



HAL
open science

Fonctions in vivo de la mucine Muc5b : création et caractérisation d'une lignée transgénique rapporteur Muc5b-GFP

Céline Portal

► **To cite this version:**

Céline Portal. Fonctions in vivo de la mucine Muc5b : création et caractérisation d'une lignée transgénique rapporteur Muc5b-GFP. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S023 . tel-02426169

HAL Id: tel-02426169

<https://theses.hal.science/tel-02426169>

Submitted on 2 Jan 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ LILLE 2 DROIT ET SANTÉ

THÈSE de DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ – LILLE 2

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

présentée par

Céline PORTAL

Fonctions *in vivo* de la mucine Muc5b.

**Création et caractérisation d'une lignée transgénique
murine rapporteur Muc5b-GFP.**

Thèse dirigée par le Docteur Jean-Luc DESSEYN

Soutenue publiquement le 5 décembre 2016 devant le jury composé de :

Mme le Docteur Françoise BRIGNOLE-BAUDOUIN

Rapporteur

M. le Docteur Éric OGIER-DENIS

Rapporteur

M. le Professeur Frédéric GOTTRAND

Examineur, Président

M. le Docteur Jean-Luc DESSEYN

Examineur,

Directeur de thèse

Ce travail a été réalisé au sein du Centre de Recherche LIRIC UMR 995,
dirigé par le Professeur Pierre Desreumaux,
sous la direction scientifique du Docteur Jean-Luc Desseyn.

UMR 995, équipe du Professeur Frédéric Gottrand
Modulations nutritionnelles de l'inflammation et de l'infection

Université Lille 2 / Inserm / CHU de Lille
Faculté de médecine – Pôle recherche, 5^{ème} étage
1 place de Verdun
59045 Lille

Je remercie pour l'honneur qu'ils me font :

M. le Professeur Frédéric GOTTRAND,

en acceptant de présider ce jury ;

Mme le Docteur Françoise BRIGNOLE-BAUDOUIN,

M. le Docteur Éric OGIER-DENIS,

en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse ;

M. le Professeur Frédéric GOTTRAND,

M. le Docteur Jean-Luc DESSEYN,

en acceptant de juger ce travail.

Je tiens à remercier sincèrement,

Monsieur le Professeur Frédéric Gottrand :

« Vous m'avez accueillie au sein de votre laboratoire pour préparer cette thèse de sciences. Merci pour votre soutien, vos conseils et suggestions et pour la confiance que vous m'avez témoignée. »

Monsieur le Docteur Jean-Luc Desseyn :

« Vous avez accepté d'être mon directeur de thèse. Je tiens à vous remercier pour votre passion à partager vos connaissances scientifiques, votre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre écoute, vos conseils, les nombreux schémas vectoriels, votre humour et pour la confiance que vous m'avez témoignée. Merci de m'avoir fait « grandir » un peu plus chaque jour au cours de ces trois années. J'espère que mon parcours scientifique vous fera toujours honneur. »

Madame le Docteur Valérie Gouyer :

« Merci pour ton aide précieuse, ta disponibilité et tes conseils. Grâce à toi l'histologie retrouve toute sa clarté. »

Madame le Docteur Marie-Odile Husson :

« Merci pour vos conseils et votre expérience. »

Mylène Magnien et Ségolène Plet :

« Merci pour votre aide technique tout au long de ces trois ans et pour les bons moments passés au quotidien. »

Je remercie également tous les autres membres du laboratoire, les stagiaires et doctorants (Rachid Aijjou, Thomas Hueso, Bastien Demouveaux et Delphine Ley) pour leur sympathie et leur bonne humeur au quotidien. Un merci tout spécial à Madeleine Gottrand pour son aide pour la caractérisation des lignées Muc5bKO et Muc5b^{lung ko/ko} et pour son amitié.

Je remercie également les Docteurs Catherine Robbe-Masselot et Catherine Duez, d'avoir accepté d'être membres de mon comité de suivi de thèse, de m'avoir conseillée et d'avoir discuté l'avancée de mes travaux tout au long de ces trois ans.

Je remercie également le personnel de l'animalerie et plus particulièrement Delphine Taillieu, Julien Devassine et Priscilla Dassonville sans qui la gestion au quotidien des animaux n'aurait pas été possible.

Je remercie également Marie-Hélène et Rose-Marie pour les coupes histologiques, et surtout pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Je remercie également

L'Université Lille 2,

L'association Vaincre la Mucoviscidose,

Pour leur soutien financier qui m'a permis de réaliser ce travail de thèse.

Le travail que j'ai réalisé au cours de ces trois années de thèse a donné lieu aux communications scientifiques suivantes :

ARTICLES SCIENTIFIQUES SOUMIS

Preclinical mouse model to monitor live conjunctival goblet cell density under pharmacological treatments.

Portal C, Gouyer V, Gottrand F, Desseyn JL

Long-term dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids show benefits to the lungs of Cftr Δ F508 mice.

Portal C, Gouyer V, Leonard R, Husson MO, Gottrand F, Desseyn JL

In vivo imaging of the Muc5b gel-forming mucin.

