circulation sanguine (Miyasaka et Rothman, 1982). Une première théorie, particulièrement populaire, propose l'existence d'une faible sécrétion endocrine constitutive des cellules exocrines du pancréas (Miyasaka et Rothman, 1982). Une seconde théorie propose une fuite du canal pancréatique permettant aux enzymes digestives de rejoindre la circulation sanguine (Isenman *et al*, 1999). Une dernière théorie avance l'idée d'une absorption duodénale des

enzymes pancréatiques (Isenman *et al*, 1999). Diverses données scientifiques appuient l'existence de l'une ou de l'autre de ces voies permettant aux enzymes pancréatiques d'atteindre la circulation sanguine. Aucune d'elles ne démontre véritablement de façon directe, *in vivo* et sous conditions normales l'existence de l'une de ces voies.

4. Sécrétion endocrine du pancréas exocrine

La théorie de la sécrétion endocrine du pancréas exocrine va à l'encontre de la doctrine classique qui conçoit l'existence de deux types de glandes distinctes; d'une part des glandes exocrines qui sécrètent leurs produits dans l'environnement extérieur et d'autre part des glandes endocrines sécrétant leurs produits dans le fluide interstitiel, permettant ainsi aux produits de sécrétion d'atteindre la circulation sanguine.

La théorie de la sécrétion endocrine du pancréas exocrine suppose que la glande exocrine du pancréas soit en réalité un organe duocrine capable de sécréter à la fois dans l'environnement extérieur et dans la circulation sanguine (Isenman *et al*, 1999). Ceci suggère que dans les cellules acineuses il existe une sécrétion prédominante au niveau apical qui vient de la fusion des grains de zymogènes avec cette membrane ainsi qu'une certaine sécrétion au niveau basolatéral de ces cellules (Tietz et Shuey, 1993, Isenman *et al*, 1999). L'existence de cette glande duocrine suscite toujours une grande controverse et reste aussi équivoque et ambiguë que lorsque le concept fit initialement son apparition (Isenman *et al*, 1999, Gaisano *et al*, 2001).

La théorie de la sécrétion endocrine du pancréas exocrine a permis d'expliquer des observations datant des années 30 et 60 sur la variation sanguine de l'activité des enzymes pancréatiques. Ainsi dans les années 30, des chercheurs ont observé une augmentation du taux sanguin de l'amylase lors de la stimulation du pancréas par des agents agonistes cholinergiques (Antopol *et al*, 1934, Schiffrin *et al*, 1936, Tuchman *et al*, 1936). Or, quelques années plus tard, il a aussi été montré que

le taux sanguin d'amylase chez le rat double lorsque celui-ci est nourri, période où la sécrétion du pancréas est stimulée via des agents cholinergiques endogènes (Schneyer et Schneyer, 1960, Isenman *et al*, 1999). Ces premières observations ont été expliquées par une fonction duocrine des cellules acineuses bien qu'elles ne prouvent en rien l'existence d'une sécrétion endocrine par le pancréas exocrine (Isenman *et al*, 1999).

Publiée en septembre 1977, une étude de Isenman et Rothman effectuée sur un pancréas intact de lapin maintenu en culture démontre une sécrétion basolatérale de l'amylase (Isenman et Rothman, 1977). Ce modèle *in vitro* permet de récupérer de manières indépendantes les sécrétions acineuses d'amylase au niveau basolatéral (milieu de culture) et au niveau apical (canal pancréatique). Lors de la mise en culture de l'organe ou lorsque le milieu de culture est renouvelé, une sécrétion de l'amylase est observée au niveau basolatéral et est largement supérieure à la sécrétion apicale des cellules acineuses jusqu'à l'obtention d'un état d'équilibre (Isenman et Rothman, 1977). D'autre part, les auteurs démontrent que lors de l'ajout de l'acétyl- β -méthylcholine, un stimulant cholinergique, la sécrétion apicale ainsi que la sécrétion basolatérale sont augmentées (Isenman et Rothman, 1977). Des expériences complémentaires chez le rat ont démontré *in vitro* (Saito et Kanno, 1973, Miyasaka et Rothman, 1981) et *in vivo* (Papp *et al*, 1981) qu'après stimulation par la cholécystokine-pancréozymine, une hormone gastro-intestinale, il s'ensuit une augmentation d'une sécrétion pancréatique aussi bien apicale que basolatérale.

Bien que ces observations suggèrent la présence d'une sécrétion endocrine du pancréas exocrine, la controverse subsiste. Ces observations de Isenman et

Rothman s'opposent aux résultats obtenus par des études effectuées sur des coupes de pancréas ou sur des cellules pancréatiques isolées. En effet, ces études révèlent l'existence d'un seul type de sécrétion vers le côté apical en conditions de stimulation de la sécrétion (Jamieson et Palade, 1971, Bendayan *et al*, 1985, Scheele *et al*, 1987).

De manière générale, l'utilisation de sécrétagogues pour démontrer une sécrétion basolatérale est questionnée. Des études montrent que ces drogues engendrent des modifications morphologiques et fonctionnelles importantes des cellules acineuses (Adler *et al*, 1983, Scheele *et al*, 1987, Gaisano *et al*, 2001).

En 1983, Adler *et al*, démontrent qu'une stimulation supramaximale par le carbachol, un stimulant cholinergique, est associée à une sécrétion basolatérale (Adler *et al*, 1983). Cette stimulation au-delà des doses dites physiologiquement maximales induit des changements morphologiques et métaboliques tels que la présence d'amas de substances granulaires dans les vacuoles de sécrétion, des phagolysosomes avec des vestiges d'organelles et des signes d'une activité lysosomale accrue (Adler *et al*, 1983). Suite à ces observations, il est accepté que la réponse à la stimulation pancréatique par les sécrétagogues est biphasique (Adler *et al*, 1983, Scheele *et al*, 1987). La première phase, sous stimulation sousmaximale à maximale par les sécrétagogues, est caractérisée par la sécrétion apicale des cellules acineuses et une lumière acineuse remplie de produits de sécrétion (Scheele *et al*, 1987). La seconde phase, sous stimulation supramaximale par les sécrétagogues, est une sécrétion basolatérale des enzymes pancréatiques (Scheele *et al*, 1987). Dans cette étude, Scheele *et al*, démontrent que la stimulation supramaximale est

accompagnée d'une contraction de la lumière acineuse 10 à 15 minutes après stimulation, d'une inhibition de l'activité exocrine au niveau apical et de l'apparition d'exocytose des grains de zymogène à la membrane basolatérale (Scheele *et al*, 1987).

En 2001 et 2004, des études révèlent les événements moléculaires qui prennent place lors de l'infusion de doses supramaximales de cholécystokinine (Gaisano *et al*, 2001, 2004). Elles démontrent qu'une sécrétion basolatérale des enzymes digestives est associée au déplacement de Munc18c de la membrane basolatérale vers le cytosol (Gaisano *et al*, 2001, 2004). Munc18c est une protéine impliquée dans l'inhibition de la fonction des SNAREs au niveau de la membrane basolatérale des cellules acineuses (Gaisano *et al*, 2001, 2004). Ce déplacement de Munc18c permet donc d'activer le mécanisme des SNAREs au niveau de la membrane basolatérale et ainsi permettre la sécrétion des grains de zymogènes au niveau de cette membrane (Gaisano *et al*, 2001, 2004). Les auteurs soulignent que les changements morphologiques observés lors de stimulations supramaximales sont identiques aux changements observés dans les modèles de pancréatites (Gaisano *et al*, 2001, 2004).

5. Fuite du canal pancréatique

La fuite du canal pancréatique a été suggérée comme route d'accès des enzymes pancréatiques à la circulation sanguine. Ce phénomène n'a été que très peu étudié en conditions normales et demeure au stade d'hypothèse. La littérature contient plusieurs données sur la fuite du canal pancréatique lors de pathologies du pancréas (Arendt *et al*, 1996, Lau *et al*, 2001). De manière normale, le canal pancréatique est imperméable aux macromolécules et prévient ainsi le passage des enzymes pancréatiques dans l'espace interstitiel (Arendt *et al*, 1996). Des expériences ont démontré que des perfusions de jus pancréatique activé ou non à basses pressions, dites physiologiques, ne provoquent ni modifications morphologiques, ni modifications de l'intégrité des cellules en bordure du canal (Arendt *et al*, 1996). Des perfusions à hautes pressions sont associées à une modification morphologique des cellules épithéliales sans cependant résulter en une perte d'intégrité. Ceci suggère que des perfusions, même à hautes pressions, ne permettent pas la fuite des enzymes présentes dans le canal pancréatique (Arendt *et al*, 1996).

Des études effectuées chez des patients ont établi qu'un déversement du canal pancréatique est, dans la majeure partie des cas, associé à une pancréatite sévère avec une nécrose du tissu (Lau *et al*, 2001). Ces observations suggèrent donc que la fuite du canal pancréatique est largement associée à des états pathologiques avancés et par le fait même ne constitue pas une route d'accès naturelle permettant aux enzymes digestives d'atteindre le sang (Arendt *et al*, 1996, Lau *et al*, 2001).

La fuite du canal pancréatique, tout comme la sécrétion du pancréas, a été étudiée sous l'effet de sécrétagogues. Des expériences utilisant une culture de cellules dérivées d'un adénocarcinome du canal pancréatique, les cellules CAPAN-1, ont montré l'effet de la sécrétine sur la perméabilité du canal pancréatique aux macromolécules (Rotoli *et al*, 2000). Lors d'une stimulation basolatérale par ce sécrétagogue, il y a augmentation de la perméabilité de la barrière à certaines macromolécules (Rotoli *et al*, 2000). Selon les auteurs, cette augmentation de la perméabilité est associée à des régulations pathophysiologiques des jonctions serrées qui lient les cellules de l'épithélium entre elles (Rotoli *et al*, 2000). Ainsi, l'hypothèse d'une fuite du canal pancréatique permettant aux enzymes digestives d'atteindre la circulation est peu probable en condition physiologique normale.

6. Absorption duodénale de macromolécules

A. Absorption duodénale d'enzymes digestives

L'absorption duodénale d'enzymes digestives est un phénomène décrit depuis les années 60 (Kabacoff *et al*, 1963, Avakian, 1964, Moriya *et al*, 1967, Papp *et al*, 1977). La chymotrypsine est l'une des premières enzymes digestives documentées comme étant absorbées par la muqueuse intestinale (Kabacoff *et al*, 1963, Avakian, 1964, Moriya *et al*, 1967). Des études conduites chez le lapin (Kabacoff *et al*, 1963) et chez l'homme (Avakian, 1964) ont démontré que, suite à une administration soit intraduodénale ou orale de chymotrypsine, il y a augmentation de son activité enzymatique dans la circulation sanguine. De plus, des études effectuées chez le rat ont détecté le passage de chymotrypsine radioactive dans le sang après administration intraduodénale de l'enzyme (Moriya *et al*, 1967). L'importance de ce passage à travers la muqueuse intestinale est mise en évidence chez le lapin où l'activité sanguine de la chymotrypsine suite à son administration intraintestinale est comparable à celle obtenue lors d'une injection intramusculaire (Kabacoff *et al*, 1963). En 1977, des expériences similaires sur la lipase pancréatique ont été menées chez le chien (Papp *et al*, 1977). Dans ces expériences, la sécrétion pancréatique est stimulée à l'aide de la sécrétine et de la cholécystokine-pancréozymine (Papp *et al*, 1977). Cette stimulation permet l'accumulation du jus pancréatique dans le canal, l'accroissement du déversement du jus pancréatique du canal dans la lumière intestinale et donc permet à la lipase pancréatique de se retrouver au niveau de la lumière duodénale en grande quantité (Papp *et al*, 1977). Suite à l'apparition de cette lipase dans la lumière duodénale une augmentation de

l'activité de la lipase pancréatique dans le sang s'ensuit (Papp *et al*, 1977). Comme mentionné plutôt, l'utilisation de sécrétagogues pour stimuler la sécrétion pancréatique peut être accompagnée d'une sécrétion basolatérale des cellules acineuses et donc d'une augmentation des taux sanguins des enzymes pancréatiques. Pour éviter cette interprétation de l'augmentation de la lipase pancréatique dans le sang, les auteurs évaluent non seulement l'activité sanguine de l'enzyme mais aussi son activité au niveau de la lymphe duodénale (Papp *et al*, 1977). L'augmentation de l'activité au niveau de la lymphe duodénale vient appuyer l'idée du passage via la muqueuse duodénale (Papp *et al*, 1977).

Bien qu'aucune de ces expériences ne démontre de façon directe la voie empruntée par ces protéines au niveau de la muqueuse intestinale pour parvenir à la circulation sanguine, la publication de ces divers articles amène la notion que l'absorption des enzymes digestives par la muqueuse intestinale est chose possible, ce qui expliquerait la présence de ces enzymes dans le sang.

B. Voies cellulaires permettant l'absorption duodénale de macromolécules

La littérature décrit différentes voies possibles d'internalisation de protéines par la muqueuse intestinale. Les deux voies principales sont les voies paracellulaires et transcellulaires (Figure 1) (Verhoef *et al*, 1990, Artursson, 1991, Smith *et al*, 1992, Wang, 1996, Sood et Panchagnula, 2001). La voie paracellulaire consiste en un passage des macromolécules entre les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale. La voie transcellulaire, ou un passage au travers des cellules absorbantes, est subdivisée en différentes voies alternatives (Smith *et al*, 1992) impliquant différents mécanismes de transcytose cellulaire:

- diffusion passive (Wang, 1996, Sood et Panchagnula, 2001),
- transporteur dépendant (Wang, 1996, Sood et Panchagnula, 2001),
- endocytose ou pinocytose non spécifique (Weiner, 1988, Wang, 1996),
- endocytose spécifique.

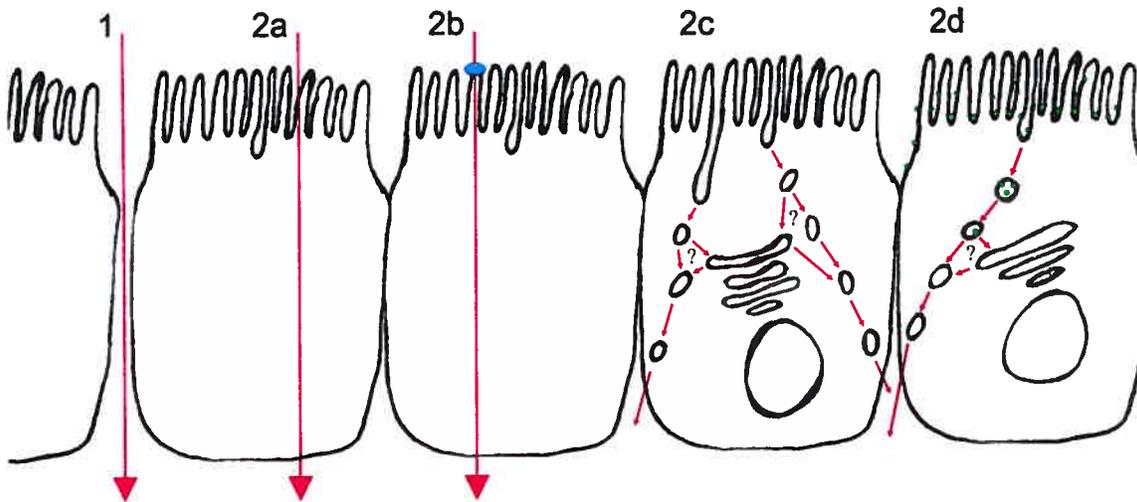


FIGURE 1: Voies cellulaires de l'absorption duodénale. **1**, la voie paracellulaire implique le passage entre les entérocytes qui bordent la lumière duodénale. Elle implique donc le passage des macromolécules au travers les jonctions serrées. **2**, les voies transcellulaires. **2a**, la diffusion passive est le passage des macromolécules à travers la membrane apicale et un passage vers la membrane basolatérale. **2b**, l'internalisation **transporteur**-dépendante implique l'interaction avec un **transporteur** de la membrane apicale et un transport des macromolécules vers l'intérieur de la cellule suivi d'un passage vers la membrane basolatérale. **2c**, à gauche, la pinocytose, présente une structure canaliculaire. À droite, l'endocytose non-spécifique. Tous deux permettent l'internalisation non-spécifique des macromolécules et le transport vésiculaire vers la membrane basolatérale. **2d**, l'endocytose spécifique implique un **récepteur** qui reconnaît la macromolécule, et qui permet son internalisation dans les vésicules et son passage à la membrane basolatérale. Les signes d'interrogation indiqués (?) soulèvent la question de l'intervention et de la fonction de l'appareil de Golgi dans l'internalisation des macromolécules.

La muqueuse intestinale est constituée d'une monocouche de cellules épithéliales supportées par la lamina propria et par la muscularis mucosae (Wang, 1996, Sood et Panchagnula, 2001). On distingue trois types de jonctions entre les cellules épithéliales: les jonctions serrées, les desmosomes (Figure 2) et les gap jonctions (non illustrées) (Sood et Panchagnula, 2001).

Les jonctions serrées permettent de différencier le pôle apical du pôle basolatéral et constituent une barrière très efficace au passage des macromolécules entre ces cellules (Moog, 1981, Madara, 1987, Swenson et Curatolo, 1992, Sood et Panchagnula, 2001). Certaines pathologies ou drogues affectant l'intégrité de ces jonctions permettent le passage de macromolécules (Swenson et Curatolo, 1992, Sood et Panchagnula, 2001). Ainsi on observe des variations de la perméabilité intestinale chez les individus atteints d'arthrite rhumatoïde, d'intolérances ou d'allergies alimentaires, de maladies infectieuses ainsi que chez les individus faisant l'usage de drogues anti-inflammatoires (Dagci *et al*, 2002).

En conditions normales, en raison de l'étanchéité que procurent les jonctions serrées, la voie transcellulaire est la voie la plus probable pour le passage des macromolécules.

La diffusion passive des macromolécules à travers la membrane apicale est peu vraisemblable. Cette membrane constitue une barrière physique efficace entre la lumière intestinale et l'intérieur de la cellule (Swenson et Curatolo, 1992).

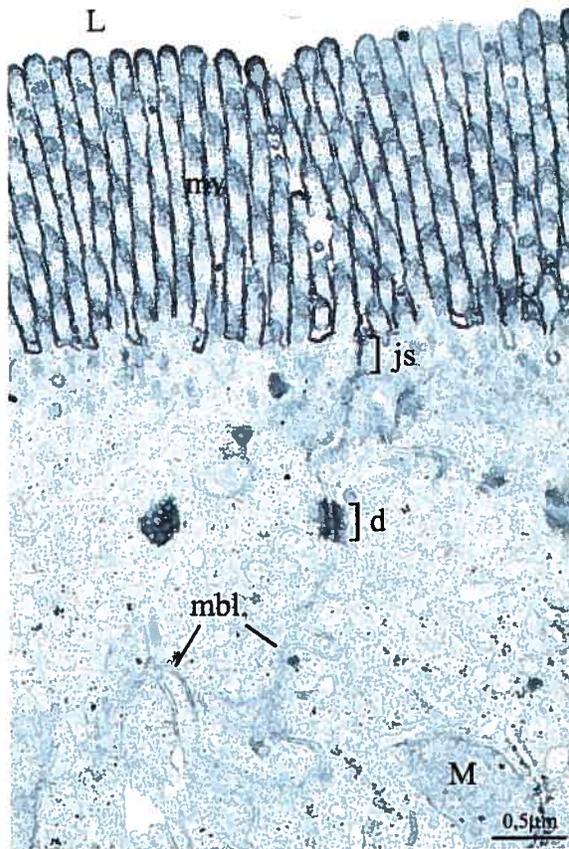


FIGURE 2 : Muqueuse intestinale de rat. Cette figure montre des cellules entérocytaires polarisées avec une bordure en brosse formée des microvillosités (mv). Cette figure montre deux types de jonctions entre les cellules. Les jonctions serrées (js) permettent la séparation de la portion apicale et de la portion basolatérale de la cellule. Les desmosomes (d) permettent l'attachement cellulaire, ils permettent le rapprochement de membrane basolatérale (mbi) de cellules adjacentes et l'interaction du cytosquelette de ces cellules. Lumière intestinale (L), mitochondrie (M).