Portal C, Gouyer V, Magnien M, Plet S, Gottrand F, Desseyn JL

REVUE SCIENTIFIQUE

Modulation of host defence against bacterial and viral infections by omega-3 polyunsaturated fatty acids.

Husson MO, Ley D, **Portal C**, Gottrand M, Hueso T, Desseyn JL, Gottrand F
Journal of Infection. doi:10.1016/j.jinf.2016.10.001

RÉSUMÉS PUBLIÉS

Long-term (n-3) pufa supplementation improves lung histology of Cftr Delta F508 mice.

Portal C, Gouyer V, Husson MO, Gottrand F, Desseyn JL

Acta Physiologica 217 (Supp. 708) : 107 (2016)

COMMUNICATIONS DANS LE CADRE DE CONGRES NATIONAUX ET INTERNATIONAUX

Communications orales

(n-3) PUFAs improve histology of LPS inhalation-induced lung inflammation of Cfr Δ F508 mice.

Portal C, Gouyer V, Husson M-O, Gottrand F, Desseyn J-L

10th European CF Young Investigator Meeting, Paris, France, février 2016

Long-term nutritional (n-3) PUFA supplementation improves lung histology of Cfr Δ F508 mice.

Portal C, Gouyer V, Husson M-O, Gottrand F, Desseyn J-L

9th European CF Young Investigator Meeting, Paris, France, février 2015

Communications affichées

Preclinical mouse model to monitor live conjunctival goblet cell density under pharmacological treatments.

Portal C, Gouyer V, Gottrand F, Desseyn J-L

8th International conference on the Tear Film & Ocular Surface: Basic Science and Clinical Relevance, Montpellier, France, septembre 2016

TFOS Travel Award

New transgenic reporter mouse to study live gelling mucin and mucous cell density.

Portal C, Gouyer V, Gottrand F, Desseyn J-L

11th European Molecular Imaging Meeting, Utrecht, Pays-Bas, mars 2016

(n-3) PUFAs improve histology of LPS inhalation-induced lung inflammation of Cfr Δ F508 mice.

Portal C, Gouyer V, Husson M-O, Gottrand F, Desseyn J-L

10th European CF Young Investigator Meeting, Paris, France, février 2016

Characterization of the production of Muc5b using a new mouse strain modified on the Muc5b locus.

Portal C, Gouyer V, Gottrand F, Desseyn J-L

15^{ème} Journée André Verbert, Lille, France, septembre 2015

Long-term nutritional (n-3) PUFA supplementation improves lung histology of Cftr Δ F508 mice.

Portal C, Gouyer V, Husson M-O, Gottrand F, Desseyn J-L

9th European CF Young Investigator Meeting, Paris, France, février 2015

PRIX

TFOS Travel Award

Inscription au congrès, frais de voyage et co-modération d'une session

8th International conference on the Tear Film & Ocular Surface: Basic Science and Clinical Relevance, Montpellier, France, septembre 2016

PRÉSENTATIONS ORALES AU SEIN DU LIRIC

Preclinical mouse model to monitor live conjunctival goblet cell differentiation under pharmacological treatments.

Journée des étudiants du LIRIC (en anglais), Lille, France, mai 2016

Prix du meilleur résumé selon les chefs d'équipe du LIRIC

Compensatory Muc5b production in Muc5b-positive goblet cell loss in a mouse model of dry eye disease.

Journée des étudiants du LIRIC (en anglais), Lille, France, mai 2015

Prix du meilleur résumé selon les chefs d'équipe du LIRIC

Caractérisation de la production de la mucine Muc5b grâce à une nouvelle lignée murine modifiée sur le gène *Muc5b*.

Journée des étudiants du LIRIC (en français), Lille, France, décembre 2014

Prix du meilleur résumé selon les doctorants du LIRIC

(n-3) PUFA decrease the production/secretion of pulmonary mucus in cystic fibrosis.

Journée des étudiants du LIRIC (en anglais), Lille, France, mai 2014

Diminution de la production/sécrétion du mucus pulmonaire dans la mucoviscidose par les acides gras polyinsaturés (n-3).

Journée des étudiants du LIRIC (en français), Lille, France, décembre 2013

RÉSUMÉ

MUC5B, une des 5 mucines gélifiantes chez les mammifères, constitue la matrice de gels de mucus et est responsable des propriétés visco-élastiques de ces gels. Cette macromolécule est sécrétée par des cellules caliciformes dont la densité reflète l'homéostasie des épithéliums sécrétoires.

L'objectif principal de ce travail de thèse était la création et la caractérisation d'une souris transgénique afin de suivre facilement la production *in vivo* de Muc5b. Le second objectif était de montrer, chez des souris mucoviscidosiques Cftr Δ F508, qu'une nutrition enrichie en acides gras polyinsaturés à longues chaînes (n-3) module la production de la mucine Muc5b, confirmant des résultats précédemment publiés par le laboratoire sur la régulation transcriptionnelle du gène *Muc5b* chez des souris de type sauvage par ce régime alimentaire.

Une souris transgénique Muc5b-GFP a été créée par insertion d'une séquence codant la GFP (pour « Green Fluorescent Protein ») à la place du codon Stop de *Muc5b*. Le profil d'expression de Muc5b a été déterminé *ex vivo* sur tissus et chez la souris anesthésiée. Muc5b est produit dans l'oreille moyenne, l'œil, la cavité nasale, la trachée, la vésicule biliaire, le cervix, ainsi que dans le poumon embryonnaire à E12,5. Nous apportons la preuve de concept que Muc5b-GFP est un biomarqueur de la densité des cellules à mucus dans un modèle de syndrome de l'œil sec où nous mesurons, chez la souris anesthésiée, une diminution de la densité en cellules caliciformes qui est restaurée par application topique d'interleukine 13. La souris Muc5b-GFP est donc un modèle pré-clinique pour suivre la production de la mucine et la densité de cellules caliciformes. Dans le modèle murin Cftr Δ F508, nous montrons qu'une supplémentation à long terme en acides gras polyinsaturés à longues chaînes (n-3) n'influence pas le taux d'expression de Muc5b suite à une inflammation pulmonaire aiguë, mais améliore l'histologie pulmonaire et module la réponse inflammatoire.

Mots-clés : mucus, mucines, Muc5b, endomicroscopie confocale, œil sec, mucoviscidose

ABSTRACT

MUC5B, one of the 5 gel-forming mucins in mammals, is part of the mucus gels and responsible of the visco-elastic properties of these gels. The goblet cell density, which secrete this macromolecule, reflects the homeostasis of secretory epitheliums.

The main goal of this thesis was the creation and characterization of a transgenic mouse to easily follow *in vivo* the production of Muc5b. The second goal was to show that, as previously reported by the laboratory in wild-type mice, a (n-3) long chain polyunsaturated fatty acid enriched diet modulates the production of Muc5b in the cystic fibrosis mouse model Cfr Δ F508.

A Muc5b-GFP transgenic mouse was created by replacing the Stop codon of *Muc5b* with a GFP (Green Fluorescent Protein) coding sequence. Muc5b expression pattern was studied *ex vivo* in tissues and in anaesthetized mouse. Muc5b is produced in middle ear, eye, nasal cavity, trachea, gallbladder, cervix, and in embryonic lung at E12.5. As a proof-of-concept, we show that Muc5b-GFP is a biomarker of goblet cell density in a dry eye model. In anaesthetized mice, we measured a decreased goblet cell density after dry eye induction, which was restored by interleukin 13 topical application. Muc5b-GFP mouse is a preclinical model to follow the mucin production and goblet cell density. In the cystic fibrosis mouse model Cfr Δ F508, we show that a long term (n-3) long chain polyunsaturated fatty acid supplementation has no effect after an acute pulmonary inflammation on the Muc5b expression level, but induces an improvement of lung histology and a modulation of the inflammatory response.

Keywords: mucus, mucins, Muc5b, confocal endomicroscopy, dry eye, cystic fibrosis

SOMMAIRE

RÉSUMÉ.....	11
ABSTRACT.....	12
SOMMAIRE.....	13
LISTE DES FIGURES.....	22
LISTE DES TABLEAUX.....	26
ABRÉVIATIONS.....	27
AVANT-PROPOS.....	30
GÉNÉRALITÉS.....	33
1 LES MUCINES, UN COMPOSANT DU MUCUS.....	33
1.1 Le mucus.....	33
1.1.1 Définition.....	33
1.1.2 Composition.....	33
1.1.3 Fonctions du mucus.....	33
1.1.4 Propriétés rhéologiques.....	35
1.2 Les mucines.....	38
1.2.1 Définition.....	38
1.2.2 Les différents types de mucines.....	38
1.2.2.1 Mucines membranaires.....	38
1.2.2.2 Mucines sécrétées.....	40
2 MUC5B, UNE MUCINE SÉCRÉTÉE GÉLIFIANTE.....	41
2.1 Organisation génomique des gènes de mucines.....	41
2.1.1 Gènes de mucines gélifiantes humaines.....	41

2.1.1.1	<i>Le cluster 11p15</i>	41
2.1.1.2	<i>MUC19</i>	41
2.1.2	Gènes de mucines gélifiantes murines.....	42
2.1.3	Conservation phylogénétique.....	42
2.2	Biosynthèse des mucines gélifiantes.....	45
2.3	Composition des mucines gélifiantes.....	45
2.3.1	La composante peptidique.....	45
2.3.1.1	<i>La région centrale</i>	49
2.3.1.1.1	Les régions riches en résidus S/T/P.....	49
2.3.1.1.2	Le domaine CYS.....	49
2.3.1.2	<i>Les régions terminales</i>	50
2.3.1.2.1	La région carboxy-terminale.....	50
2.3.1.2.2	La région amino-terminale.....	51
2.3.2	La composante glycanique.....	51
2.4	Caractéristiques de MUC5B.....	54
2.4.1	MUC5B humaine.....	54
2.4.1.1	<i>La région carboxy-terminale</i>	54
2.4.1.2	<i>La région centrale</i>	54
2.4.1.3	<i>La région amino-terminale</i>	56
2.4.1.4	<i>Le promoteur de MUC5B</i>	56
2.4.2	Muc5b murine.....	56
2.5	Régulation de l'expression génique des mucines gélifiantes.....	57
2.5.1	Régulation épigénétique.....	57
2.5.2	Régulation transcriptionnelle.....	59
2.5.2.1	<i>Régulation par des produits bactériens</i>	59
2.5.2.2	<i>Régulation par des médiateurs inflammatoires</i>	59
2.5.2.3	<i>Régulation par des facteurs de transcription</i>	61
2.5.2.4	<i>Régulation par des médiateurs lipidiques</i>	61
2.5.2.5	<i>Régulation hormonale</i>	62
2.5.3	Régulation transcriptionnelle du cluster 11p15.....	62
2.6	Conclusion.....	63