Le transport de macromolécules via des transporteurs est aussi peu probable. Cette voie a été identifiée dans le transport de di- et tripeptides ainsi que de β -lactam et donc dans le transport de petites molécules (Smith *et al*, 1992). La transcytose via des transporteurs reste peu vraisemblable dans le cas de macromolécules puisque les transporteurs doivent lier ces dernières mais surtout les transposer au niveau intracellulaire.

L'endocytose non-spécifique consiste en une endocytose du milieu extérieur et permet l'absorption des protéines environnant la membrane au moment de l'événement (Wang, 1996). L'endocytose spécifique permet de son côté l'internalisation de protéines suite à leur association avec des composantes membranaires telles que les récepteurs (Wang, 1996). Une fois dans les compartiments endosomaux, les protéines sont dirigées vers la membrane basolatérale en effectuant ou non un passage par l'appareil de Golgi.

C. Évidences directes d'absorption de macromolécules par la muqueuse intestinale

L'une des premières évidences directes de l'absorption de macromolécules par la muqueuse intestinale date de 1966 (Bockman et Winborn, 1966). Des expériences ont démontré que la ferritine est absorbée par la muqueuse intestinale via une voie endocytotique chez le hamster (Bockman et Winborn, 1966). Des images en microscopie électronique révèlent l'enzyme dans des invaginations de la membrane apicale, au niveau des compartiments multivésiculaires et de l'appareil de Golgi (Bockman et Winborn, 1966). Cette étude démontre aussi une absorption accrue de la ferritine chez l'animal immunisé contre cette protéine (Bockman et Winborn, 1966). Ces expériences ont été répétées au niveau du côlon chez le rat, la souris et le cochon d'Inde par Barbour et Hopwood en 1983. Ces auteurs ajoutent que la ferritine est internalisée via des vésicules mantelées ou non (Barbour et Hopwood, 1983). L'internalisation via les vésicules mantelées suggère une internalisation par endocytose spécifique et donc l'implication d'un récepteur (Barbour et Hopwood, 1983).

D'autres études ont démontré que la peroxidase de raifort (HRP) est aussi internalisée via une voie endocyttaire (Cornell *et al*, 1971). En microscopie électronique, l'enzyme est perçue au niveau apical des cellules entérocytaires dans des structures canaliculaires, dans des vésicules et structures vacuolaires pour ensuite être observée dans le milieu extracellulaire, le sang et la lymphe (Cornell *et al*, 1971). L'internalisation de la HRP se fait donc via une pinocytose qui lui permet d'atteindre la circulation sanguine (Cornell *et al*, 1971). Contrairement aux études

sur la ferritine, son absorption est réduite suite à l'immunisation (Walker *et al*, 1972).

En 1987, les premières évidences *in situ* proposant une absorption de l'insuline par la muqueuse intestinale ont émergé, menant dans les années 90, à une démonstration directe de ce phénomène (Ziv *et al*, 1987, Bendayan *et al*, 1990, 1994). Dans ces derniers articles, l'insuline est identifiée au niveau des compartiments endosomaux, de l'appareil de Golgi et des interdigitations de la membrane basolatérale des cellules du duodénum, de l'iléon ainsi que du côlon (Bendayan *et al*, 1990, 1994). Cette hormone est aussi présente dans l'espace interstitiel et dans les capillaires sanguins et conduit, une fois dans la circulation, à une diminution des taux de glucose sanguin (Bendayan *et al*, 1994).

En 1998, toujours dans notre laboratoire, des études sur la BSDL (bile salt-dependent lipase) ont été entreprises. La BSDL tout comme l'amylase et la lipase est une enzyme digestive sécrétée de façon exocrine par le pancréas. Des travaux ont démontré que cette enzyme est internalisée par la muqueuse intestinale via une voie endosomale (Bruneau *et al*, 1998). En 2001 et 2003, des travaux effectués avec un modèle de cellules intestinales humaines, les INT407, ont démontré que la BSDL fait un passage par l'appareil de Golgi avant d'être dirigée à la membrane basolatérale (Bruneau *et al*, 2001), et que son internalisation est facilitée grâce à son interaction avec un récepteur, le «lectin-like Ox-LDL receptor» (Bruneau *et al*, 2003b).

9. Le travail

Ce que nous venons d'exposer avait comme but de soulever la question de la voie d'accès de deux enzymes digestives à la circulation sanguine. La littérature décrit largement l'amylase et la lipase au niveau de la génétique, de la protéomique, de l'enzymologie ou des pathologies associées. Il demeure que leur présence dans la circulation sanguine reste mal expliquée. À la lumière des données de la littérature sur l'absorption des macromolécules par la muqueuse intestinale, nous suggérons de vérifier l'existence d'une voie duodénale par laquelle l'amylase et la lipase pancréatiques seraient capables, à partir de leur site de production, de parvenir à la circulation sanguine.

À titre d'introduction, voici le survol des différentes expériences effectuées ainsi que les techniques utilisées pour l'étude de l'absorption duodénale de l'amylase et de la lipase pancréatiques. Pour étudier l'absorption de ces enzymes par la muqueuse intestinale, nous avons fait usage de trois conditions expérimentales: des rats nourris et à jeun, des rats dont nous avons stimulé la sécrétion pancréatique et des rats auxquels nous avons fait une insertion intraduodénale des enzymes. Ces trois expériences avaient pour but d'augmenter les concentrations d'enzymes dans la lumière duodénale.

Les rats à jeun et nourris nous ont permis de détecter de manière directe des différences entre ces deux états de sustentation au niveau de l'activité enzymatique dans le sang et de la présence dans la muqueuse intestinale de l'amylase et de la lipase.

La stimulation de la sécrétion pancréatique par le carbachol nous a permis d'augmenter la concentration d'amylase et de lipase dans la lumière intestinale chez les animaux afin de a) favoriser l'internalisation des enzymes et donc accroître le signal produit par la détection de ces enzymes au niveau de la muqueuse intestinale par immunofluorescence et b) d'augmenter les taux sanguins des deux enzymes tout en restant dans des conditions physiologiques.

La troisième expérience avec l'insertion de solutions d'amylase ou de lipase étiquetées au FITC, nous a permis d'augmenter d'avantage la concentration intraduodénale des enzymes. La présence du FITC a permis de suivre la progression dans le temps des enzymes à travers la muqueuse et de les distinguer des enzymes endogènes potentiellement présentes dans la muqueuse intestinale. Cette troisième expérience vient appuyer les résultats obtenus par la stimulation de la sécrétion pancréatique des rats en levant l'ambiguïté que peut engendrer l'usage des sécrétagogues pour les raisons mentionnées au préalable. L'étude de ces trois groupes nous a permis de générer des résultats et de tirer des conclusions cohérentes. De plus, l'utilisation de diverses techniques nous a permis de vérifier et de renforcer nos différentes observations.

L'ensemble des techniques utilisées sont: des analyses de cinétique pour la quantification des activités enzymatiques dans le sang, l'immunofluorescence et l'immunoperoxidase en microscopie optique, les techniques à l'or colloïdal en microscopie électronique, ainsi que des immunobuvardages. Les analyses de cinétique des enzymes dans la circulation sont des techniques utilisées de manière habituelle pour le diagnostic de pathologies touchant le pancréas. Lors de notre

étude, elles ont fourni une manière facile et rapide d'évaluer la variation des taux sanguins de l'activité enzymatique de l'amylase et de la lipase et donc de donner rapidement des renseignements sur le passage de celles-ci de la lumière intestinale à la circulation. Les techniques en microscopie optique nous ont permis d'identifier la présence des enzymes dans la muqueuse intestinale. Elles offrent une vue générale du tissu permettant l'identification rapide de la région d'intérêt. Elles assurent aussi une plus grande sensibilité puisqu'elles s'adressent à une coupe assez épaisse de tissu et donc amplifient le signal. De plus, la microscopie optique nous a permis d'observer directement la fluorescence émanant du FITC lié à nos enzymes dans la muqueuse et de confirmer nos observations en faisant appel à l'immunoperoxydase. Pour sa part, l'usage de la microscopie électronique permet d'identifier la localisation intracellulaire des enzymes dans la muqueuse et donc de caractériser la voie de passage des enzymes dans les cellules entérocytaires. En plus de ces techniques, nous avons utilisé des immunobuvardages pour la détection du FITC et des enzymes dans le sang. Cette technique permet de vérifier que le FITC dans le sang est toujours lié aux enzymes et donc que les observations du FITC sont bien reliées au passage de l'amylase et de la lipase dans la muqueuse.

L'ensemble des résultats est illustré et discuté dans l'article qui suit. Ainsi, nous avons démontré la présence des deux enzymes dans la muqueuse intestinale de rats nourris et une augmentation de celles-ci sous stimulation de la sécrétion pancréatique. Parallèlement nous avons démontré que les niveaux d'activités sanguines fluctuent en fonction de la présence de l'amylase et de la lipase dans la lumière et dans la muqueuse duodénale. Les expériences effectuées avec le FITC ont

permis d'établir la voie empruntée par les enzymes pour franchir la muqueuse intestinale. Ainsi l'amylase et la lipase sont internalisées par voie endosomale au niveau de la bordure en brosse des entérocytes. De la membrane apicale les enzymes sont transférées à la membrane basolatérale. L'amylase ainsi que la lipase sont identifiées dans l'appareil de Golgi de ces entérocytes. Une fois dans l'espace interstitiel, l'amylase et la lipase gagnent la circulation sanguine via les vésicules présentes dans les cellules endothéliales qui bordent les capillaires sanguins.

ARTICLE

(Accepté pour publication dans Journal of Histochemistry and Cytochemistry,
février 2006)

Running Headline: AMYLASE AND LIPASE INTERNALIZATION BY
ENTEROCYTE

Internalization and transcytosis of pancreatic enzymes by the intestinal mucosa

Maryse Cloutier, Diane Gingras, Moïse Bendayan

Department of Pathology and Cell Biology, University of Montreal

Montreal, Quebec, Canada

Mailing address: Dr Moïse Bendayan

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université
de Montréal

C.P. 6128 Succursale Centre Ville, Montréal, Québec, Canada

H3C 3J7

Telephone number: (514) 343-6289

Fax number: (514) 343-5755

E-mail adresse: 

Abstract

As early as the beginning of the 20th century some data indicated that macromolecules can cross the intestinal mucosa to reach the blood. Further evidence was added along the years however, pathways for this transport still remain to be established. We herein report the transfer of two pancreatic enzymes, amylase and lipase, from the intestinal lumen to the blood. Both are present in higher concentrations in the intestinal mucosa and in blood of fed rats. Upon cholinergic stimulation of pancreatic secretion, not only enzymes concentrations in blood rose but evidence for internalization by duodenal enterocytes was obtained. Following insertion of fluorochrome-tagged amylase and lipase into the duodenal lumen of fasting rats, blood and intestinal tissues were sampled at different time points. Serum activities for both enzymes clearly increased with time. Light microscopy established internalization of both proteins by duodenal enterocytes and immunogold outlined the pathway taken by both proteins across the enterocytes. From the intestinal lumen, the enzymes are channelled through the endosomal compartment to the Golgi apparatus and to the basolateral membrane reaching the interstitial space and blood circulation. Thereby, transcytosis through the intestinal mucosa represents an access route for pancreatic enzymes to reach blood circulation.

Keywords: Amylase, Lipase, Duodenal wall, Pancreas, Transcytosis,

Immunocytochemistry

Introduction

Pancreatic α -amylase and lipase are digestive enzymes secreted by the exocrine pancreas into the acinar lumen and channeled along the pancreatic duct to the duodenal lumen where they participate in the digestion of macromolecules.

Pancreatic lipase, together with co-lipase, represents the main player in lipid digestion since it hydrolyzes more than 70 % of triglycerides and diacylglycerols (Marcil et al. 2004). On the other hand, α -amylase is responsible for α -(1,4) glycosidic linkage hydrolysis of starch molecules and various oligosaccharides (MacDonald et al. 1980; Qian et al. 1997; Payan and Qian 2003).

Both pancreatic amylase and lipase are found in blood (Janowitz and Dreiling 1959; Yacoub et al. 1969; Rohr and Scheele 1983). Their presence in circulation is a well-established fact and their levels fluctuate under several conditions. Pancreatitis, a pathological situation often diagnosed through plasma levels of amylase and lipase, is characterized by dramatic increases in the level of circulating pancreatic enzymes (Ujihira et al. 1965; Yacoub et al. 1969; Rohr and Scheele 1983; Tietz and Shuey 1993). This is due to an abnormal discharge of zymogen granules at the level of the basolateral membranes of acinar cells (Gaisano et al. 2004). More interestingly, in diabetes, the pancreatic secretion of amylase and lipase undergoes major changes which do influence circulating levels. These changes take place without any apparent alteration or discharge at the basolateral pole of the acinar cells (Barneo et al. 1990). In fact, in diabetes, production of both pancreatic amylase and lipase fluctuate; amylase secretion decreases dramatically while lipase secretion increases two fold (Bazin and Lavau 1979; Gregoire and Bendayan 1986; Bendayan and

Gregoire 1987; Bendayan and Levy 1988; Barneo et al. 1990). Blood levels closely follow those changes (Ujihira et al. 1965; Barneo et al. 1990). Moreover, variations in circulating amylase and lipase also occur in normal condition. A relationship actually exists between circulating levels of digestive enzymes and the feeding state of the animal (Isenman et al. 1999). Digestive activity, intestinal motility and pancreatic secretory activity being regulated by the same hormonal and neural mediators are directly interconnected (Keller and Layer 2002) and therefore blood levels of amylase and lipase are higher in fed than in fasted animals.

Even though a correlation clearly exists between pancreatic amylase and lipase exocrine secretion and their levels in circulation, the pathways by which these digestive enzymes reach the blood remain largely unknown (Isenman et al. 1999). Several hypotheses were put forward over the years. Among these, an endocrine secretion of the exocrine pancreas at the basolateral membrane of the acinar cells (Janowitz and Dreiling 1959; Tietz and Shuey 1993; Isenman et al. 1999) and a leakage across the pancreatic duct wall were proposed (Isenman et al. 1999). A third possibility would be a paracellular passage of intestinal luminal content through leaking junctional complexes; a possibility suggested by in vitro studies using Caco-2 cells (Bock et al. 1998). However, conclusive evidence for such pathways remains to be demonstrated.

The present study proposes an alternative route of access for these enzymes to reach the blood circulation. This pathway would consist in the absorption of lipase and amylase by the intestinal mucosa followed by transcytosis through the enterocyte to reach the intestinal subepithelial space. The capability of intestinal enterocytes to

absorb and transport intact macromolecules has been considered as the characteristic of the intestinal tissue of embryo and newborn (Sandborn et al. 1975; Udall et al. 1981). It is also a characteristic of pathologies affecting the digestive tissue integrity (Weiner 1988). Nowadays however, the absorption of proteins by enterocytes and their transport to the basolateral pole could be considered as a rather normal physiological process that takes place in intestinal tissue of adult animals (Cornell et al. 1971; Warshaw et al. 1971; Bendayan et al. 1990, 1994; Bendayan 2000; Ziv and Bendayan 2000; Bruneau et al. 2003a). Indeed, we have previously demonstrated that insulin (Bendayan et al. 1990, 1994) and the pancreatic bile salt dependant lipase (BSDL) (Bruneau et al. 1998, 2001, 2003a) are internalized by enterocytes and transferred without degradation to the blood circulation.

The first evidence for the intestinal absorption of insulin was reported in 1987 (Ziv et al. 1987). The pathway undertaken by insulin to get from the intestinal lumen, through the enterocyte, to the blood circulation was later on established (Bendayan et al. 1990, 1994; Ziv and Bendayan 2000). BSDL, a pancreatic lipase, was also demonstrated to gain the blood circulation through enterocytes (Bruneau et al. 1998, 2003a).

The present study lays bare that this physiological internalization by enterocytes is a more general phenomenon also occurring for pancreatic amylase and lipase in normal in vivo conditions. We have demonstrated that circulating levels of enzymes are related to their presence in the intestinal lumen, that internalization of amylase and lipase by enterocytes takes place and that progression of the absorbed enzymes along a transcytotic pathway allows them to reach the blood circulation.

Materials and Methods

Antibodies

Primary antibodies were: rabbit anti-human salivary α -amylase (Sigma Aldrich, Oakville, Canada), rabbit anti-fluorescein isothiocyanate (FITC) (Dakopatts, Glostrup, Denmark) and sheep anti-human lipase (United States Biological, Swampscott, MA). Secondary antibodies for light microscopy were anti-goat IgG conjugated to crystalline tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) and anti-rabbit IgG-FITC (Chemicon International, Temecula, CA). For the immunoperoxidase we used, the rabbit anti-goat IgG conjugated to peroxidase (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). For electron microscopy, we used anti-goat IgG-gold complex (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) and protein A-gold complex prepared with 10 nm gold particles as described previously (Ghitescu and Bendayan 1990). For immunoblots, an anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Canada) was used.

Amylase and Lipase-FITC Experiments

Enzymes were tagged with FITC (Fluorescein Isothiocyanate, Isomer I from Sigma Aldrich) according to methods described previously (Bendayan and Londoño 1996). 60 mg of α -amylase (Type II-A, Bacillus Species, Sigma Aldrich) together with 110 mg of FITC and in parallel 2.5 mg of lipase (Type VI-S, porcine pancreas, Sigma Aldrich) with 4 mg of FITC were mixed in 5 mL of 5mmol sodium bicarbonate overnight protected from light at room temperature. Extensive dialysis against distilled water was carried out to remove free FITC, followed by a final step against

sodium bicarbonate buffer. The solutions introduced into the duodenal lumen were constituted as follow: 0.18 TIU of aprotinin (Sigma Aldrich), 0.01g of sodium cholate (Sigma Aldrich) and 10,000 IU of α -amylase tagged with FITC or 10,000 IU of lipase tagged with FITC in 5mmol sodium bicarbonate to a final volume of 1mL, according to Ziv (Ziv et al. 1987). As control experiments we introduced 1 ml of a solution containing 0.18 TIU of aprotinin and 0.01 g of sodium cholate in 5 mmol sodium bicarbonate with neither amylase nor lipase.

Animal Experimentation

Males Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St. Constant, Canada) weighing between 200 and 250g were used for all experiments. Animals were housed and handled according to the guidelines from Canadian Council on Animals Care. They were kept on a standard diet with free access to food and water. Rats were fasted for 12 hours before the experiments. Rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of urethane (1g/kg bw).

Stimulation of pancreatic secretion

An abdominal incision was made. Two clamps were placed onto the duodenum, one at the level of the pyloric sphincter and the second one downstream of the ampulla of Vater, to create a sealed chamber. Stimulation of secretion was carried out by a single IP injection of 12mg/kg of carbamyl β -methylcholine chloride (carbachol) (Sigma Aldrich) to fasted animals n=3 (Bendayan et al. 1985). Samples of blood (150-200 μ l) from the dorsal vein and duodenal tissues (4 mm thick rings) were taken, one before and one after (15 minutes) stimulation. Tissues at time point 0

were sampled outside the sealed chamber. Samples of pancreatic tissues (about 5 mm³) were taken at 15 minutes to evaluate tissular and cellular integrity.