3	EXPRESSION DE MUC5B EN SITUATION NORMALE.....	65
3.1	Voies respiratoires.....	65
3.1.1	Cavité nasale.....	65
3.1.1.1	<i>Rappels anatomique et histologique.....</i>	65
3.1.1.2	<i>Mucines nasales.....</i>	67
3.1.1.3	<i>Nez de la souris.....</i>	67
3.1.1.3.1	Particularités anatomique et histologique.....	67
3.1.1.3.2	Mucines murines nasales.....	68
3.1.2	Arbre trachéo-bronchique.....	68
3.1.2.1	<i>Rappels anatomique et histologique.....</i>	68
3.1.2.2	<i>Mucines du tractus respiratoire.....</i>	70
3.1.2.3	<i>Tractus respiratoire murin.....</i>	70
3.1.2.3.1	Particularités anatomique et histologique.....	70
3.1.2.3.2	Mucines murines des voies respiratoires.....	72
3.2	Segment antérieur de l'œil.....	72
3.2.1	Rappels anatomique et histologique.....	72
3.2.2	Mucines de l'œil.....	74
3.2.3	Segment antérieur de l'œil murin.....	76
3.2.3.1	<i>Particularités anatomique et histologique.....</i>	76
3.2.3.2	<i>Mucines murines de l'œil.....</i>	76
3.3	Oreille moyenne.....	76
3.3.1	Rappels anatomique et histologique.....	76
3.3.2	Mucines de l'oreille moyenne.....	78
3.3.3	Oreille moyenne murine.....	78
3.3.3.1	<i>Particularités anatomique et histologique.....</i>	78
3.3.3.2	<i>Mucines murines de l'oreille moyenne.....</i>	79
3.4	Glandes salivaires.....	79
3.4.1	Rappels anatomique et histologique.....	79
3.4.2	Mucines des glandes salivaires et de l'œsophage.....	80
3.4.3	Glandes salivaires murines.....	82
3.4.3.1	<i>Particularités anatomique et histologique.....</i>	82

3.4.3.2 <i>Mucines murines salivaires</i>	82
3.5 Tractus gastro-intestinal.....	82
3.5.1 Mucines gastriques humaines.....	82
3.5.2 Mucines gastriques murines.....	83
3.6 Vésicule biliaire.....	83
3.6.1 Rappels anatomique et histologique.....	83
3.6.2 Mucines de la vésicule biliaire.....	83
3.6.3 Vésicule biliaire murine.....	84
3.6.3.1 <i>Particularités anatomique et histologique</i>	84
3.6.3.2 <i>Mucines murines biliaires</i>	84
3.7 Cervix.....	84
3.7.1 Rappels anatomique et histologique.....	84
3.7.2 Mucines du mucus cervical.....	86
3.7.3 Tractus génital murin.....	86
3.7.3.1 <i>Particularités anatomique et histologique</i>	86
3.7.3.2 <i>Mucines murines dans le tractus génital</i>	86
3.8 Conclusion.....	87
4 MUC5B ET PATHOLOGIES.....	88
4.1 Anomalies des mucines.....	88
4.1.1 Anomalies de glycosylation des mucines.....	88
4.1.2 Dérégulation de l'expression des mucines.....	89
4.2 MUC5B et cancers.....	89
4.2.1 Rôle des mucines dans le cancer.....	89
4.2.2 MUC5B et cancers épithéliaux.....	91
4.2.2.1 <i>Cancer du sein</i>	91
4.2.2.1.1 Chez la femme.....	91
4.2.2.1.2 Cancer mammaire murin.....	92
4.2.2.2 <i>Cancers gastriques et colorectaux</i>	92
4.2.2.2.1 Chez l'Homme.....	92
4.2.2.2.2 Chez la souris.....	92