Insertion of amylase and lipase in the duodenal lumen

An abdominal incision was made. A 1mL solution of amylase-FITC (10,000 IU equivalent to 87 nmol) or lipase-FITC (10,000 IU equivalent to 8.5 nmol) was inserted into the lumen of the clamped duodenum. Samples of blood and duodenal tissues were taken at different time points: prior insertion of the solution (0 minute) and 5, 15, 30 and 60 minutes after the insertion of the solution.

Each experiment was performed at least 3 times with 3 different animals.

Tissue Processing

Light Microscopy

Duodenal tissues were fixed in Bouin's solution for 24 hours at room temperature and embedded in paraffin according to standard procedures. Tissue sections (5µm) were mounted on glass slides and processed for immunohistochemistry.

Electron Microcopy

Rat duodenal as well as pancreatic tissues were fixed with 1% glutaraldehyde and post-fixed with 1% osmium tetroxide in 0.1M phosphate buffer for 90min at 4C. The tissue samples were washed in phosphate buffer, dehydrated in graded ethanol and propylene oxide and embedded in Epon 812. Ultrathin tissue sections were cut, mounted on Parlodion and carbon-coated nickel grids and processed for immunocytochemistry.

Immunohistochemistry

For the direct detection of FITC-tagged enzymes, tissue sections were deparaffinized, rehydrated and washed in 0.01M phosphate buffer saline (PBS).

Tissue sections were counterstained with Evan Blues (0.01% in PBS), mounted with a coverslip using a 50% glycerol in PBS solution and examined using a Leitz DMRB light microscope (Leica, St-Laurent, Canada).

For the immunodetection of amylase antigenic sites, tissue sections were rehydrated and incubated 2 hours at room temperature (RT) with the anti-amylase antibody (dilution: 1/300), washed in PBS, and incubated 1 hour with the anti-rabbit IgG-FITC (dilution: 1/250). For lipase immunodetection, the anti-lipase antibody was used at 1/100 dilution, followed by 1 hour with the anti-goat IgG-TRITC (dilution: 1/200).

Specificity of both antibodies was assessed by immunoblot as well as by immunocytochemistry, adsorbing them with their corresponding antigens (24h at 4C) prior performing the immunostainings. Adsorption led to absence of labeling. Omitting the primary antibodies also resulted in absence of specific labeling. In addition, both the anti-amylase and anti-lipase antibodies yield specific stainings on pancreatic tissue sections (results not shown)

For the immunoperoxidase technique, lipase detection was carried out by a 2 hours incubation with the anti-lipase antibody (dilution: 1/100) followed by a 1 hour incubation with anti-goat IgG-peroxidase (dilution: 1/200) and a 2 minutes

incubation with the DAB peroxidase substrate, all at RT. Omission of the primary antibody resulted in absence of staining.

For electron microscopy, anti-amylase (dilution: 1/300), anti-FITC (dilution: 1/250) and anti-lipase (dilution: 1/100) were used as primary antibodies. Incubations were of 2 hours at RT followed by a 30 minutes incubation with protein A-gold (dilution: 1/10) or with the anti-goat IgG-gold (dilution: 1/15) (Bendayan 1995). Tissue sections were pretreated with sodium metaperiodate (Bendayan 1995). Tissue sections were stained with uranyl acetate and examined using a Philips 410 electron microscope. Adsorption of the antibodies with their corresponding antigen resulted in absence of labeling.

Evaluation of the labelings

Morphometrical evaluation of the labelings obtained by immunogold using anti-FITC antibody was performed using Videoplan 2 image processing system (Carl Zeiss, Toronto, Canada). Immunogold densities over cell compartments for both amylase-FITC and lipase-FITC at each time point were evaluated as described previously (Bendayan 1995). At least 50 micrographs at X 12000 magnification were analyzed for each experiment at each time point. Results are reported as mean values; number of gold particles per $\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$. Microvilli as well as basolateral membranes are tightly associated among themselves. The basolateral membranes in particular make several foldings and interdigitations. Thus their labelings were evaluated in reference to their area rather than to their length.

Western Blot Analysis

Presence of lipase-FITC and amylase-FITC in sera was demonstrated by migration of serum samples in 7 % SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), followed by immunoblot 2 hours at RT with the primary antibody, either anti-amylase (dilution: 1/10000) or anti-FITC (dilution: 1/35000), and 1 hour incubation at RT with anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase antibody (dilution: 1/20000). Detection was carried out after 1 minute incubation with Lumina-Light^{PLUS} substrate (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Canada).

Biochemical Analysis

The Intersect System, Direct Amylase Reagent (Intersect Systems, Inc., Longview, WA) was used to assess serum amylase activity. The Intersect System is intended for the quantitative kinetic determinations of serum α -amylase activity at 405 nm. 25 μ l of serum was added to 1 ml of Direct Amylase Reagent. 60 seconds later the absorbance was registered followed by a second reading 60 seconds later. The incubations were carried out at 37C. Serum lipase activity was measured using Trinity Biotech for Lipase (Trinity Biotech, Lipase-PSTM Method n°805, Jamestown, NY). The lipase-PSth system is intended for the quantitative kinetic determination of serum pancreatic lipase activity at 550 nm. 15 μ l of serum was added to 900 μ l of the substrate solution. 300 μ l of the activator reagent were added 3 min later. An initial absorbance reading was taken 3 min later and a final one, 2 min after. The incubations were carried out at 37C. All controls for enzymes assays were carried

out using Accutrol-TM Normal (Sigma Diagnostics, Oakville, Canada). Results are reported as mean values of serum activities \pm SEM. All statistics for morphological and biochemical data were carried out using the Student t test.

Results

A) Amylase and lipase in fasted and fed rats

Biochemical Study

Amylase and lipase activity in blood sampled at 10 AM was measured in fasted and ad libitum fed rats. Activities for both enzymes were found to be higher in fed animals. Serum amylase activity for rats on a standard diet was 253 ± 20.5 IU/L as compared to 12 hours fasting 64 ± 22.4 IU/L ($n=7$) which represents about 300% increase upon feeding. Lipase activity in fed rats was 153 ± 49.0 IU/L versus 73 ± 14.5 IU/L ($n=9$) for fasted animals, representing an increase of 110%. (Student t test, $p < 0.01$).

Immunofluorescence

Presence of amylase and lipase in the intestinal mucosa of fasted and fed rats was assessed by immunofluorescence. Figure 1 illustrates the presence of amylase in the duodenal tissue. A very faint staining over the brush border was detected in tissues of fasted rats (figure 1A) and a stronger signal in tissues of the fed ones (figure 1B). Few positive cells were located at the tip of the villi (figure 1B). Similar staining experiment was carried out for lipase. For the fed rats, a strong staining was present over the brush border and in the supranuclear region of some cells located at the tip of the villi. Staining was also present in the connective tissue (figure 1C). For the fasted animals the staining was only faint and restricted to small areas of the brush border (not illustrated).

B) Amylase and lipase in rats that underwent cholinergic stimulation of pancreatic secretion

Biochemistry

Serum samples were assessed and activities for both enzymes were found to increase. Average serum amylase activity 15 minutes after stimulation was 117 ± 9.9 IU/L (n=3) representing an increase of 85% when compared to time 0 (63 ± 5.7 IU/L, n=3) (Student t test, $p < 0.01$). Under the same condition, serum activity of lipase after 15 minutes of stimulation was 458 ± 85.1 IU/L (n= 3), an increase of 660% when compared to lipase activity in fasted animals (60 ± 9.8 IU/L, n=3). (Student t test, $p < 0.01$).

Immunofluorescence

Immunodetection of amylase and lipase in duodenal tissue after stimulation of pancreatic secretion yield a strong staining over the intestinal mucosa. Figure 2 illustrates duodenal tissue 15 minutes after stimulation. Duodenal enterocytes positive for amylase are present at the tip of the villi with staining at the apical and basal regions of the cells (figure 2A). Not all positive cells display the same staining intensity and many were negative (figure 2B). Lipase immunostaining yield very similar results (figure 2C).

Pancreatic Integrity

Microscopical examination of pancreatic tissue of animals injected with carbachol was carried out by light and electron microscopy to assess any morphological changes. No major alteration was noticed (data not shown). Acinar cells remained intact and well polarized. In large population of cells, the zymogen granules were

few in number when compared to control tissue, and they remained around the acinar lumina which were filled with secretory product. Other cells display their usual morphology and retained numerous zymogen granules. Totally degranulated cells or cells with altered polarity were not encountered.

C) Insertion of FITC-tagged pancreatic enzymes in the intestinal lumen

To further establish amylase and lipase internalization by enterocytes, solutions of exogenous amylase and lipase tagged with FITC were inserted into the duodenal lumen. Tissues were sampled at different time points and examined by light and electron microscopy.

Fluorescence

In a first experiment, amylase-FITC and lipase-FITC were directly revealed in duodenal tissues by detecting the FITC signal avoiding any antibody-antigen reaction. No FITC signal was detected in tissues before insertion of the enzyme-FITC solutions in the intestinal lumen (figure 3A). After insertion of amylase-FITC, a signal was detected in the duodenal lumen and in many enterocytes. The progression of the staining within the cells was monitored along with time. At 15 minutes, signal was found mainly associated with the luminal material and the brush border of the cells (figure 3B). A more intense signal over the apical supra-nuclear region and then also over the basal region of the cells appeared at 15 and 30 minutes (data not shown). The signal persisted at 60 minutes at time where the connective tissue was also stained (figure 3C). Similar results were obtained for lipase-FITC. No FITC signal was detected in tissues before the insertion of the lipase-FITC

complex (Figure 4A). Figure 4B shows a duodenal tissue 5 minutes after insertion of lipase-FITC, staining is present in the lumen and brush border. Few cells appear stained. At 15 minutes, the FITC signal was over the brush border as well as in the apical region of the cells (figure 4C). At 30 minutes, the basal regions of the cells became stained (figure 4D).

Immunoperoxydase

To further confirm the results obtained with direct detection of FITC, we used the immunoperoxydase technique with an anti-amylase and an anti-lipase antibody to reveal the enzymes in the intestinal mucosa. Figure 5 illustrates results obtained for lipase-FITC. Time 0, before insertion of the lipase-FITC in the lumen, the tissue section is devoid of any immunostaining (figure 5A). At 5 minutes, the staining is associated with the brush border (figure 5B). At 30 minutes, the staining is present over the brush border, supra nuclear and basal regions of the enterocytes (figure 5C). Finally at 60 minutes, a strong signal is present over the cytoplasm of the enterocytes as well as in the connective tissue (figure 5D). As an important observation, the mucus Goblets cells remained free of any staining at all time points. Similarly, all nuclei were devoid of staining. Another point to raise is the fact that not all cells show the same intensity of staining; the cells located at the tip of the villi displaying a more intense staining (figure 5C and D).

Electron Microcopy

At the electron microscope level using the immunogold approach we were able to identify the enterocyte cellular compartments involved in the internalization of amylase and lipase. Tissues sampled at all time points after exposure to amylase-

FITC or lipase-FITC were processed for the immunodetection. Gold particles revealing FITC antigenic sites were found over the microvilli, endosomal compartment (figure 6A and B), Golgi apparatus and related vesicles as well as at the level of the basolateral membrane (figures 6C and 7). This immunolabeling distribution was systematic at all time points, beside at time 0 where no specific labeling was found. Changes in intensity of labeling among cellular compartments were however noticed between time points. This was better assessed by the quantitative evaluations. Observation of particular importance was made at 60 min, where significant labeling for both the amylase-FITC and the lipase-FITC was also found in the interstitial space, endothelial plasmalemmal vesicles and in the blood capillary lumen (figure 8). Very similar qualitative results were obtained for amylase (figure 6) and lipase (figure 7). In all cases, no specific labeling was detected over mitochondria and nuclei. Morphological examination allowed us to further confirm that the integrity of the tissue was retained. Intercellular junctional complexes between enterocytes remained sealed and intact and no particular labeling by gold particles was detected at the level of the junctional complexes. When comparing intensities of labelings obtained by light and electron microscopy on the same tissues at same time points we can hardly correlate the strong immunofluorescence displayed by some enterocytes with the relatively few number of gold particles over the enterocytes cellular compartments. This can be explained by differences in tissue processing and resolution of the results. While tissues for light microscopy were fixed in Bouin's solution which is well known to retain protein antigenicity, combination of glutaraldehyde and osmium was used for electron microscopy. It is

well established that this harsh fixation protocol reduces dramatically protein antigenicity but is excellent for cellular preservation and high resolution immunocytochemistry which was needed in our study (Bendayan 1995).

Furthermore the entire thickness of the paraffin section reacts to the antibody while only the surface of the Epon ultrathin sections generates an immunogold labeling. In addition, as revealed by light microscopy not all the enterocytes display the same efficiency in this absorption.

Quantitative evaluations confirmed the subjective observations. Figure 9 illustrates the labeling densities obtained for amylase-FITC and lipase-FITC experiments.

While values at time 0 remain very low and reflect background staining, labeling densities obtained in all the other compartments beside mitochondria at all time points are significantly higher than background. The endosomal compartment appears to be the one displaying the highest density values at all time points, although some fluctuations were noted among time points for lipase (figure 9B).

However, deviations were large. Such large deviations might be due to heterogeneity in absorbing capacities among cells. Labeling densities of the Golgi apparatus remained constant and high starting at 15min. Similarly, labeling densities of the basolateral membranes became significant at 5 min and increased afterwards. This corroborates results obtained by biochemical determinations on amylase and lipase serum activities which increased starting at 5 min as described in the next paragraphs. In contrast, labeling densities over mitochondria remained very low and show no significant fluctuations over time. These values reflect background staining and are comparable to those obtained at time point 0.

Western Blots

To confirm that the intact enzyme-FITC complexes inserted into the duodenal lumen were transferred to the circulation and that the FITC signal detected by light and electron microscopy represents the entire enzyme-FITC complex and not free FITC, western blots analysis of serum sampled at 60 minutes were carried out. Amylase in the circulation was uncovered using anti-amylase antibody. Two bands were obtained at MW close to that of amylase (figure 10A) (Young et al. 1996). Figure 10B was obtained from the same membrane after stripping and incubation with the anti-FITC antibody. A single band corresponding to the amylase band at the higher molecular weight was obtained (figure 10B). Figure 10C illustrates the result obtained for FITC in serum sampled at 60 minutes after insertion of lipase-FITC solution in the duodenal lumen. Three bands are observed at molecular weights close to those of lipase (46 kDa) (Tietz and Shuey 1993).

Biochemical Analysis

As described in methods, serum samples were assessed for enzymes activity (figure 11). Average serum amylase activities at 5, 15, 30 and 60 minutes after insertion of the amylase-FITC solution in the duodenal lumen increased 310% (at 5 minutes, n=2), 390% (15 minutes, n=2), 460% (30 minutes, n=5) and 500% (60 minutes, n=8) along with time when compared to time point 0 (figure 11A). Conversely, lipase activity in these experiments remained stable, average serum lipase activity at 60 min was 89 ± 8 IU/L (n=4) a value similar to that of fasted rats. The same protocol was carried out for lipase-FITC (figure 11B). Activities of lipase in serum increased 170% (at 5 minutes, n=3), followed by a 430 % (15 minutes, n=2), 570% (30

minutes, n=5) and 820% (60 minutes, n=4). Amylase serum activity in these experiments remained stable with an average value at 60 min of 63 ± 2 IU/L (n=4) again a value similar to that of fasted rats.

In addition for the control experiments the levels of amylase and lipase before and 30 min after insertion of the solution not containing amylase or lipase were 61 ± 4.1 IU/L and 57 ± 8 IU/L for serum amylase and 66.1 ± 10.5 IU/L and 67 ± 10.6 IU/L for lipase respectively.

Discussion

The present study demonstrates that the intestinal mucosa constitutes a route of access for amylase and lipase to the blood circulation. This route may represent the main or an alternative to others previously put forward. We first confirmed the correlation existing between digestive activity and appearance of those enzymes in blood. Pancreatic secretion is stimulated by feeding and this results in an increase in pancreatic enzymes activities in serum. Those results go along with data published previously demonstrating that levels of serum amylase double upon feeding, suggesting the existence of a correlation between feeding, pancreatic function and levels of circulating amylase (Schneyer and Schneyer 1960). The question that remained to be elucidated is the pathway by which pancreatic enzymes reach the blood circulation.

Over the years, several propositions were put forward among which a potential endocrine secretion of the exocrine pancreatic acinar cells (Janowitz and Dreiling 1959; Tietz and Shuey 1993; Isenman et al. 1999) and a leakage of pancreatic enzymes across the pancreatic duct wall (Isenman et al. 1999). However no direct evidence has established those pathways in normal condition. Based on morphological and biochemical results we herein propose an alternative pathway through the intestinal mucosa by which pancreatic enzymes present in the duodenal lumen reach the circulation. Indeed, in addition to pancreatic cells and pancreatic ducts which are in contact with pancreatic enzymes and therefore always pinpointed as responsible for the transferring of those enzymes to the blood, the intestinal lumen

is another site exposed to pancreatic enzymes but rarely fully considered as a partaker in this matter.

We herein demonstrate the capability for the duodenal mucosa to transfer amylase and lipase from the intestinal lumen to the connective tissue. The presence of both amylase and lipase in the duodenal mucosa was higher in enterocytes of fed animals when compared to fasted ones. This indicates internalization of the enzymes by some enterocytes in normal condition. To strengthen those observations we increased pancreatic enzymes concentrations in the duodenal lumen by stimulating pancreatic secretion. Serum activities of both amylase and lipase were found to increase under those conditions. Upon immunodetection, we found numerous but not all duodenal enterocytes displaying a strong cytoplasmic signal for both lipase and amylase as compared to tissues from control rats. These experiments strengthen the concept that enterocytes may be able to internalize pancreatic enzymes in relation to levels of pancreatic enzymes in the duodenal lumen. Morphological evaluation enabled us to pledge that the pancreatic cells remained intact upon stimulation of secretion. Indeed, several studies over the years have stated that pancreatic stimulation by cholinergic agonists such as carbachol increases circulating levels of amylase through an endocrine basolateral secretion by the pancreatic acinar cells (Janowitz and Dreiling 1959; Tietz and Shuey 1993; Isenman et al. 1999). It was demonstrated that multiple supramaximal doses of cholinergic agonists generate a reorientation of secretory granules from the apical pole of the acinar cells to the basolateral one leading to secretion into the connective tissue (Scheele et al. 1987; Gaisano et al. 2001, 2004) or an elevated presence of lysosomes in acinar cells due

to increase lysosomal activity (Adler et al. 1983). In our experiments, we used a single non-maximal cholinergic stimulation that did not trigger reorientation of secretory granules, alteration in cellular polarization or cellular integrity.

In order to establish the transcytotic pathway in enterocytes, we exposed the duodenal mucosa in situ to high concentrations of enzymes tagged to FITC molecules. Tagging amylase and lipase to FITC allowed us to discriminate between exogenous and endogenous ones as well as enabling us to follow the enzyme progression within the intestinal cells. It also allowed us to detect the enzymes-FITC complex in the serum establishing the fact that intact enzyme molecules are internalized by the intestinal mucosa and discharged into the connective tissue to reach the blood circulation. Furthermore, the fact that the enzyme-FITC complex is found in circulation establishes that the increase in circulating enzymes originates from the intestinal mucosa. A substantial and extended association of the enzymes to the brush border was detected within the first 15 minutes and the signal progressed from the apical toward the basolateral region of the cells. In a previous study we demonstrated that BSDL, another pancreatic enzyme, is also transported from the intestinal lumen to the blood circulation through the intestinal mucosa (Bruneau et al. 2003a). In that same study we confirmed that the transport is quite specific since radio-labeled BSA was not internalized by enterocytes and did not reach the circulation (Bruneau et al. 2003a).