4.2.2.3 Cancer de l'endomètre.....	93
4.2.2.3.1 Chez la femme.....	93
4.2.2.3.2 Chez la souris.....	93
4.3 MUC5B et pathologies respiratoires.....	93
4.3.1 La mucoviscidose.....	93
4.3.1.1 Définition.....	93
4.3.1.2 La protéine CFTR.....	94
4.3.1.3 Physiopathologie.....	94
4.3.1.3.1 Signes cliniques.....	94
4.3.1.3.2 Inflammation.....	96
4.3.1.4 Anomalies du mucus.....	97
4.3.1.5 Recommandations nutritionnelles européennes.....	102
4.3.1.6 Chez la souris.....	103
4.3.1.6.1 Modèles murins de la mucoviscidose.....	103
4.3.1.6.2 Mucines murines pulmonaires dans la mucoviscidose.....	103
4.3.1.6.3 Effets des AGPI (n-3) dans la mucoviscidose.....	104
4.3.2 La fibrose pulmonaire idiopathique.....	104
4.3.2.1 Définition.....	104
4.3.2.2 Implication de MUC5B dans la FPI.....	106
4.3.2.3 Modèles murins de la fibrose pulmonaire.....	106
4.3.3 Bronchopneumopathie chronique obstructive.....	107
4.3.3.1 Chez l'Homme.....	107
4.3.3.2 Chez la souris.....	109
4.3.4 Panbronchiolite diffuse.....	111
4.3.4.1 Chez l'Homme.....	111
4.3.4.2 Chez la souris.....	111
4.3.5 Asthme.....	113
4.3.5.1 Chez l'Homme.....	113
4.3.5.2 Chez la souris.....	113
4.3.6 Rhinite allergique.....	114
4.3.6.1 Chez l'Homme.....	114
4.3.6.2 Chez la souris.....	114
4.3.7 Rhinosinusite chronique.....	114

4.3.7.1	<i>Chez l'Homme</i>	114
4.3.7.2	<i>Chez la souris</i>	115
4.3.8	Polypes nasaux.....	115
4.3.8.1	<i>Chez l'Homme</i>	115
4.3.8.2	<i>Chez la souris</i>	116
4.4	MUC5B et pathologies oculaires.....	116
4.4.1	Le syndrome de l'œil sec.....	117
4.4.1.1	<i>Définition</i>	117
4.4.1.2	<i>Prévalence</i>	117
4.4.1.3	<i>Facteurs de risque</i>	119
4.4.1.4	<i>Traitements</i>	119
4.4.2	MUC5B et syndrome de l'œil sec.....	120
4.4.3	Chez la souris.....	120
4.4.3.1	<i>Modèles murins de la sécheresse oculaire</i>	120
4.4.3.1.1	<i>Modèles murins d'ADDE</i>	121
4.4.3.1.2	<i>Modèles murins d'EDE</i>	122
4.4.3.2	<i>Induction chimique d'œil sec au chlorure de benzalkonium</i>	122
4.4.3.3	<i>Muc5b et syndrome de l'œil sec chez la souris</i>	123
4.5	MUC5B et pathologies otologiques.....	124
4.5.1	L'otite moyenne.....	124
4.5.1.1	<i>L'otite moyenne aiguë</i>	124
4.5.1.2	<i>L'otite moyenne séromuqueuse</i>	124
4.5.1.3	<i>L'otite moyenne chronique</i>	125
4.5.2	MUC5B et otite moyenne.....	125
4.5.3	Chez la souris.....	126
4.5.3.1	<i>Modèles murins d'otite moyenne</i>	126
4.5.3.2	<i>Muc5b et otite moyenne</i>	127
4.6	MUC5B et pathologies salivaires.....	128
4.6.1	Le syndrome de Sjögren.....	128
4.6.2	MUC5B dans les sécheresses buccales.....	129
4.6.3	Chez la souris.....	129

4.7 MUC5B et pathologies biliaires.....	129
4.7.1 La lithiase biliaire.....	130
4.7.2 Implication de MUC5B dans la lithiase biliaire.....	130
4.7.3 Modèles murins de la lithiase biliaire.....	130
4.8 MUC5B et pathologies du tractus génital féminin.....	131
4.8.1 Vaginoses.....	131
4.8.2 Accouchement prématuré.....	131
4.8.3 Infertilité féminine.....	132
4.8.4 Implication de MUC5B dans les pathologies du tractus génital féminin	132
4.8.5 Chez la souris.....	134
4.9 Conclusion.....	134
5 MODÈLES MURINS D'ÉTUDE DE MUC5B.....	135
5.1 Lignée murine invalidée pour le gène Muc5b.....	135
5.2 Lignée sur-exprimant Muc5b dans le poumon.....	136
STRATÉGIE DE L'ÉTUDE.....	137
RÉSULTATS.....	139
1 CARACTÉRISATION DE LA LIGNÉE MURINE MUC5B-GFP.....	139
1.1 Introduction.....	139
1.2 Construction de la souris Muc5b-GFP.....	140
1.3 Profil d'expression de Muc5b.....	143
1.4 Régulation hormonale de la production de Muc5b-GFP au cours du cycle œstral.....	151
1.5 Suivi <i>in vivo</i> de la densité de cellules caliciformes conjonctivales au cours de traitements pharmacologiques.....	153
1.6 L'IL-13 stimule l'activité de fluorescence dans des explants de poumons embryonnaires.....	155
1.7 Bilan.....	158