Electron microscopy immunocytochemistry confirmed and established the transcellular pathway. Gold immunolabeling was associated with the microvilli, forming endosomes, Golgi apparatus and basolateral membranes. Those

observations were underlined by assessing the labeling densities over the different compartments at different time points. As well, labeling was found in the interstitial space and blood capillaries. Such transcytotic pathway matches the one previously established for BSDL another pancreatic lipase and insulin (Bendayan et al. 1990, 1994; Ziv and Bendayan 2000; Bruneau et al. 1998, 2003a). The reason for the Golgi apparatus to be involved in transcytosis is an interesting fact. Passage through the Golgi apparatus during their transcytotic pathway across the enterocytes may well allow for some modifications and glycosylation of the transported enzymes that would enable them to gain the blood circulation Golgi involvement in this transcytosis remains however to be established.

During the *in vivo* experiments, either feeding or stimulation of pancreatic secretion, some enterocytes were labeled more intensely than neighboring ones suggesting a possible heterogeneity in cellular capability for enzymes internalization. This heterogeneity may also be responsible for fluctuations in our quantitative results particularly evident for lipase over the endosomal compartment (figure 9B).

Previous studies on BSDL have identified a receptor, LOX-1, located at the enterocyte luminal membrane responsible for its internalization (Bruneau et al. 2003b). This finding entails internalization of BSDL as a rather specific event and some cells may be more prone than others. Also, lipase internalization was found to be more efficient than that of amylase by morphological as well as biochemical means.

Following the appearance in the extracellular space, amylase and lipase were found associated with the endothelial plasmalemmal vesicles and present within the

capillary lumen. Even though presence of pancreatic enzymes in blood has been established for quite some time, their function and role in circulation is still poorly defined (Isenman et al. 1999). Studies have shown that the half-life of lipase in the blood varies from 6.9 to 13.7h and that of amylase is a little shorter (Tietz and Shuey 1993). The two enzymes appear to interact with circulating molecules. Amylase interacts with albumin (McGeachin and Lewis 1959; Dreiling et al. 1963) as well as with the γ -globulins (Ujihira et al. 1965) while lipase is known to interact with γ -globulins and to some extent to α -globulins (Tietz and Shuey 1993). Similarly, pancreatic BSDL was shown to interact with circulating lipoproteins being mostly associated with chylomicrons, VLDL and LDL (Bruneau et al. 2003a).

In conclusion, in a matter of minutes, lipase and amylase present in the intestinal lumen are transported by enterocytes from their apical to their basolateral poles. Both enzymes transit through endosomal compartments and Golgi apparatus before being transferred to the basolateral membrane where they are released into the interstitial space to reach the blood circulation. Furthermore we noticed a relation between availability of those enzymes in the intestinal lumen and their concentrations in blood suggesting that this pathway is physiologically relevant for the normal presence of those enzymes in circulation.

Acknowledgments: The authors like to thank Dr. Irene Londoño, Elizabeth Gervais and Denis Rodrigue for their assistance.

Grants: This work was supported by a grant from Canadian Institutes of Health Research.

This article represents part of the work required for the fulfillment of the M. Sc. programme of MC.

Literature Cited

Adler G, Gerhards G, Schick J, Rohr G, Kern HF (1983) Effects of in vivo cholinergic stimulation of rat exocrine pancreas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 244:G623-G629.

Barneo L, Esteban MM, Garcia-Pravia C, Diaz F, Marin B (1990) Islet transplantation restores normal serum amylase levels in diabetic rats. *Eur Surg Res* 22:143-150.

Bazin R, Lavau M (1979) Diet composition and insulin effect on amylase to lipase ratio in pancreas of diabetic rats. *Digestion* 19:386-391.

Bendayan M (1995) Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog Histochem Cyto* 29:1-159.

Bendayan M (2000) Functional properties of the intestinal wall: novel aspects and recent avenues. *Microsc Res Techniq* 49:325-328.

Bendayan M, Bruneau A, Morisset J (1985) Morphometrical and immunocytochemical studies on rat pancreatic acinar cells under control and experimental conditions. *Biol Cell* 54:227-234.

Bendayan M, Gregoire S (1987) Immunohisto- and cytochemical studies of pancreatic enzymes in peri-insular and tele-insular acinar cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pancreas* 2:272-282.

Bendayan M, Levy E (1988) Immunocytochemical and biochemical evaluation of pancreatic lipase in acinar cells of control and streptozotocin-induced diabetic rats. *Pancreas* 3:269-273.

Bendayan M, Londoño I (1996) Reabsorption of native and glycated albumin by renal proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 271:F261-268.

Bendayan M, Ziv E, Ben-Sasson R, Bar-On H, Kidron M (1990) Morpho-cytochemical and biochemical evidence for insulin absorption by the rat ileal epithelium. *Diabetologia* 33:197-204.

Bendayan M, Ziv E, Gingras D, Ben-Sasson R, Bar-On H, Kidron M (1994) Biochemical and morpho-cytochemical evidence for the intestinal absorption of insulin in control diabetic rats. Comparison between the effectiveness of duodenal and colon mucosa. *Diabetologia* 37:119-126.

Bock U, Kolac C, Borchard G, Koch K, Fuchs R, Streichhan P, Lehr CM (1998) Transport of proteolytic enzymes across caco-2 cell monolayers. *Pharmaceut Res* 15:1393-1400.

Bruneau N, Bendayan M, Gingras D, Ghitescu L, Levy E, Lombardo D (2003a) Circulating bile salt-dependent lipase originates from the pancreas via intestinal transcytosis. *Gastroenterology* 124:470-480.

Bruneau N, Lombardo D, Bendayan M (1998) Participation of GRP94-related protein in secretion of pancreatic bile salt-dependent lipase and in its internalization by the intestinal epithelium. *J Cell Sci* 111:2665-2679.

Bruneau N, Nganga A, Bendayan M, Lombardo D (2001) Transcytosis of pancreatic bile salt-dependent lipase through human Int407 intestinal cells. *Exp Cell Res* 271:94-108.

Bruneau N, Richard S, Silvy F, Verine A, Lombardo D (2003b) Lectin-like Ox-LDL receptor is expressed in human Int407 intestinal cells: involvement in the transcytosis of pancreatic bile salt-dependent lipase. *Mol Biol Cell* 14:2861-2875.

Cornell R, Walker WA, Isselbacher KJ (1971) Small intestinal absorption of horseradish peroxidase. A cytochemical study. *Lab Invest* 25:42-48.

Dreiling DA, Janowitz HD, Lazar JJ (1963) Serum iso-amylases. An electrophoretic study of the blood amylase and patterns observed in pancreatic disease. *Ann Intern Med* 58:235-244.

Gaisano HY, Lutz MP, Leser J, Sheu L, Lynch G, Tang L, Tamori Y, Trimble WS, Salapatek AMF (2001) Supramaximal cholecystokinin displaces Munc18c from the pancreatic acinar basal surface, redirecting apical exocytosis to the basal membrane. *J Clin Invest* 108:1597-1611.

Gaisano HY, Sheu L, Whitcomb D (2004) Alcoholic chronic pancreatitis involves displacement of Munc18c from the pancreatic acinar basal membrane surface. *Pancreas* 28:395-400.

Ghitescu L, Bendayan M (1990) Immunolabeling efficiency of protein A-gold complexes. *J Histochem Cytochem* 38:1523-1530.

Gregoire S, Bendayan M (1986) Immunocytochemical studies of pancreatic acinar cells in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 29:655-660.

Isenman L, Liebow C, Rothman S (1999) The endocrine secretion of mammalian digestive enzymes by exocrine glands. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276:E223-E232.

Janowitz HD, Dreiling DA (1959) The plasma amylase, source, regulation and diagnostic significance. *Am J Med* 27:924-935.

Keller J, Layer P (2002) Circadian pancreatic enzyme pattern and relationship between secretory and motor activity in fasting humans. *J Appl Physiol* 93:592-600.

MacDonald RJ, Crerar MM, Swain WF, Pictet RL, Thomas G, Rutter WJ (1980) Structure of a family of rat amylase genes. *Nature* 287:117-122.

Marcil V, Peretti N, Delvin E, Levy E (2004) Digestive and absorptive processes of alimentary fat [in French]. *Gastroenterol Clin Biol* 28:1257-1266.

McGeachin RL, Lewis JP (1959) Electrophoretic behavior of serum amylase. *J Biol Chem* 234:795-798.

Payan F, Qian M (2003) Crystal structure of the pig pancreatic α -amylase complexed with malto-oligosaccharides. *J Protein Chem* 22:275-284.

Qian M, Spinelli S, Driguez H, Payan F (1997) Structure of a pancreatic α -amylase bound to a substrate analogue at 2.03 Å resolution. *Protein Sci* 6:2285-2296.

Rohr G, Scheele G (1983) Fate of radioactive exocrine pancreatic proteins injected into the blood circulation of the rat. Tissue uptake and transepithelial excretion. *Gastroenterology* 85:991-1002.

Sandborn EB, Stephens H, Bendayan M (1975) The influence of dimethyl sulfoxide on cellular ultrastructure and cytochemistry. *Ann NY Acad Sci* 243:122-138.

Scheele G, Adler G, Kern H (1987). Exocytosis occurs at the lateral plasma membrane of the pancreatic acinar cell during supramaximal secretagogue stimulation. *Gastroenterology* 92:345-353.

Schneyer CA, Schneyer LH (1960) Amylase in rat serum, submaxillary gland and liver following pilocarpine administration or normal feeding. *Am J Physiol* 198:771-773.

Tietz NW, Shuey DF (1993) Lipase in serum-the elusive enzyme: an overview. *Clin Chem* 39:746-756.

Udall JN, Pang K, Fritze L, Kleinman R, Walker WA (1981) Development of gastrointestinal mucosal barrier. I. The effect of age on intestinal permeability to macromolecules. *Pediatr Res* 15:241-244.

Ujihira I, Searcy RL, Berk JE, Hayashi S (1965) A saccharogenic method for estimating electrophoretic and chromatographic distribution of human serum amylase. *Clin Chem* 11:97-112.

Warshaw AL, Walker WA, Cornell R, Isselbacher KJ (1971) Small intestinal permeability to macromolecules. Transmission of horseradish peroxidase into mesenteric lymph and portal blood. *Lab Invest* 25:675-684.

Weiner ML (1988) Intestinal transport of some macromolecules in food. *Fd Chem Toxic* 26:867-880.

Yacoub RS, Appert HE, Howard JM (1969) Metabolism of pancreatic amylase and lipase infused intravenously into dogs. *Arch Surg* 99:54-58.

Young MK, Tseng HC, Fang H, Liang W, Rothman SS (1996) Comparison of stored and secreted rat pancreatic digestive enzymes by mass spectrometry: α -amylase. *BBA-Protein Struct M* 1293:63-71.

Ziv E, Bendayan M (2000) Intestinal absorption of peptides through the enterocytes. *Microsc Res Techniq* 49:346-352.

Ziv E, Lior O, Kidron M (1987) Absorption of protein via the intestinal wall. A quantitative model. *Biochem Pharmacol* 36:1035-1039.

Legends

Figure 1: Light microscopy. Immunofluorescence detection of amylase and lipase using corresponding specific antibodies in the intestinal mucosa of fasted and fed rats. (A) Amylase; fasted condition. The labeling is faintly present over the brush border of the villi. Bar = 20 μ m. (B) Amylase; fed condition. The labeling is present over the brush border and in few cells located at the tip of the villi. Bar = 40 μ m. (C) Lipase; fed condition. A strong staining over the brush border and in the supranuclear region of some cells located at the tip of the villi. Some staining is present in the connective tissue. Bar = 20 μ m.

Figure 2: Light microscopy. Immunofluorescence detection of amylase and lipase using corresponding specific antibodies in the duodenal mucosa of carbachol treated rats. (A) Amylase; Staining is present at the apical and basal regions of some enterocytes mainly at the tip of the villi. Bar = 40 μ m. (B) Amylase; High magnification. Staining intensity varies from one cell to the other; from negative to bright staining. Bar = 20 μ m. (C) Lipase; The brush border is brightly stained. Some cells show intracellular staining. The intensity varies from one cell to the other. Bar = 20 μ m.

Figure 3: Light microscopy. Direct detection of FITC on duodenal tissue before and after the insertion of amylase-FITC in the intestinal lumen. (A) Before insertion (t=0 min), no signal was obtained. Bar = 40 μ m. (B) Time point t=15 min, the staining is associated with luminal material and the brush border. Bar = 20 μ m. (C) Time point

t=60 min, the staining is present over the supranuclear and basal regions of the cells as well as over the connective tissue. Bar = 20 μ m.

Notice that nuclei and Goblet cells are devoid of any signal.

Figure 4: Light microscopy. Direct detection of FITC in duodenal tissue before and after the insertion of the lipase-FITC complex. (A) Duodenal tissue before insertion (t=0 min.). No signal. (B) Duodenal tissue at time point t=5 min. The lumen, the brush border, and few cells appear stained. (C) At t=15 min, FITC signal is over the brush border and apical region of the enterocytes. (D) t=30 min, the brush border, apical and basal regions of the cells are stained. Goblet cells are devoid of signal. Bars = 20 μ m.

Figure 5: Light microscopy. Immunoperoxidase staining revealing lipase in duodenal tissue using the anti-lipase antibody before and after the insertion of lipase-FITC into the duodenal lumen. (A) Before lipase-FITC insertion (t=0 min), the section is devoid of any specific staining. Bar = 20 μ m. (B) Time point t=5 min, the staining is associated with the brush border. Bar = 20 μ m. (C) t=30 min, staining is present over the brush border, supra nuclear and basal regions of the enterocytes. Bar = 40 μ m. (D) t=60 min, a strong signal is present over the cell cytoplasm and in the connective tissue. Bar = 20 μ m. Goblet cells are devoid of staining.

Figure 6: Electron microscopy. Immunocytochemical detection of amylase-FITC in the duodenal tissue using the anti-FITC/protein A-gold approach. (A, B, C) $t=30$ min, gold particles revealing FITC antigenic sites are associated with microvilli (mv), endosomal compartments (e) and Golgi apparatus (G). No labeling is present over mitochondria (M). Bars = $0.25\mu\text{m}$.

Figure 7: Electron microscopy. Immunocytochemical detection of lipase-FITC in the duodenal tissue using the anti-FITC/protein A-gold approach. At time point $t=30$ min, gold labeling is present over the Golgi apparatus (G) and associated with the basolateral membrane (blm). No labeling is present over mitochondria (M). Bar = $0.25\mu\text{m}$.

Figure 8: Electron microscopy. Immunocytochemical detection of amylase-FITC (A) and lipase-FITC (B) in the duodenal tissue at $t=60$ min.; anti-FITC / protein A-gold. The labelings are present in the interstitial tissue (IT) as well as in endothelial plasmalemmal vesicles (v) and blood capillary lumina (CL). Bars = $0.25\mu\text{m}$

Figure 9: Amylase-FITC (A) and lipase-FITC (B) experiments. Densities of labeling obtained with the anti-FITC antibody over different cellular compartments of the rat enterocytes. Densities of labeling are expressed as mean values of gold particles/ $\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$. Columns going from white to black correspond to 0 minutes, 5 minutes, 15 minutes, 30 minutes, and 60 minutes respectively. microvilli (mv), endosomal compartment (endo), Golgi apparatus (G), basolateral membrane (blm)

and mitochondria (m). * indicates values significantly different from time point 0; † indicates values significantly different from time point 5; ° indicates values significantly different from time point 15 (Student t test, $p < 0.01$).

Figure 10: Immunoblot detection of amylase-FITC (A and B) and lipase-FITC (C) in serum sampled 60 minutes after insertion of the enzymes-FITC solutions. (A) Amylase detection using the anti-amylase antibody. Two bands at MW=54 kDa and MW=56 kDa were revealed. (B) FITC detection using the anti-FITC antibody after stripping of the previous membrane (A) shows a single band corresponding to the higher molecular weight (MW=56 kDa) amylase band. (C) FITC detection using the anti-FITC antibody on serum of lipase-FITC experiment. Three bands of molecular weights close to those of lipase (MW=46 kDa) were obtained.

Figure 11: Enzymes activities of serum samples from duodenal insertion experiments. (A) Amylase-FITC experiment. (B) Lipase-FITC experiment. Activities in serum increase with time. Activities for both amylase and lipase at all time points differ significantly from time point 0 (Student t test, $p < 0.01$). Lipase activity in serum increases more significantly than the amylase one. * indicates values significantly different from time point 0; † indicates values significantly different from time point 5 (Student t test, $p < 0.01$).