2 LIGNÉES MURINES INVALIDÉES POUR MUC5B.....	160
2.1 Obtention de la lignée murine invalidée pour Muc5b dans tous les tissus	160
2.2 Obtention de la lignée murine spécifiquement invalidée pour Muc5b dans le poumon.....	163
2.3 Poursuite des travaux.....	165
3 EFFETS D'UNE SUPPLÉMENTATION À LONG TERME EN AGPI LC (N-3) SUR LE POUMON DE SOURIS C _{FTR} ΔF508.....	166
3.1 Introduction.....	166
3.2 Incorporation tissulaire précoce des AGPI LC (n-3).....	167
3.3 Les souris C _{ftr} ΔF508 ont un retard de croissance qui est corrigé chez les mâles grâce aux AGPI LC (n-3).....	167
3.4 Les AGPI LC (n-3) réduisent les lésions pulmonaires à l'état basal et après inhalation de LPS.....	170
3.5 Les AGPI LC (n-3) modulent l'inflammation pulmonaire.....	174
3.6 Les AGPI LC (n-3) ne régulent pas l'expression des mucines gélifiantes des souris C _{ftr} ΔF508.....	176
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	179
1 PROFIL D'EXPRESSION PROTÉIQUE DE MUC5B MURINE.....	179
2 RÔLE DE MUC5B.....	181
2.1 En situation normale.....	181
2.2 En situation pathologique.....	183
2.2.1 Muc5b dans le cancer du sein.....	183
2.2.2 Muc5b dans la lithiase biliaire.....	183
2.2.3 Muc5b dans la régulation de la flore vaginale.....	183
2.2.4 Muc5b et pathologies pulmonaires.....	184
2.2.4.1 Muc5b dans la fibrose pulmonaire idiopathique.....	184
2.2.4.2 Muc5b et maladies pulmonaires obstructives.....	184
2.2.4.3 Muc5b et mucoviscidose.....	185

3 AGPI (N-3) ET MUCOVISCIDOSE.....	185
CONCLUSION.....	187
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	189
ANNEXE 1.....	221
ANNEXE 2.....	250
ANNEXE 3.....	273

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Le mucus.....	32
Figure 2 : Clairance des bactéries et des particules dans les voies respiratoires.....	34
Figure 3 : Mucines bronchiques humaines vues en microscopie électronique.....	36
Figure 4 : Structure du mucus cervical humain en fonction du cycle menstruel.....	37
Figure 5 : Représentation schématique des mucines membranaires et sécrétées....	39
Figure 6 : Cluster des gènes codant les mucines gélifiantes Muc6, Muc2, Muc5ac et Muc5b chez la souris.....	43
Figure 7 : Analyse phylogénétique des mucines gélifiantes.....	44
Figure 8 : Cellules caliciformes vues en microscopie électronique.....	46
Figure 9 : Biosynthèse des mucines gélifiantes.....	47
Figure 10 : Représentation schématique des mucines gélifiantes humaines MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC19.....	48
Figure 11 : Représentation schématique des chaînes glycaniques des mucines....	52
Figure 12 : Représentation des mucines humaine et murine MUC5B/Muc5b.....	55
Figure 13 : Mécanisme théorique de la régulation épigénétique de la transcription des gènes de mucines.....	58
Figure 14 : Représentation schématique des voies de signalisation régulant la transcription des gènes des mucines gélifiantes, sous l'influence de cytokines, sous-produits bactériens et facteurs de croissance.....	60
Figure 15 : Sites de production de MUC5B/Muc5b en situations normale et pathologique chez l'Homme et la souris.....	64

Figure 16 : Représentation schématique de la fosse nasale droite de l'Homme et de la souris.....	66
Figure 17 : Les différents types cellulaires du tractus respiratoire.....	69
Figure 18 : Expression des mucines dans les voies respiratoires.....	71
Figure 19 : Représentation schématique du film lacrymal et du segment antérieur de l'œil.....	73
Figure 20 : Représentation schématique de la répartition des cellules à mucus de la conjonctive.....	75
Figure 21 : Représentation schématique de l'oreille.....	77
Figure 22 : Représentation schématique de la région cervicale de l'Homme et de la souris.....	81
Figure 23 : Représentation schématique du cervix.....	85
Figure 24 : Protection de la cellule tumorale grâce à la sécrétion de mucines à sa surface.....	90
Figure 25 : Réponse des cellules sécrétrices des voies respiratoires à un stimulus aigu ou chronique.....	98
Figure 26 : Rôle de CFTR dans le maintien de l'hydratation du mucus dans les voies respiratoires de sujets sains et mucoviscidosiques.....	100
Figure 27 : Représentation schématique des voies respiratoires d'un individu sain et d'un individu atteint de mucoviscidose.....	101
Figure 28 : Représentation schématique de l'action de la fumée de cigarette sur la protéine CFTR induisant une déshydratation du mucus pulmonaire dans la bronchopneumopathie chronique obstructive.....	108