Figure 1



Figure 2



Figure 3

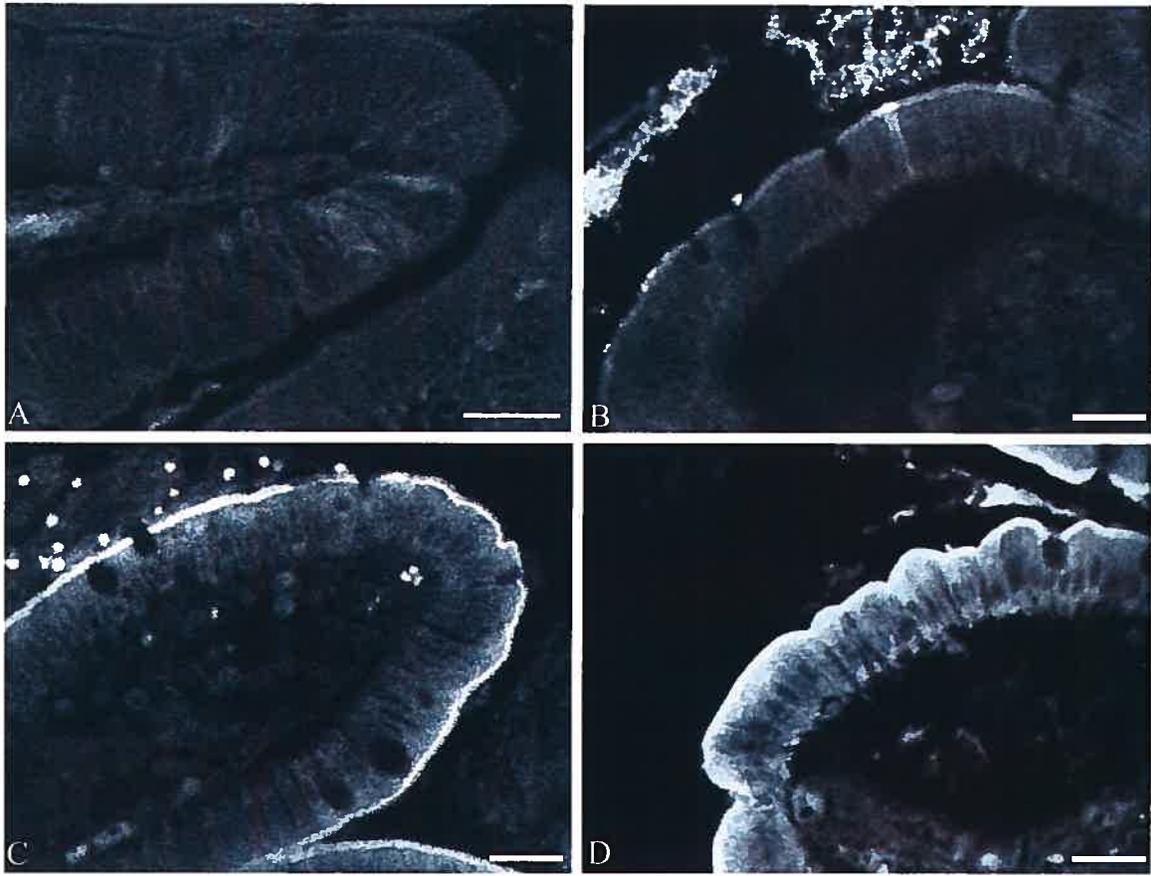
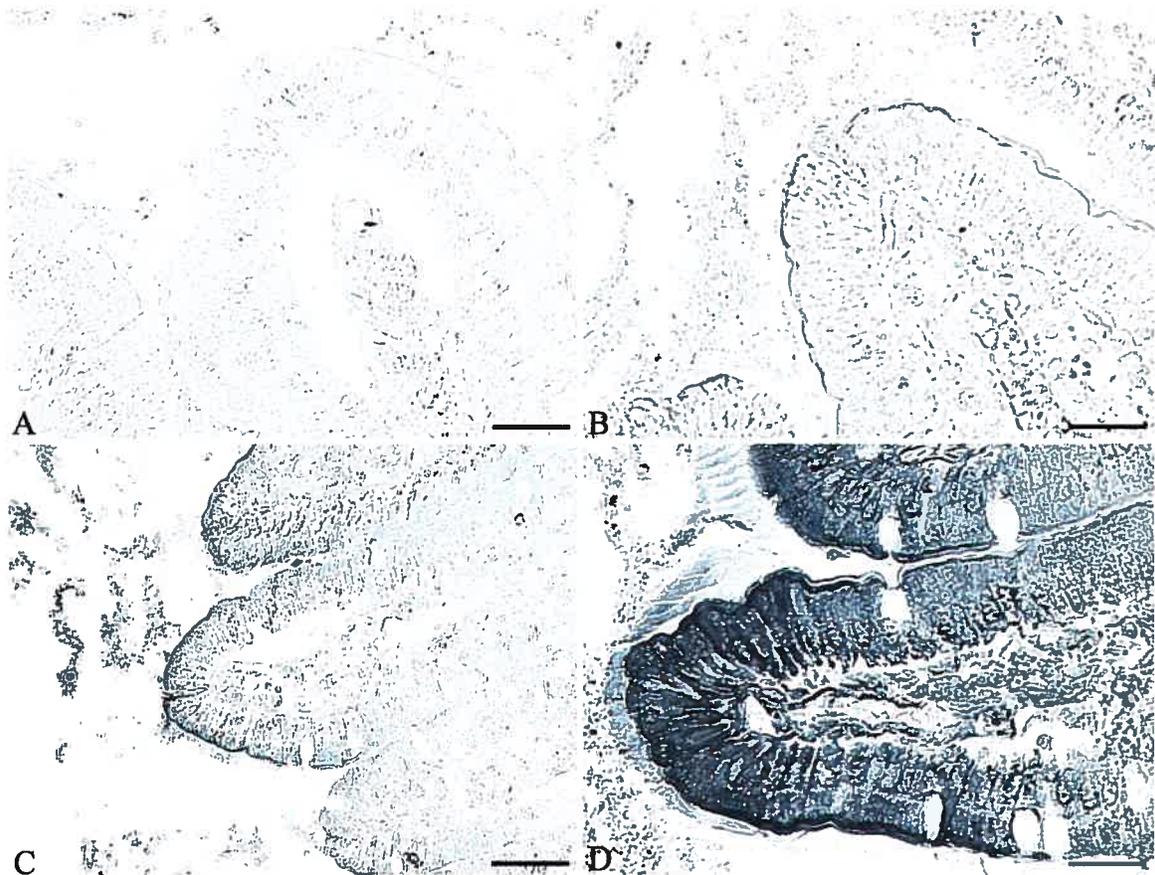


Figure 4



C
Figure 5

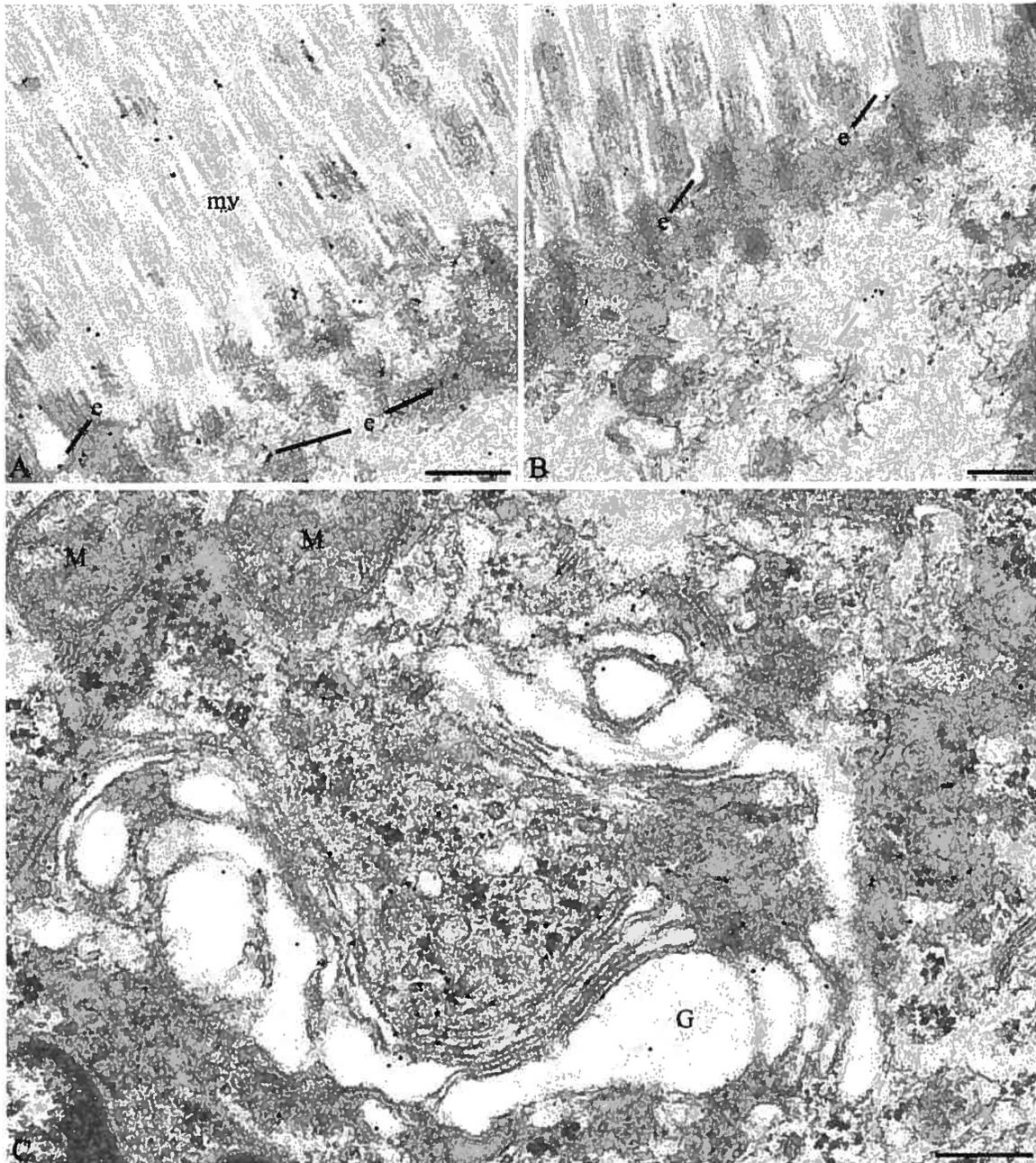


Figure 6

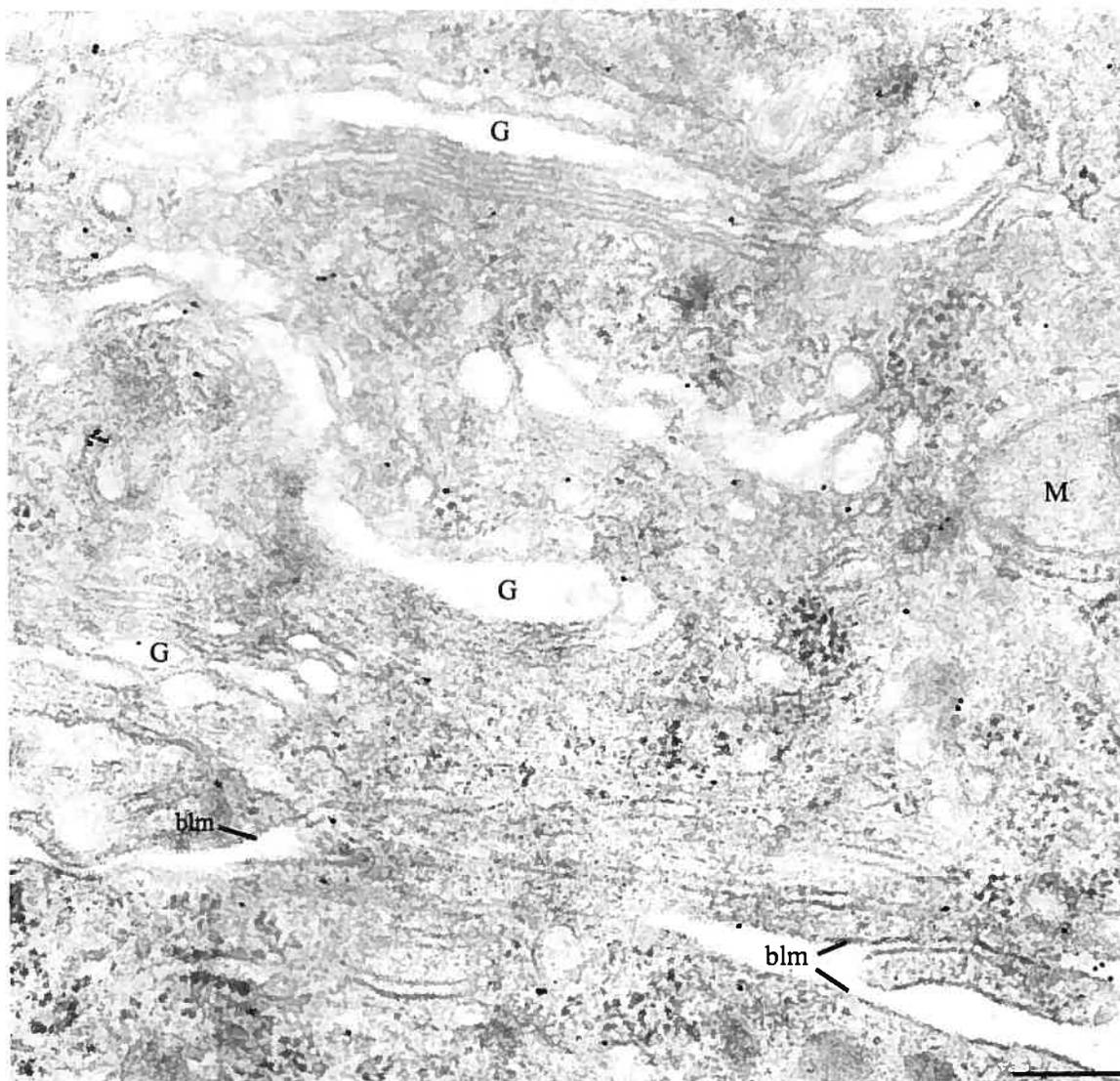
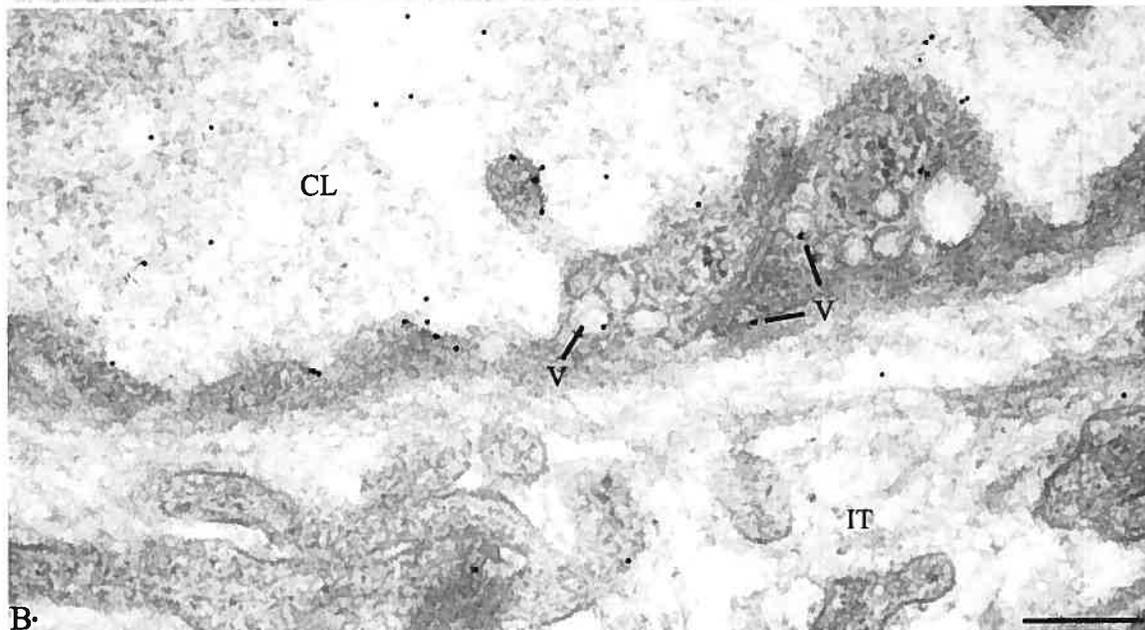
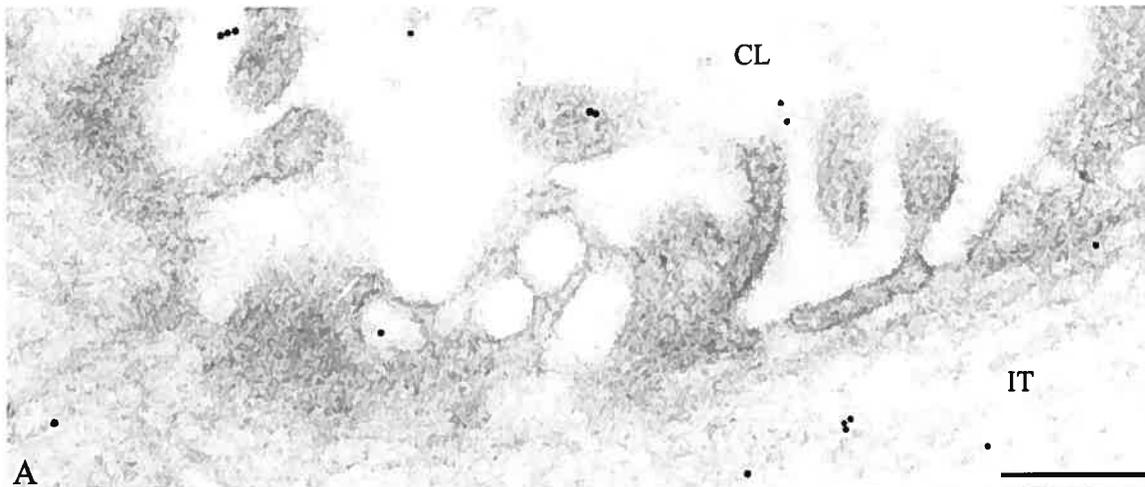