Figure 29 : Représentation schématique de la pathogenèse de la panbronchiolite diffuse.....	112
Figure 30 : Classification étiopathogénique de la sécheresse oculaire.....	118
Figure 31 : Vue en microscopie électronique de mucus cervical à haut et faible risque d'accouchement prématuré.....	133
Figure 32 : Stratégie génétique d'obtention des clones ES.....	141
Figure 33 : Génération de la souris Muc5b-GFP.....	144
Figure 34 : Analyse par immunofluorescence de muqueuses produisant Muc5b....	146
Figure 35 : Différentes sous-populations de cellules caliciformes conjonctivales....	148
Figure 36 : Stéréomicroscopie et endomicroscopie à fluorescence.....	149
Figure 37 : Stéréomicroscopie et endomicroscopie à fluorescence dans la conjonctive.....	150
Figure 38 : Lien entre activité de la fluorescence de la GFP et phase du cycle œstral	152
Figure 39 : L'activité de la GFP est diminuée dans un modèle induisant une sécheresse oculaire.....	154
Figure 40 : La perte de cellules caliciformes conjonctivales est restaurée par l'IL13	156
Figure 41 : L'IL-13 stimule l'activité de fluorescence de la GFP dans le poumon embryonnaire.....	157
Figure 42 : Masse corporelle des souris Muc5b-GFP et Muc5bKO.....	161
Figure 43 : Phénotype d'une souris Muc5bKO âgée de 100 jours.....	162

Figure 44 : Compliance pulmonaire des souris Muc5b-GFP, Muc5bKO et Muc5b ^{lung ko/ko}	164
Figure 45 : La consommation précoce d'AGPI LC (n-3) améliore l'incorporation des acides gras dans les tissus des souris Cftr Δ F508.....	168
Figure 46 : La consommation précoce d'AGPI LC (n-3) corrige le retard de croissance des souris mâles Cftr Δ F508.....	169
Figure 47 : Score histologique des lésions histologiques pulmonaires.....	172
Figure 48 : Dosage par ELISA des cytokines pro-inflammatoires dans les homogénats de poumon.....	175
Figure 49 : Expression des PPAR mesurée par RT-qPCR dans les ARNm extraits de poumon.....	177
Figure 50 : Expression des mucines gélifiantes mesurée par RT-qPCR dans les ARNm extraits de poumon.....	178

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Score histologique des lésions pulmonaires.....	171
Tableau 2 : Effets du LPS sur le score histologique suivant le génotype des souris et le régime alimentaire.....	173

ABRÉVIATIONS

aa	acide aminé
AA	acide arachidonique
ABC	ATP binding cassette
AB-PAS	bleu alcian–acide périodique de Schiff
ADDE	œil sec aquo-déficient
ADN	acide désoxyribonucléique
AGPI	acide gras polyinsaturé
AGPI LC	acide gras polyinsaturé à longue chaîne
AIEC	adherent and invasive <i>Escherichia coli</i>
AP-1	protéine activatrice-1
Asn	asparagine
BAK	chlorure de benzalkonium
BC	bronchite chronique
BPCO	bronchopneumopathie chronique obstructive
BTX	toxine botulique
CCC	cellule caliciforme conjonctivale
CCSP	Club cell secretory protein
CF	cystic fibrosis
CFTR	cystic fibrosis transmembrane regulator
CK	cystine knot
CMC	clairance mucociliaire
CTCF	CCCTC-binding factor
Cys	cystéine
DHA	acide docosahexaénoïque
DNMT	ADN méthyltransférases
EDE	œil sec par évaporation
ENaC	epithelial sodium channel
EPA	acide eisosapentaénoïque

ES	cellule souche embryonnaire
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
FPI	fibrose pulmonaire idiopathique
FT	facteur de transcription
Gal	galactose
GalNac	<i>N</i> -acétylgalactosamine
GFP	green fluorescent protein
GlcNac	<i>N</i> -acétylglucosamine
HMEEC	cellules épithéliales d'oreille moyenne humaine
HRV	région hypervariable
Ig	immunoglobuline
IHC	immunohistochimie
IL	interleukine
IL13r	interleukine 13 recombinante
KI	knock-in
KO	knock out
LPC	liquide périciliaire
LPS	lipopolysaccharide
LTA	acide lipotéichoïque
MBDs	methyl binding proteins
NeuAc	acide neuraminique
NF-κB	facteur nucléaire-κB
PAF	facteur d'activation plaquettaire
pb	paire de bases
Pro	proline
RE	réticulum endoplasmique
SA	semaine d'aménorrhée
Ser	sérine
Smgc	protéine C des glandes sous-maxillaires
SNP	single nucleotide polymorphism
Thr	thréonine

TNF	tumor necrosis factor
TR	tandem repeat
Trp	tryptophane
VNTR	variable number tandem repeat
VWD	domaine de type D du facteur de von Willebrand
vWF	facteur de von Willebrand

AVANT-PROPOS

Le mucus est la première barrière entre l'environnement extérieur et les épithéliums. Il est produit par de nombreux épithéliums sécrétoires, chez de nombreux organismes, et ses fonctions sont nombreuses (**Figure 1**). Les gels de mucus sont principalement constitués d'eau et de mucines, qui sont des molécules de très haute taille moléculaire et fortement O-glycosylées. Leurs caractéristiques rendent leur étude difficile et les outils disponibles sont encore limités. Les mucines gélifiantes sont le constituant organique majoritaire du mucus. Elles sont au nombre de cinq chez l'Homme et sont conservées chez la souris. La mucine gélifiante MUC5B a été découverte à Lille et est étudiée dans notre laboratoire. Cette mucine est impliquée, ou potentiellement impliquée, dans de nombreuses pathologies touchant des muqueuses sécrétoires (poumon, œil, oreille...). Ce travail de thèse a pour objectif de déterminer le profil d'expression de la mucine murine *Muc5b* *in vivo* en conditions normales et pathologiques. Pour répondre à cette problématique, nous avons développé une lignée murine où la mucine *Muc5b* est couplée à une protéine fluorescente (*Muc5b*-GFP) afin de suivre la production/sécrétion/localisation de la mucine.