Figure 7



B.
Figure 8

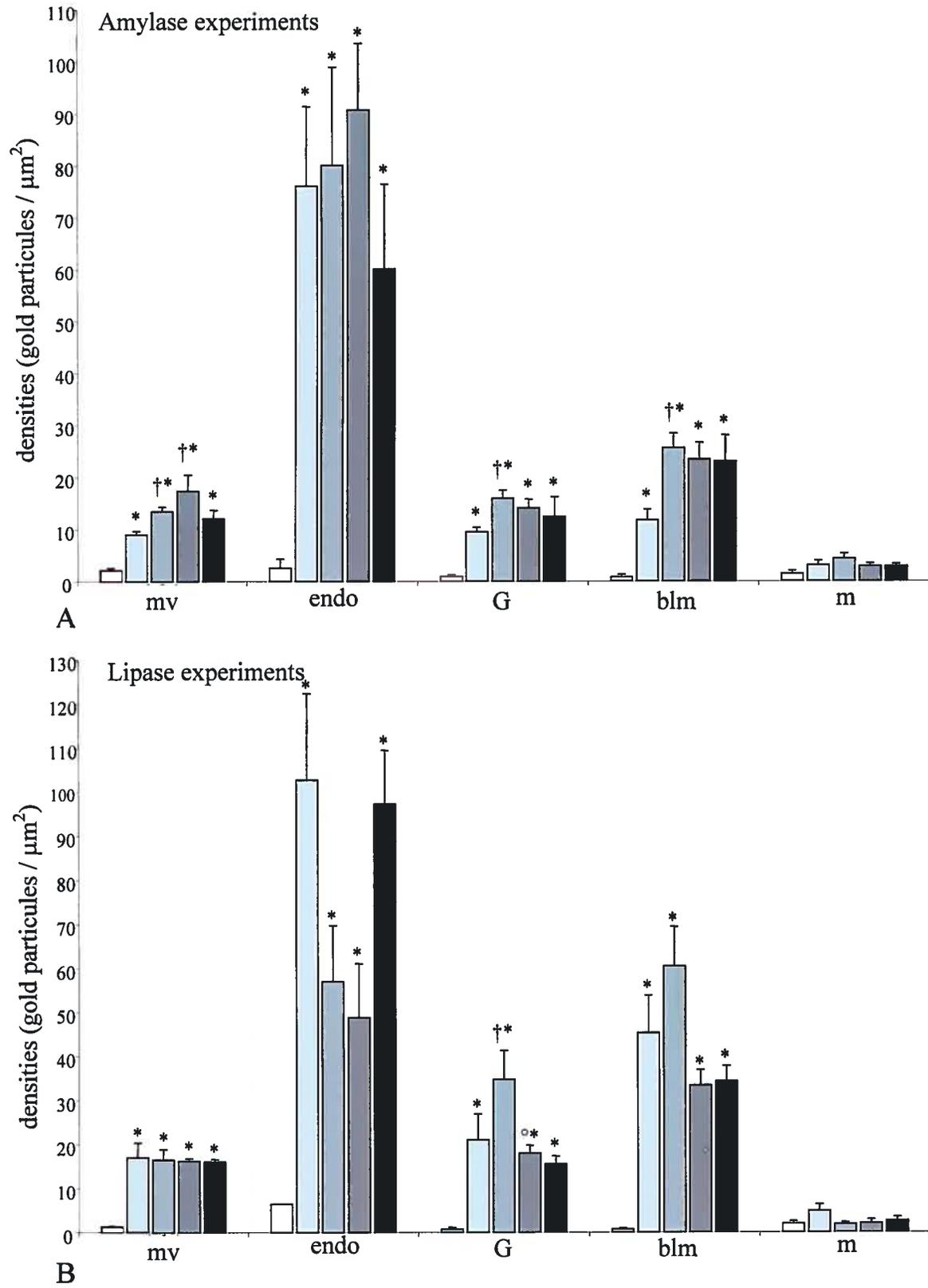


Figure 9

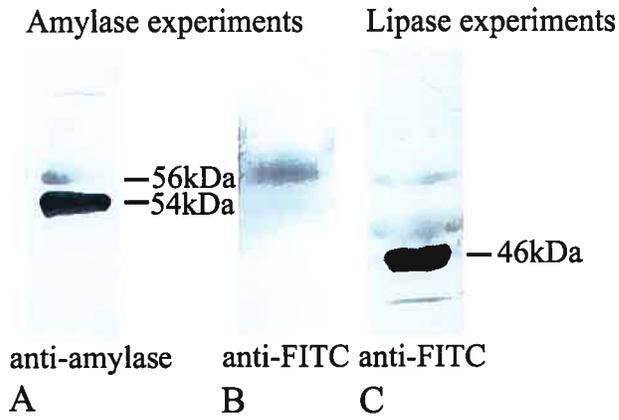


Figure 10

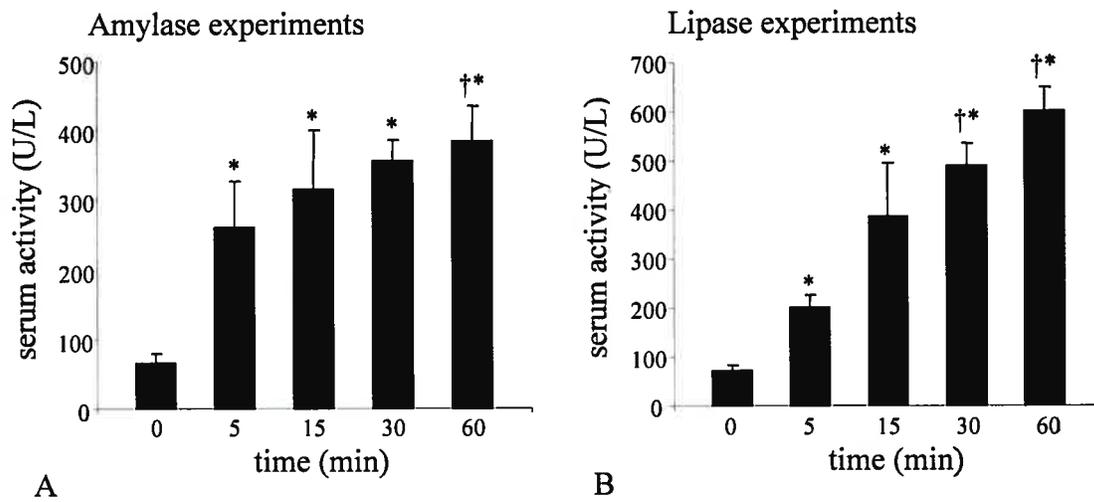


Figure 11

DISCUSSION

1. Discussion générale des résultats

L'article présenté regroupe l'ensemble des résultats obtenus dans mon projet de maîtrise et démontre l'internalisation de l'amylase et de la lipase pancréatiques par la muqueuse intestinale comme route d'accès de ces enzymes vers la circulation sanguine. Plusieurs voies d'accès ont été proposées pour expliquer la présence de l'amylase et de la lipase pancréatiques dans le sang dont la sécrétion endocrine du pancréas exocrine, la voie duodénale et la voie de la fuite du canal pancréatique. Il demeure pourtant que l'hypothèse la plus prisée veut que l'augmentation des taux sanguins des enzymes pancréatiques soit due à un déversement des grains de zymogènes à la membrane basolatérale des cellules acineuses et donc l'existence d'une sécrétion endocrine du pancréas exocrine (Isenman *et al*, 1999). La littérature reste néanmoins dépourvue de démonstrations valables pour justifier l'existence de ces différentes voies. Nous n'avons pas écarté la possibilité d'une voie endocrine du pancréas exocrine ou de la fuite du canal pancréatique mais nous avons été en mesure de démontrer l'existence de la voie duodénale qui semble relativement efficace dans le transport des protéines pancréatiques de la lumière duodénale vers la circulation sanguine.

En premier lieu, une corrélation entre l'état de nutrition des animaux et la présence duodénale et sanguine de l'amylase et de la lipase pancréatiques a été démontrée. Nous avons établi que les activités enzymatiques sanguines élevées chez les rats nourris (Schneyer et Schneyer 1960, Isenman *et al*, 1999) sont reliées à une

présence duodénale accrue. Ainsi chez les rats nourris, il y a présence des enzymes pancréatiques dans les cellules absorbantes de la muqueuse duodénale se situant à l'extrémité des villosités. Ces observations préliminaires supportent l'hypothèse que la muqueuse intestinale semble être capable d'internaliser l'amylase et la lipase pancréatiques à partir de la lumière.

Les expériences portant sur des rats dont la sécrétion pancréatique a été stimulée secondent ces premières observations. De manière générale, la réponse à la stimulation du pancréas exocrine par les sécrétagogues est biphasique (Adler *et al*, 1983, Scheele *et al*, 1987). La phase sous stimulation sousmaximale à maximale par les sécrétagogues a pour réponse une activation de la sécrétion apicale des cellules acineuses (Scheele *et al*, 1987). La seconde phase, sous stimulation supramaximale, engendre une réponse sousmaximale de la sécrétion pancréatique apicale, génère ainsi un volume moins important de jus pancréatique et est caractérisée par un déversement des enzymes du côté basolatéral vers la circulation sanguine (Adler *et al*, 1983, Scheele *et al*, 1987, Gaisano *et al*, 2001, 2004). Dans le cadre de notre étude, une injection de doses supramaximales de carbachol modifierait les valeurs d'activités enzymatiques sanguines chez nos rats étant donné la sécrétion basolatérale des enzymes dans le sang. Nous avons ainsi utilisé une dose de 12mg/kg de carbachol pour créer une stimulation maximale (Bendayan *et al*, 1985). Cette stimulation a permis de maximiser la sécrétion apicale des cellules acineuses, d'obtenir un volume important de jus pancréatique dans la lumière duodénale et ainsi faciliter l'évaluation de l'internalisation de l'amylase et de la lipase pancréatiques. Afin de s'assurer de la validité de nos conditions expérimentales,

nous avons examiné du tissu pancréatique en microscopie optique et électronique prélevé 15 minutes après stimulation avec le carbachol. L'ensemble de ces observations morphologiques (Figure 3) montre une morphologie semblable à celle obtenue pour des rats nourris (Bendayan *et al*, 1985) et ne comporte aucune trace de modifications cellulaires associées à une stimulation supramaximale décrites par Adler (Adler *et al*, 1983).

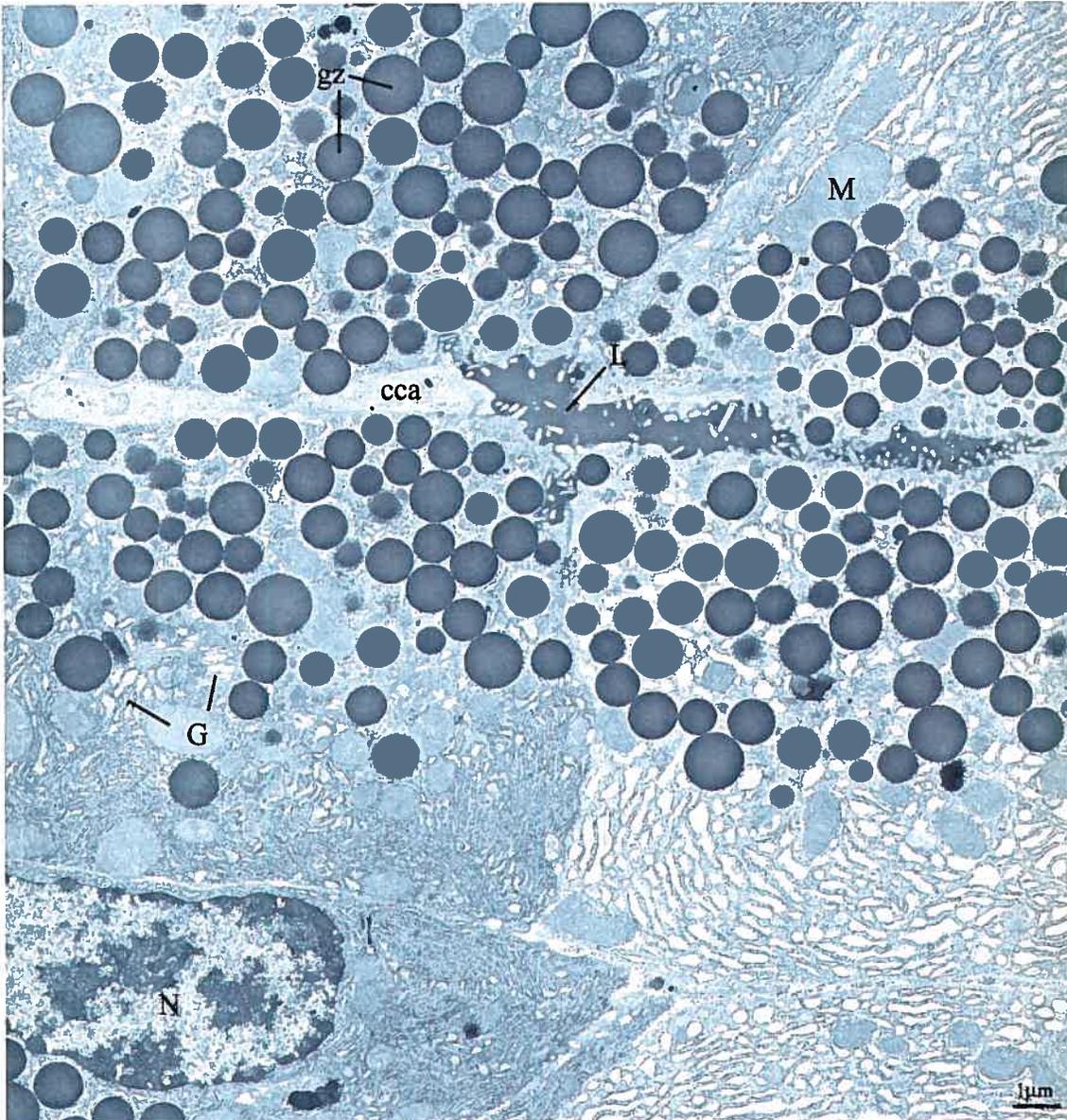


FIGURE 3: Cellules acineuses de rats sacrifiés 15 minutes après stimulation de la sécrétion pancréatique par le carbachol (12 mg / kg). Cette figure présente les grains de zymogènes (gz) à la proximité de la lumière acineuse (L). La lumière acineuse est remplie du produit de sécrétion des cellules environnantes. On remarque la morphologie intacte du tissu. (G) appareil de Golgi, (M) mitochondrie, (N) le noyau et (cca) cellule centro-acineuse.

Les observations en microscopie optique effectuées sur les tissus duodénaux de rats injectés avec une dose maximale de carbachol révèlent une présence accrue des enzymes dans la muqueuse duodénale en comparaison avec les rats nourris. L'augmentation des enzymes dans la muqueuse duodénale est associée à l'augmentation du niveau de l'activité enzymatique de l'amylase et de la lipase dans la circulation sanguine.

L'injection dans la lumière duodénale des enzymes étiquetées au FITC permet de suivre la progression en microscopie des enzymes dans la muqueuse. La progression des enzymes se fait du niveau apical vers le niveau basolatéral des cellules. 5 minutes après l'injection des solutions, les enzymes sont associées avec la bordure en brosse des cellules; à 15 minutes, les enzymes se retrouvent à l'intérieur des cellules au niveau apical. Il faut 30 à 60 minutes avant que les enzymes soient observées dans la partie basolatérale des entérocytes et au niveau du tissu conjonctif. Par l'entremise de la microscopie électronique nous avons été en mesure d'identifier les composantes cellulaires impliquées dans ce transport des enzymes du côté apical au pôle basolatéral des entérocytes. La morphologie intacte des jonctions serrées, l'absence des enzymes dans l'espace à proximité des jonctions serrées et au niveau de ces dernières écartent le passage paracellulaire comme voie d'internalisation. D'autre part, la présence des enzymes au niveau des endosomes en formation et des compartiments endosomaux démontre un passage transcellulaire par endocytose décrit au préalable par différents groupes pour un ensemble d'autres protéines (Bockman et Winborn, 1966, Cornell *et al*, 1971, Walker *et al*, 1972, Barbour et Hopwood, 1983, Bendayan *et al*, 1990, 1994, Bruneau *et al*, 1998, 2001, 2003a).

L'amylase et la lipase pancréatiques se retrouvent par la suite au niveau de l'appareil de Golgi comme observé pour la ferritine, la BSDL et l'insuline (Bockman et Winborn, 1966, Bendayan *et al*, 1990, 1994, Bruneau *et al*, 1998, 2001, 2003a). Par la suite, le passage au travers la membrane basolatérale permet à l'amylase et à la lipase de se retrouver dans l'espace interstitiel et de rejoindre les cellules endothéliales bordant les capillaires sanguins. Ce phénomène est aussi observé pour l'insuline et la BSDL (Bendayan *et al*, 1990, 1994, Bruneau *et al*, 1998, 2001, 2003a). Enfin, la présence du marquage dans les vésicules des cellules endothéliales et dans la lumière capillaire observée en microscopie électronique corrobore l'augmentation des activités enzymatiques sériques et la présence des enzymes-FITC dans la circulation sanguine.

Ainsi, ces différentes expériences permettent d'établir la participation de la voie duodénale dans l'apport d'amylase et de lipase pancréatiques dans la circulation sanguine. Ces enzymes pénètrent la muqueuse intestinale par voie endocytotique, passent par l'appareil de Golgi pour atteindre la membrane basolatérale et parviennent finalement à la circulation sanguine où elles conservent leur activité enzymatique.

2. Un clin d'œil à l'endocytose spécifique

L'ensemble des observations sur les animaux nourris, les animaux injectés au carbachol et les animaux ayant subi une insertion intraduodénale des enzymes-FITC a soulevé une multitude de questions. Dans un premier lieu, la variabilité de la capacité d'absorption des cellules entérocytaires principalement illustrée dans les expériences de stimulation pancréatique soulève une d'hétérogénéité des cellules de la muqueuse intestinale. On observe, principalement dans les résultats obtenus pour les expériences au carbachol, des cellules marquées plus fortement que leurs voisines. Ceci semble proposer une capacité accrue de certaines cellules entérocytaires à l'internalisation des enzymes et propose donc une hétérogénéité de celles-ci.

De manière générale, une hétérogénéité protéique est présente dans l'ensemble des cellules entérocytaires. L'axe crypte-villosité illustre une hétérogénéité de ces cellules absorbantes (Pageot *et al*, 2000). En effet, les cellules souches, présentes dans les cryptes, expriment un ensemble de gènes bien différents des cellules en prolifération, de cellules en différenciation, des cellules matures ainsi que des cellules en apoptose à l'extrémité des villosités (Pageot *et al*, 2000). Cette hétérogénéité le long de l'axe crypte-villosité rappelle le profil d'absorption observé pour les cellules mis en présence des enzymes-FITC. Le profil d'absorption décroissant de l'extrémité de la villosité à la crypte pourrait être expliqué par le niveau de maturité des cellules absorbantes ou encore par la disponibilité des enzymes-FITC le long de cet axe.

Autre l'hétérogénéité des cellules entérocytaires le long de l'axe crypte-villosité liée au stade de vie de celles-ci, il existe des évidences d'hétérogénéité des cellules sous forme de mosaïque (Beers Van *et al*, 1998). La carbamoyl phosphate synthase I est une enzyme codée par l'ADN nucléaire localisée dans les mitochondries (Beers Van *et al*, 1998). Cette protéine est présente dans certaines cellules entérocytaires duodénales humaines et de rats adultes formant ainsi une mosaïque (Beers Van *et al*, 1998). La présence alternative de la protéine dans les entérocytes est reliée, non pas à la présence de son ARNm dans ces cellules, mais à la présence de la protéine même (Beers Van *et al*, 1998). Ainsi, un mécanisme post-translational serait responsable du profil de mosaïque observé pour cette protéine dans la population d'entérocytes de la muqueuse intestinale (Beers Van *et al*, 1998). D'autres études publiées dans les années 90 ont démontré un profile similaire pour la lactase dans les cellules entérocytaires humaines, de rats et de lapins (Mairu *et al*, 1991, 1992, 1994). Dans le cas de lactase, l'hétérogénéité observée dans la population de cellules provient de l'expression même du gène contrairement à la carbamoyl phosphate synthase I où il s'agit de régulations post-translationnelles (Mairu *et al*, 1991, 1992, 1994). La présence d'un profile d'absorption des cellules entérocytaires en mosaïque pour l'internalisation de l'amylase et de la lipase dans la muqueuse intestinale peut être expliquée par une hétérogénéité de l'expression de gènes ou de protéines par les entérocytes permettant à certaines cellules une absorption plus efficace des enzymes.

La voie endocytotique observée dans l'internalisation de l'amylase et de la lipase pancréatiques est une voie qui peut être de caractère spécifique ou non-

spécifique. Alors que l'endocytose non-spécifique implique une simple absorption du milieu extracellulaire environnant la membrane au moment de l'événement d'endocytose, l'endocytose spécifique implique la présence d'un récepteur à la membrane. Ce récepteur permet de lier une molécule particulière et d'en faire l'internalisation spécifique. Ainsi, le niveau d'internalisation de cette molécule serait proportionnel aux quantités de son récepteur sur la membrane. L'endocytose spécifique pourrait expliquer les observations d'hétérogénéité des cellules absorbantes dans quel cas une présence inégale de récepteurs pour nos enzymes à la membrane apicale serait observée.

L'internalisation de la BSDL par les entérocytes est dépendante d'un récepteur (Bruneau *et al*, 2003b). Similairement, un article publié par Falt *et al*, en 2001 propose que la lipase pancréatique posséderait un récepteur au niveau de la muqueuse intestinale (Falt *et al*, 2001). Selon les auteurs, ce récepteur permettrait de lier la lipase pancréatique pour favoriser l'absorption de ses produits de digestion (Falt *et al*, 2001). Bien que le récepteur ne soit pas caractérisé, les auteurs proposent que ce récepteur posséderait une structure semblable à celle de l'héparine (Falt *et al*, 2001). Ce domaine héparine est reconnu pour lier la lipoprotéine lipase avec une grande affinité (Falt *et al*, 2001). La lipoprotéine lipase et la lipase pancréatique possèdent des structures tridimensionnelles très semblables et ce particulièrement dans la partie catalytique ce qui expliquerait la capacité du domaine héparine à lier la lipase pancréatique (Tietz et Shuey, 1993, Falt *et al*, 2001). Cette observation est intéressante dans la mesure où le domaine héparine a initialement été envisagé comme récepteur potentiel pour lier la BSDL et permettre son internalisation

(Bruneau *et al*, 2003b). Ce domaine héparine s'est révélé insignifiant dans le mécanisme d'internalisation de la BSDL mais étant donné son affinité à la lipoprotéine lipase, il demeure un candidat intéressant pour l'internalisation de la lipase pancréatique. Une présence irrégulière de récepteurs pour l'amylase et la lipase pancréatiques à la membrane expliquerait ainsi le motif d'absorption illustré dans les expériences de stimulation au carbachol.

3. L'implication de l'appareil de Golgi dans la transcytose

Le passage par l'appareil de Golgi dans la transcytose de macromolécules du pôle apical au pôle basolatéral des entérocytes a été observé pour la ferritine (Bockman et Winborn, 1966), l'insuline (Bendayan *et al*, 1990, 1994) et la BSDL (Bruneau *et al*, 2001). L'intervention de l'appareil de Golgi dans la transcytose de ces macromolécules la distingue d'une transcytose typique. De manière générale, la transcytose implique un simple transport vésiculaire d'une membrane à l'autre et ne requiert pas le passage par l'appareil de Golgi. Or, il semble qu'il y ait des évidences croissantes pour l'intervention de l'appareil de Golgi dans la transcytose de certaines macromolécules dans différents tissus (Bockman et Winborn, 1966, Bendayan *et al*, 1990, 1994, Ollivier-Bousquet, 1998, Bruneau *et al*, 2001, Butowt et von Bartheld, 2001). Il n'en demeure pas moins que son implication reste à être précisée. L'intervention de l'appareil de Golgi dans la transcytose de l'amylase et de la lipase pancréatiques dans les entérocytes de la muqueuse duodénale pourrait permettre l'orientation vers la membrane basolatérale des enzymes recueillies dans la lumière intestinale ou encore leur modification.

Les modifications susceptibles d'être apportées aux enzymes par le Golgi sont des glycosylations. De manière générale, la glycosylation est un phénomène qui intervient lors de la synthèse des protéines possédant un ou plusieurs sites (Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr) à cet effet (Imperiali, 1997). Ainsi l'ensemble des protéines possédant des sites susceptibles d'être glycosylés sont des glycoprotéines. Or l'amylase (Doyon *et al*, 2002) et la lipase (Panteghini, 1992, Tietz et Shuey, 1993) pancréatiques sont en faits deux glycoprotéines.

L' α -amylase pancréatique possède 2 sites de glycosylation fortement conservés d'une espèce à l'autre dans son domaine-C, un domaine de la protéine localisé en C-terminal dont la fonction est toujours inconnue (Rydberg *et al*, 1999, Doyon *et al*, 2002). Lors de la transfection du gène de l'amylase pancréatique de rat dans des cellules hypophysaires, Doyon *et al*, ont démontré que l'amylase glycosylée représente 2% du total d'amylase exprimée par ces cellules (Doyon *et al*, 2002). Étant donné la rareté de l'événement de glycosylation de l'amylase pancréatique (Doyon *et al*, 2002), la conservation des sites de glycosylation dans le domaine C de l'amylase entre espèces est une chose étrange. Or, il semble que l'amylase pancréatique, retrouvée dans la circulation sanguine de plusieurs espèces, provient en partie de la transcytose de cette enzyme à partir de la lumière duodénale, du moins chez le rat. Ce passage par la muqueuse impliquant un passage par l'appareil de Golgi des cellules entérocytaires pourrait donner une raison d'être à ces sites de glycosylation et à leur conservation à travers les espèces. Il serait ainsi intéressant d'étudier d'avantage l'intervention de l'appareil de Golgi des cellules entérocytaires au niveau des sites de glycosylation de l'amylase.

La lipase pancréatique est présente sous deux formes (b et c) dans le sang d'individus sains et sous trois formes (a, b et c) dans le sang de patients atteints de pancréatite aigue (Panteghini, 1992). Les formes a et b retrouvées dans le sang de patients atteints de pancréatite aigue sont également présentes dans des homogénats de pancréas (Panteghini, 1992). Or, lors d'une pancréatite aigue, l'amylase et la lipase pancréatiques sanguines sont le résultat d'un déversement direct de ces enzymes dans la circulation sanguine (Papp *et al*, 1971, Gaisano, 2000, Takacs *et al*,

2001). Ainsi chez les patients atteints de cette pathologie, les formes a et b de la lipase pancréatique présentes dans les homogénats pourraient atteindre le sang grâce au déversement direct de celles-ci dans la circulation sanguine. D'un autre côté, la forme c de la lipase pancréatique trouvée naturellement dans la circulation sanguine de sujets sains est absente d'homogénats de pancréas (Panteghini, 1992). Considérant l'absence de données dans la littérature indiquant une autre source de lipase pancréatique, il est peu probable que la forme c sanguine ait une autre origine que le pancréas. Ainsi, des modifications apportées ultérieurement à sa sécrétion par le pancréas pourraient expliquer la présence de la forme c dans le sang. Ainsi l'appareil de Golgi des cellules entérocytaires pourrait être impliqué dans l'apparition de cette forme c de la lipase pancréatique dans la circulation sanguine de sujets sains.

Le passage par l'appareil de Golgi dans la transcytose est un phénomène également observé dans les cellules épithéliales mammaires et les cellules ganglionnaires de la rétine (Ollivier-Bousquet, 1998, Butowt et von Bartheld, 2001). Dans des travaux effectués en 1998, Ollivier-Bousquet démontre que la transferrine et la prolactine lient leur récepteur respectif à la membrane basolatérale des cellules épithéliales mammaires et que ces deux protéines sont dirigées vers la membrane apicale de ces cellules en passant par l'appareil de Golgi (Ollivier-Bousquet, 1998). Dans ce même article, toujours dans les cellules épithéliales mammaires, à l'aide de marqueurs membranaires apicaux et basolatéraux, l'auteur illustre que la transcytose de la membrane basolatérale à apicale contrairement à la transcytose de la membrane

apicale à basolatérale implique un passage par l'appareil de Golgi (Ollivier-Bousquet, 1998).

En 2001, des travaux sur le transport de la neurotrophine-3 démontrent que celle-ci est internalisée au niveau du corps cellulaire des cellules ganglionnaires de la rétine (Butowt et von Bartheld, 2001). Suite à son internalisation, la neurotrophine-3 emprunte deux voies cellulaires distinctes (Butowt et von Bartheld, 2001). La première est une voie lysosomale qui engendre la dégradation de la neurotrophine et est fort probablement une voie empruntée par la majorité des neurotrophines (Butowt et von Bartheld, 2001). La seconde voie, nouvellement décrite, est une voie Golgienne qui implique l'internalisation de la neurotrophine-3 au niveau du corps cellulaire, de son passage par l'appareil de Golgi, s'ensuit un transport antérograde de la neurotrophine-3 vers la fente synaptique qui permet ainsi son recyclage (Butowt et von Bartheld, 2001).

L'appareil de Golgi des cellules entérocytaires est une organelle de plus en plus ciblée comme un site additionnel au réticulum endoplasmique dans l'assemblage des lipoprotéines (Levy *et al*, 2002). Une MTP (protéine microsomale de transfert des triglycérides) fonctionnelle ainsi que l'apolipoprotéine B, toutes deux impliquées dans la formation des chylomicrons dans les entérocytes, ont été identifiées en colocalisation au niveau de l'appareil de Golgi (Levy *et al*, 2002). Ainsi cette colocalisation dans le Golgi suggère que ce dernier est fort probablement impliqué dans l'assemblage ou la maturation des lipoprotéines riches en triglycérides (Levy *et al*, 2002). Or, la BSDL internalisée par la muqueuse intestinale est associée dans le sang aux lipoprotéines dont les chylomicrons (Bruneau *et al*, 2003a). Il est

envisageable que l'association de la BSDL avec les lipoprotéines riches en triglycérides se fasse au niveau de l'appareil de Golgi des cellules intestinales étant donné l'implication apparente de celui-ci dans la synthèse de ces lipoprotéines et de la présence de cette lipase dans l'organelle (Bruneau *et al*, 2003a). Une fois dans la circulation en association avec les chylomicrons, la BSDL pourrait ainsi se retrouver en association avec les VLDLs et les LDLs suite aux modifications apportées aux chylomicrons pour en faire des VLDLs et des LDLs (Bruneau *et al*, 2003a). La lipase pancréatique étant structurellement très semblable à la lipoprotéine lipase (Tietz et Shuey, 1993) et étant internalisée comme la BSDL par la muqueuse intestinale pourrait être une seconde candidate dans l'association aux apolipoprotéines au niveau du Golgi des entérocytes de la muqueuse intestinale.

4. Fonction et stabilité des enzymes dans la circulation sanguine

Suite à leur passage dans l'appareil de Golgi et à leur sécrétion au niveau basolatéral de la cellule entérocytaire, l'amylase et la lipase pancréatiques se retrouvent dans le tissu interstitiel et gagnent la circulation sanguine via un transport vésiculaire dans les cellules endothéliales qui bordent les capillaires sanguins. Bien que leur présence soit considérée normale dans la circulation, la possibilité que ces enzymes possèdent toujours leur fonction demeure très débattue. Or, des études ont montré que l'amylase pancréatique sanguine se trouve liée à l'albumine (McGeachin et Lewis, 1959, Dreiling *et al*, 1963) et à la γ -globuline (Ujihira *et al*, 1965) alors que la lipase pancréatique dans le sérum a été identifiée en association avec l' α -globuline et la γ -globuline (Tietz et Shuey, 1993). Ces associations des enzymes digestives avec des protéines sanguines pourraient offrir une protection au milieu contre leur activité enzymatique.

Pour ainsi dire, l'amylase et la lipase pancréatiques sont des constituantes normales du sang dont les concentrations sanguines varient selon l'état d'activité du tissu d'origine et qui se trouvent en association avec des protéines sanguines leur conférant une certaine stabilité dans ce tissu.

5. Avenues futures, la Cpn60

Différents articles de Bruneau *et al* portant sur l'internalisation et la transcytose de la BSDL ont énoncé l'importance d'une chaperonne dans l'initiation de ce mécanisme (Bruneau *et al*, 1998, 2000a, b). Cette chaperonne, la Grp94 (glucose-regulated protein 94kDa), est synthétisée au niveau du pancréas (Nganga *et al*, 2000). Dans le réticulum endoplasmique rugueux des cellules acineuses, cette chaperonne effectue un contrôle de qualité sur la synthèse de protéines et principalement sur la synthèse, les modifications post-traductionnelles et la sécrétion de la BSDL (Nganga *et al*, 2000, Le Petit-Thevenin *et al*, 2001). Ainsi, la Grp94 est associée à la BSDL du réticulum endoplasmique rugueux à l'appareil de Golgi, se retrouve dans les grains de sécrétion avec la BSDL et est sécrétée sous forme du complexe Grp94-BSDL (Bruneau *et al*, 1998, 2000a). Le complexe Grp94-BSDL atteint ainsi la lumière duodénale et est par la suite associé aux microvillosités et aux compartiments endosomaux (Bruneau *et al*, 1998, 2000a, b). Suite à la dissociation du complexe Grp94-BSDL dans les endosomes, la BSDL est libre de rejoindre la membrane basolatérale (Bruneau *et al*, 1998, 2000a, b). Ainsi, l'association prolongée de la BSDL avec sa chaperonne dans la lumière intestinale, au niveau de la bordure en brosse et dans les endosomes a soulevé la possibilité que la Grp94 non seulement assure la bonne synthèse et la sécrétion de la BSDL mais la protège de dégradations dans la lumière duodénale en plus de faciliter son internalisation par la muqueuse (Bruneau *et al*, 2000b).

La chaperonine 60 (Cpn60) est une autre chaperonne retrouvée dans la voie de sécrétion des cellules acineuses (Arias *et al*, 1994, Velez-Granell *et al*, 1994, Le

Gall et Bendayan, 1996). Elle est présente en concentrations croissantes dans le réticulum endoplasmique rugueux, dans l'appareil de Golgi et dans les granules de sécrétion pour se retrouver finalement dans la lumière acineuse (Velez-Granell *et al*, 1994). La Cpn60, tout comme la Grp94, est associée à des protéines pancréatiques et plus particulièrement à l'amylase et la lipase dans ces différentes organelles (Le Gall et Bendayan, 1996). Elle pourrait ainsi, comme la Grp94, assurer la bonne synthèse et la sécrétion de l'amylase et de la lipase pancréatiques au niveau de la cellule acineuse (Le Gall et Bendayan, 1996). De plus, la Cpn60 identifiée au niveau des microvillosités et des compartiments endosomaux des cellules absorbantes (Bruneau *et al*, 2000b) pourrait assurer la protection de l'amylase et la lipase pancréatiques et favoriser leur internalisation par la muqueuse intestinale avant de se dissocier de ces enzymes digestives et permettre leur progression à l'appareil de Golgi et à la membrane basolatérale.

6. Conclusion

Les différentes expériences effectuées lors de ce travail ont permis d'établir l'existence d'une voie de passage de l'amylase et de la lipase du tissu pancréatique vers la circulation sanguine. Cette voie transcellulaire impliquant les endosomes, l'appareil de Golgi et la sécrétion au niveau basolatéral des entérocytes permet la translocation de deux enzymes actives de la lumière duodénale au sang. Bien que l'identification de cette voie intestinale n'enlève en rien la possibilité de l'existence des autres voies décrites, l'ampleur des variations des activités sanguines de l'amylase et de la lipase pancréatiques dans ces diverses expériences démontre que le passage intestinal des enzymes est d'importance physiologique. Ainsi, une panoplie de questions soulevées par la description de la voie d'internalisation de l'amylase et de la lipase pancréatiques reste à être adressée.

BIBLIOGRAPHIE

- Adler G, Gerhards G, Schick J, Rohr G, Kern HF (1983) Effects of in vivo cholinergic stimulation of rat exocrine pancreas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 244: G623-G629.
- Antopol W, Schifrin A, Tuchman L (1934) Blood amylase response to acetylcholine and its modification by physostigmine and atropine. *Proc Soc Exp Biol Med* 32: 383-385.
- Apple FS, Preese LM (1992) Does increased lipase activity in serum imply damage to the pancreas? *Clin Chem* 38: 602-603.
- Arendt T, Hansler M, Stoffregen C, Folsch UR (1996) Does high pancreatic duct pressure compromise the duct mucosal barrier function to pancreatic exocrine proteins? *APMIS* 104: 615-622.
- Argent BE, Githens S, Kalser S, Longnecker DS, Metzgar R, Williams JA (1992) The pancreatic duct cell. *Eur J Cell Biol* 61: 403-419.
- Arias AE, Velez-Granell CS, Torres-Ruiz JA, Bendayan M (1994) Involvement of molecular chaperones in the aberrant aggregation of secretory proteins in pancreatic acinar cells. *Exp Cell Res* 215: 1-8.
- Artursson P (1991). Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. *Crit Rev Ther Drug* 8: 305-330.
- Avakian A (1964) Further studies on the absorption of chymotrypsin. *Clin Pharmacol Ther* 5: 712-715.

- Barbour WMcA, Hopwood D (1983) Uptake of cationized ferritin by colonic epithelium. *J Pathology* 139: 167-178.
- Bendayan M, Bruneau A, Morisset J (1985) Morphometrical and immunocytochemical studies on rat pancreatic acinar cells under control and experimental conditions. *Biol Cell* 54: 227-234.
- Bendayan M, Gregoire S (1987) Immunohisto- and cytochemical studies of pancreatic enzymes in peri-insular and tele-insular acinar cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pancreas* 2: 272-282.
- Bendayan M, Levy E (1988) Immunocytochemical and biochemical evaluation of pancreatic lipase in acinar cells of control and streptozotocin-induced diabetic rats. *Pancreas* 3: 269-273.
- Bendayan M, Ziv E, Ben-Sasson R, Bar-On H, Kidron M (1990) Morpho-cytochemical and biochemical evidence for insulin absorption by the rat ileal epithelium. *Diabetologia* 33: 197-204.
- Bendayan M, Ziv E, Gingras D, Ben-Sasson R, Bar-On H, Kidron M (1994) Biochemical and morpho-cytochemical evidence for the intestinal absorption of insulin in control diabetic rats. Comparison between the effectiveness of duodenal and colon mucosa. *Diabetologia* 37: 119-126.
- Bertelli E, Bendayan M (2005) Association between endocrine pancreas and ductal system. More than an epiphenomenon of endocrine differentiation and development? *J Histochem Cytochem* 53: 1071-1086.
- Bockman DE (1993) Anatomy of the pancreas. Dans: *The Pancreas. Biology, pathobiology and disease*, 2nd Edition. Raven Press, New York, 1-8.

- Bockman DE, Winborn WB (1966) Light and electron microscopy of intestinal ferritin absorption. Observations in sensitized and non-sensitized hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Anat Rec* 155: 603-622.
- Bruneau N, Bendayan M, Gingras D, Ghitescu L, Levy E, Lombardo D (2003a) Circulating bile salt-dependent lipase originates from the pancreas via intestinal transcytosis. *Gastroenterology* 124: 470-480.
- Bruneau N, Lombardo D, Bendayan M (1998) Participation of GRP94-related protein in secretion of pancreatic bile salt-dependent lipase and in its internalization by the intestinal epithelium. *J Cell Sci* 111: 2665-2679.
- Bruneau N, Lombardo D, Bendayan M (2000a) The affinity binding sites of pancreatic bile salt-dependent lipase in pancreatic and intestinal tissues. *J Histochem Cytochem* 48: 267-276.
- Bruneau N, Lombardo D, Levy E, Bendayan M (2000b) Roles of molecular chaperones in pancreatic secretion and their involvement in intestinal absorption. *Microsc Res Techniq* 49: 329-345.
- Bruneau N, Nganga A, Bendayan M, Lombardo D (2001) Transcytosis of pancreatic bile salt-dependent lipase through human Int407 intestinal cells. *Exp Cell Res* 271: 94-108.
- Bruneau N, Richard S, Silvy F, Verine A, Lombardo D (2003b) Lectin-like Ox-LDL receptor is expressed in human Int407 intestinal cells: involvement in the transcytosis of pancreatic bile salt-dependent lipase. *Mol Biol Cell* 14: 2861-2875.

- Butowt R, von Bartheld CS (2001). Sorting of internalized neurotrophins into an endocytic transcytosis pathway via the Golgi system: ultrastructural analysis in retinal ganglion cells. *J Neurosci* 21: 8915-8930.
- Chey WY (1993) Hormonal control of pancreatic exocrine secretion. Dans: *The Pancreas. Biology, pathobiology and disease*, 2nd Edition. Raven Press, New York, 403-424.
- Cornell R, Walker WA, Isselbacher KJ (1971) Small intestinal absorption of horseradish peroxidase. A cytochemical study. *Lab Invest* 25: 42-48.
- Daggi H, Ustun S, Taner MS, Ersoz G, Karacasu F, Budak S (2002). Protozoon infections and intestinal permeability. *Acta Trop* 81: 1-5.
- Darnis S, Juge N, Guo XJ, Marchis-Mouren G, Puigserver A, Chaix JC (1999) Molecular cloning and primary structure analysis of porcine pancreatic α -amylase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1430: 281-289.
- Devillers-Thiery A, Kindt T, Scheele G, Blobel G (1975) Homology in the amino-terminal sequence of precursors to pancreatic secretory proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 5016-5020.
- Doyon Y, Home W, Daull P, LeBel D (2002). Effect of C-domain N-glycosylation and deletion on rat pancreatic α -amylase secretion and activity. *Biochem J* 362: 259-264.
- Dreiling DA, Janowitz HD, Lazar JJ (1963) Serum iso-amylases. An electrophoretic study of the blood amylase and patterns observed in pancreatic disease. *Ann Intern Med* 58: 235-244.

- Falt H, Hernell O, Blackberg L (2001) Do human bile salt stimulated lipase and colipase-dependent pancreatic lipase share a common heparin-containing receptor? *Arch Biochem Biophys* 386: 188-194.
- Farquhar MG (1985) Progress in unravelling pathways of Golgi traffic. *Annu Rev Cell Biol* 1: 447-488.
- Ferey-Roux G, Perrier J, Forest E, Marchis-Mouren G, Puigserver A, Santimone M (1998) The human pancreatic α -amylase isoforms: isolation, structural studies and kinetics of inhibition by acarbose. *Biochim Biophys Acta* 1388: 10-20.
- Gaisano HY (2000) A hypothesis: SNARE-ing the mechanisms of regulated exocytosis and pathologic membrane fusions in the pancreatic acinar cell. *Pancreas* 20: 217-226.
- Gaisano HY, Lutz MP, Leser J, Sheu L, Lynch G, Tang L, Tamori Y, Trimble WS, Salapatek AMF (2001) Supramaximal cholecystokinin displaces Munc18c from the pancreatic acinar basal surface, redirecting apical exocytosis to the basal membrane. *J Clin Invest* 108:1597-1611.
- Gaisano HY, Sheu L, Whitcomb D (2004) Alcoholic chronic pancreatitis involves displacement of Munc18c from the pancreatic acinar basal membrane surface. *Pancreas* 28: 395-400.
- Gingras D, Bendayan M (2005) Evaluation of pancreatic amylase mRNA upon cholinergic stimulation of secretion. *J Histochem Cytochem* 53: 93-103.

- Gregoire S, Bendayan M (1986) Immunocytochemical studies of pancreatic acinar cells in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 29: 655-660.
- Gregoire S, Bendayan M (1987) Immunocytochemical studies of pancreatic acinar cells from spontaneously diabetic BB Wistar rats. *Pancreas* 2: 205-211.
- Harper AA, Scratcherd T (1979) Mechanism of pancreatic electrolyte secretion. Dans: *The exocrine Pancreas*. Howat HT, Sarles H. WB Saunders Edition, London, 50-85.
- Hokari S, Miura K, Koyama I, Kobayashi M, Matsunaga T, Iino N, Komoda T (2003) Expression of α -amylase isozymes in rat tissues. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 135: 63-69.
- Imperiali B (1997) Protein glycosylation: the clash of the titans. *Acc Chem Res* 30: 452-459.
- Isenman L, Liebow C, Rothman S (1999) The endocrine secretion of mammalian digestive enzymes by exocrine glands. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276: E223-E232.
- Isenman LD, Rothman SS (1977) Transport of α -amylase across the basolateral membrane of the pancreatic acinar cell. *Proc Natl Acad Sci* 74: 4068-4072.
- Jamieson JD, Palade GE (1967) Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. *J Cell Biol* 34: 597-615.

- Jamieson JD, Palade GE (1971) Synthesis, intracellular transport, and discharge of secretory proteins in stimulated pancreatic exocrine cells. *J Cell Biol* 50: 135-158.
- Jamieson JD, Palade GE (1977) Production of secretory proteins in animal cells. Dans: *International cell biology (1976-1977)* Brinkley BR, Porter KR. Rockefeller University Press Edition, New York, 308-317.
- Janowitz HD, Dreiling DA (1959) The plasma amylase, source, regulation and diagnostic significance. *Am J Med* 27: 924-935.
- Kabacoff BL, Wohlman A, Umhey M, Avakian S (1963) Absorption of chymotrypsin from the intestinal tract. *Nature* 4895: 815.
- Kern HF (1993) Fine structure of the human exocrine pancreas. Dans: *The Pancreas. Biology, pathobiology and disease, 2nd Edition*. Raven Press, New York, 9-19.
- Kodoma T (1983) A light and electron microscopic study of the pancreatic ductal system. *Acta Pathol Jpn* 33: 297-321.
- Korc M (1993) Normal function of the endocrine pancreas. Dans: *The Pancreas. Biology, pathobiology and disease, 2nd Edition*. Raven Press, New York, 751-758.
- Lau ST, Simchuk EJ, Kozarek RA, Traverso LW (2001). A pancreatic ductal leak should be sought to direct treatment in patients with acute pancreatitis. *Am J Surg* 181: 411-415.

- Lee PC, Jordan M, Pieper GM, Roza AM (1995) Normalization of pancreatic exocrine enzymes by islet transplantation in diabetic rats. *Biochem Cell Biol* 73: 269-273.
- Le Gall IM, Bendayan M (1996) Possible association of chaperonin 60 with secretory proteins in pancreatic acinar cells. *J Histochem Cytochem* 44: 743-749.
- Le Petit-Thevenin J, Verine A, Nganga A, Nobili O, Lombardo D, Bruneau N (2001) Impairment of bile salt-dependent lipase secretion in AR4-2J rat pancreatic cells induces its degradation by the proteasome. *Biochim Biophys Acta* 1530: 184-198.
- Levy E, Stan S, Delvin E, Menard D, Shoulders C, Garofalo C, Slight I, Seidman E, Mayer G, Bendayan M (2002) Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi. Possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem* 277: 16470-16477.
- Like AL, Orci L (1972) Embryogenesis of the human pancreatic islets: a light and electron microscopic study. *Diabetes* 21: 511-534.
- Lott JA, Carrie JL (1991) Lipase isoforms and amylase isoenzymes: assays and application in the diagnosis of acute pancreatitis. *Clin Chem* 37: 361-368.
- Lowe ME (1997) Molecular mechanisms of rat and human pancreatic triglyceride lipases. *J Nutr* 127: 549-557.
- Lowe ME (2002) The triglyceride lipases of the pancreas. *J Lipid Res* 43: 2007-2016.

- MacDonald RJ, Crerar MM, Swain WF, Pictet RL, Thomas G, Rutter WJ (1980) Structure of a family of rat amylase genes. *Nature* 287: 117-122.
- Madara JL (1987) Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton. *Am J Physiol* 253: C171-C175.
- Maiuri L, Raia V, Potter J, Swallow D, Ho MW, Fiocca R, Finzi G, Cornaggia M, Capella C, Quaroni A, Auricchio S (1991) Mosaic pattern of lactase expression by villous enterocytes in human adult-type hypolactasia. *Gastroenterology* 100: 359-369.
- Maiuri L, Rossi M, Raia V, D'Auria S, Swallow D, Quaroni A, Auricchio S (1992) Patchy expression of lactase protein in adult rabbit and rat intestine. *Gastroenterology* 103: 1739-1746.
- Maiuri L, Rossi M, Raia V, Garipoli V, Hughes LA, Swallow D, Noren O, Sjostrom H, Auricchio S (1994) Mosaic regulation of lactase in human adult-type hypolactasia. *Gastroenterology* 107: 54-60.
- Marcil V, Peretti N, Delvin E, Levy E (2004) Digestive and absorptive processes of alimentary fat [in French]. *Gastroenterol Clin Biol* 28: 1257-1266.
- McGeachin RL, Lewis JP (1959) Electrophoretic behavior of serum amylase. *J Biol Chem* 234: 795-798.
- Miyasaka K, Rothman SS (1981) Endocrine secretion of α -amylase by the pancreas. *Am J Physiol* 241: G170-G175.

- Miyasaka K, Rothman SS (1982) Redistribution of amylase activity accompanying its secretion by the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 5438-5442.
- Moog F (1981) The lining of the small intestine. *Sci Am* 245: 154-158.
- Mori DM, Baviera AM, Toledo de Oliveira Ramalho L, Vendramini RC, Brunetti IL, Pepato MT (2003) Temporal response pattern of biochemical analytes in experimental diabetes. *Biotechnol Appl Biochem* 38: 183-191.
- Moriya H, Moriwaki C, Akimoto S, Yamaguchi K, Iwadare M (1967) Studies on the passage of α -chymotrypsin across the intestine. *Chem Pharm Bull* 15: 1662-1668.
- Murtaugh CL, Melton DA (2003) Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 71-89.
- Nganga A, Bruneau N, Sbarra V, Lombardo D, Le Petit-Thevenin J (2000) Control of pancreatic bile-salt-dependent-lipase secretion by the glucose-regulated protein of 94 kDa (Grp94). *Biochem J* 352: 865-874.
- Ollivier-Bousquet M (1998) Transferrin and prolactin transcytosis in the lactating mammary epithelial cell. *J Mammary Gland Biol* 3: 303-313.
- Pageot L-P, Perreault N, Basora N, Francoeur C, Magny P, Beaulieu J-F (2000) Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Microsc Res Tech* 49: 394-406.
- Palade G (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347-358.

- Panteghini M (1992) Electrophoretic fractionation of pancreatic lipase. Clin Chem 38: 1712-1716.
- Papp M, Feher S, Folly G, Horvath EJ (1977) Absorption of pancreatic lipase from duodenum into lymphatics. Experientia 33: 1191-1192.
- Papp M, Folly G, Nemeth EP (1981) Quantitative analysis of lipase and amylase secreted into pancreatic juice and plasma volume in the rat. Acta Physiol Hung 58: 31-37.
- Papp M, Nemeth EP, Horvath EJ (1971) Pancreaticoduodenal lymph flow and lipase activity in acute experimental pancreatitis. Lymphology 4: 48-53.
- Rohr G, Scheele G (1983) Fate of radioactive exocrine pancreatic proteins injected into the blood circulation of the rat. Tissue uptake and transepithelial excretion. Gastroenterology 85: 991-1002.
- Rothman SS, Grendell JH (1983) The case of the disappearing pancreatic digestive enzymes. Gastroenterology 85: 1438-1442.
- Rotoli BM, Bussolati O, Dall'Asta V, Orlandini G, Gatti R, Gazzola GC (2000) Secretin increases the paracellular permeability of CAPAN-1 pancreatic duct cells. Cellular Physiol Biochem 10: 13-25.
- Rydberg EH, Sidhu G, Vo HC, Hewitt J, Cote HCF, Wang Y, Numao S, MacGillivray RTA, Overall CM, Brayer GD, Withers SG (1999) Cloning, mutagenesis, and structural analysis of human pancreatic α -amylase expressed in *Pichia pastoris*. Protein Sci 8: 635-643.

- Saito A, Kanno T (1973) Concentration of pancreozymin as a determinant of the exocrine-endocrine partition of pancreatic enzymes. *Jpn J Physiol* 23: 477-495.
- Scheele G, Adler G, Kern H (1987). Exocytosis occurs at the lateral plasma membrane of the pancreatic acinar cell during supramaximal secretagogue stimulation. *Gastroenterology* 92: 345-353.
- Schifrin A, Tuchman L, Antopol W (1936) Blood amylase response to acetyl- β -methylcholine chloride in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med* 34: 539-540.
- Schneyer CA, Schneyer LH (1960) Amylase in rat serum, submaxillary gland and liver following pilocarpine administration or normal feeding. *Am J Physiol* 198: 771-773.
- Schulz I (1981) Electrolyte and fluid secretion in the exocrine pancreas. Dans: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Johnson LR. Raven Press Edition, New York, 795-819.
- Semakula C, Vandewalle CL, Van Schravendijk CFH, Sodoyez JC, Schuit FC, Foriers A, Falorni A, Craen M, Decraene P, Pipeleers DG, Gorus FK, the Belgian Diabetes Registry (1996) Abnormal circulating pancreatic enzyme activities in more than twenty-five percent of recent-onset insulin-dependent diabetic patients: association of hyperlipasemia with high-titer islet cell antibodies. *Pancreas* 4: 321-333.
- Slack JMW (1995) Developmental biology of the pancreas. *Development* 121: 1569-1580.

- Smith PL, Wall DA, Gochoco CH, Wilson G (1992) Routes of delivery: case studies. Oral absorption of peptides and proteins. *Adv Drug Deliver Rev* 8: 253-290.
- Sood A, Panchagnula R (2001) Peroral route: an opportunity for protein and peptide drug delivery. *Chem Rev* 101: 3275-3303.
- Steer ML (1993) Etiology and pathophysiology of the acute pancreatitis. Dans: *The Pancreas. Biology, pathobiology and disease*, 2nd Edition. Raven Press, New York, 581-591.
- Swenson ES, Curatolo WJ (1992) Means to enhance penetration. Intestinal permeability enhancement for proteins, peptides and other polar drugs: mechanisms and potential toxicity. *Adv Drug Deliver Rev* 8: 39-92.
- Takacs T, Hegyi P, Jarmay K, Czako L, Gog C, Rakonczay Z, Nemeth J, Lonovics J (2001) Cholecystokinin fails to promote pancreatic regeneration in diabetic rats following the induction of experimental pancreatitis. *Pharmacol Res* 44: 363-372.
- Tietz NW, Shuey DF (1993) Lipase in serum-the elusive enzyme: an overview. *Clin Chem* 39: 746-756.
- Tuchman L, Schifrin A, Antopol W (1936) Blood amylase response to acetyl- β -methylcholine chloride in pancreatectomized dogs. *Proc Soc Exp Biol Med* 33: 142-144.
- Ujihira I, Searcy RL, Berk JE, Hayashi S (1965) A saccharogenic method for estimating electrophoretic and chromatographic distribution of human serum amylase. *Clin Chem* 11: 97-112.

- Van Beers EH, Rings EHHM, Posthuma G, Dingenanse MA, Taminiau JAMJ, Heymans HSA, Einerhand AWC, Büller HA, Dekker J (1998) Intestinal carbamoyl phosphate synthase I in human and rat: expression during development shows species differences and mosaic expression in duodenum of both species. *J Histochem Cytochem* 46: 231-240.
- Velez-Granell CS, Arias AE, Torres-Ruiz JA, Bendayan M (1994) Molecular chaperones in pancreatic tissue: the presence of cpn10, cpn60 and hsp70 in distinct compartments along the secretory pathway of the acinar cells. *J Cell Sci* 107: 539-549.
- Verhoef JC, Bodde HE, de Boer AG, Bouwstra JA, Junginger HE, Merkus FWHM, Breimer DD (1990) Transport of peptide and protein drugs across biological membranes. *Eur J Drug Metab Ph* 15: 83-93.
- Walker WA, Isselbacher KJ, Bloch KJ (1972) Intestinal uptake of macromolecules: effect of oral immunization. *Science* 177: 608-610.
- Wang W (1996) Oral Protein Drug Delivery. *J Drug Target* 4: 195-232.
- Wasle B, Edwardson JM (2002) The regulation of exocytosis in the pancreatic acinar cell. *Cell Signal* 14: 191-197.
- Weiner ML (1988) Intestinal transport of some macromolecules in food. *Fd Chem Toxic* 26: 867-880.
- Williams JA, Goldfine ID (1993) The insulin-acinar relationship. Dans: *The Pancreas. Biology, pathobiology and disease*, 2nd Edition. Raven Press, New York, 789-802.

- Yokouchi H, Horii A, Emi M, Tomita N, Doi S, Ogawa M, Mori T, Matsubara K (1990) Cloning and characterization of a third type of human α -amylase gene, *AMY2B*. *Gene* 90: 281-286.
- Young MK, Tseng HC, Fang H, Liang W, Rothman SS (1996) Comparison of stored and secreted rat pancreatic digestive enzymes by mass spectrometry: α -amylase. *BBA-Protein Struct M* 1293: 63-71.
- Ziv E, Bendayan M (2000) Intestinal absorption of peptides through the enterocytes. *Microsc Res Techniq* 49: 346-352.
- Ziv E, Lior O, Kidron M (1987) Absorption of protein via the intestinal wall. A quantitative model. *Biochem Pharmacol* 36: 1035-1039.

REMERCIEMENTS

L'aboutissement de deux ans de travail ne peut être réalisé sans la contribution intellectuelle, technique et morale d'un grand nombre de personnes. Je voudrais d'abord remercier mon directeur, Dr M. Bendayan, sans la présence de qui je n'aurais pu accomplir mes études de maîtrise. Vous m'avez permis d'apprendre plus de choses en deux ans tant sur le plan scientifique que sur le plan personnel que je ne l'aurais cru possible. Merci de m'avoir ouvert votre porte et merci de votre support.

Un gros merci à Diane Gingras. Merci pour tes nombreux conseils, ton support moral et merci pour ton amitié. J'ai partagé des cafés et des moments avec toi que jamais je n'oublierai. Merci à Irène Londoño pour tes conseils et ton sourire. Merci à Elizabeth Gervais et Denis Rodrigue pour le support technique.

Je voudrais aussi remercier mes parents pour leur support et leur présence au cours de ces deux ans sans oublier la totalité de mes 24 années. Je vous aime. Merci pour votre confiance, votre fierté et vos encouragements. Merci à toute ma famille, votre présence seule dans ma vie me donne des forces. Merci à mes grands-parents pour tout. Un gros merci à mes amis: Sonia, Laura, Gérémi, Max et Amélie. Un merci tout spécial à Éric, c'est une histoire que j'ai commencée avec toi et que j'accomplis avec toi.

Finalement je voudrais souligner le soutien financier des IRSC.

Merci.

CURRICULUM VITAE

I RENSEIGNEMENTS PERSONNELS

Nom et prénom : Maryse Cloutier

Sexe : Féminin

Date de naissance : [REDACTED]

E-mail : [REDACTED]

Tel : [REDACTED]

II ÉDUCATION

- Maîtrise en biologie cellulaire, Département de pathologie et biologie cellulaire
Université de Montréal, Montréal, Qc
2003-présent
- Baccalauréat en Sciences, Biopharmaceutique option biologie génomique
Université d'Ottawa, Ottawa, ON
2000-2003, obtention du diplôme avril 2003
- Baccalauréat international et DEC en sciences pures
Le petit séminaire de Québec, campus de l'Outaouais, Hull, Qc
1998 - 2000, obtention du diplôme 7 août 2000
- Études secondaires
Lycée Paul Claudel, Ottawa, ON
1993-1998

III BOURSES ET PRIX OBTENUS

- 2003-2005 Programme de bourses d'excellence du département de pathologie
et biologie cellulaire
Université de Montréal, Montréal, Qc
- Été 2003 Concours de bourses de stagiaire d'été, Faculté de médecine
Université de Montréal, Montréal, Qc
- Mai 2004 1^{er} prix pour présentation orale à la journée scientifique 2004
Université de Montréal, Montréal, Qc
- Juillet 2004 Travel Grant
Award Committee of Histochemical Society

○ Juin 2005 2^{ième} prix pour presentation orale à la journée scientifique 2005
Université de Montréal, Montréal, Qc

IV PUBLICATION

Article:

Internalization and transcytosis of pancreatic enzymes by the intestinal mucosa.

M. Cloutier, D. Gingras and M. Bendayan

Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Février 2006 (accepté)

Résumés:

Internalisation d'enzymes pancréatiques par la muqueuse intestinale

M. Cloutier, D. Gingras et M. Bendayan

Journée scientifique 2004 de l'université de Montréal, Montréal, Qc

Internalization of pancreatic enzymes by the intestinal mucosa.

M. Cloutier, D. Gingras and M. Bendayan

Journal of Histochemistry and Cytochemistry, July 2004, Cal, USA

Internalisation d'enzymes pancréatiques par la muqueuse intestinale

M. Cloutier, D. Gingras et M. Bendayan

Diabète Québec 2005, Québec, Qc

Internalisation d'enzymes pancréatiques par la muqueuse intestinale

M. Cloutier, D. Gingras et M. Bendayan

Journée scientifique 2005 de l'université de Montréal, Montréal, Qc

Internalisation d'enzymes pancréatiques par la muqueuse intestinale

M. Cloutier, D. Gingras et M. Bendayan

4^{ième} Symposium de Physiopathologie du tube digestif, juin 2005, Orford, Qc

V EMPLOIS ANTÉRIEURS

- Été 2003 Stagiaire dans le laboratoire du Dr. Bendayan,
Département de pathologie et biologie cellulaire
Université de Montréal
- 2001–2002 Responsable en entretien et aménagement paysager
Entreprise Tenaga, Ottawa, On
- Été 2000 Caissière chez Rona l'entrepôts, Gatineau, Qc
- Été 1999 Employée chez Subway, Gatineau, Qc
- Été 1998 Caissière dans un dépanneur Proprio, Gatineau, Qc
- Été 1997 Employée chez McDonald, Gatineau, Qc

VI CONNAISSANCES ACQUISES

- **Langues** : français et anglais
- **Microscopie** : Fixation et enrobage de tissus, microscopie optique, microscopie électronique, techniques d'immunocytochimie impliquant entre autre l'or colloïdal.
- **Microbiologie et Immunologie** : Techniques de désinfection et antisepsies, génération et maintien de cultures bactériennes, examens microscopiques et macroscopiques des microorganismes, colorations et identification de souches bactériennes par leurs métabolismes respectifs et par génération d'empreinte génétique, test ELISA, test d'agglutination.
- **Biologie Moléculaire et Génomique** : Électrophorèse sur gel, techniques de transfert Southern et Northern, PCR et RT-PCR, génération de cartes de restrictions, clonage, isolation d'ADN, séquençage, utilisation de sources informatiques pour interprétation de données.

VII FORMATIONS DIVERSES

- Formation en expérimentation animale, Université de Montréal
- Formation de base en sécurité au laboratoire, Université de Montréal
- Formation en sécurité et urgence au foyer (cours de premiers soins)
- Certifiée pour sauvetage I, II et III de la Croix rouge