Dans la première partie de ce mémoire, nous présentons les mucines gélifiantes, puis plus particulièrement les connaissances sur l'expression/production de la mucine gélifiante MUC5B en situations normale et pathologique. Nous passons pour cela en revue les différents tissus humains et murins connus pour produire cette mucine.

La seconde partie du mémoire présente les résultats acquis durant ces travaux de thèse. Nous avons caractérisé la nouvelle lignée murine *Muc5b*-GFP. Ensuite, nous apportons la preuve de concept de l'utilisation de cette lignée murine comme modèle préclinique d'étude de la production de *Muc5b* et de la densité de cellules caliciformes. Enfin, nous avons étudié la régulation nutritionnelle de l'expression de *Muc5b* dans un modèle murin de la mucoviscidose.

La dernière partie du mémoire discute et conclut les résultats obtenus en proposant des perspectives sur l'étude de la mucine murine Muc5b dans différentes pathologies.

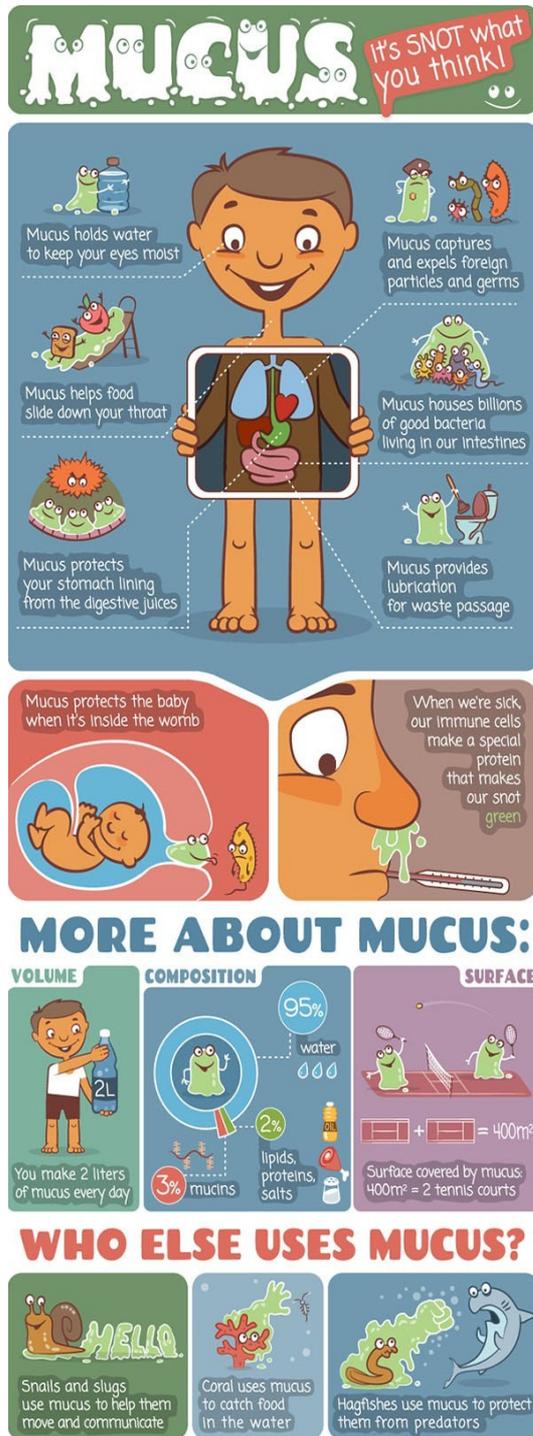


Figure 1 : Le mucus.

Le mucus a de nombreuses fonctions dont la lubrification, l'hydratation, la protection contre les virus et bactéries (Crouzier and Co, 2015).

GÉNÉRALITÉS

1 Les mucines, un composant du mucus

1.1 Le mucus

1.1.1 Définition

Le mucus désigne la sécrétion physiologique visqueuse (gel) qui recouvre les épithéliums sécrétoires des vertébrés (poissons, mammifères) et des invertébrés tels que les mollusques. Le mucus constitue l'interface entre l'environnement extérieur et l'épithélium.

1.1.2 Composition

Le mucus est très hétérogène, constitué d'eau à 95 %, d'électrolytes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ...) et de composés organiques (environ 2 %) qui sont majoritairement des mucines. Il contient également des protéines telles que des immunoglobulines (Ig) A sécrétoires, des IgG, des protéines de défense sécrétées (lysozyme, défensines, lactoferrine, protéases, anti-protéases...), des lipoprotéines et des phospholipides (Bansil and Turner, 2006).

1.1.3 Fonctions du mucus

Chez les mammifères, le mucus a essentiellement un rôle dans la protection, la lubrification et l'hydratation des muqueuses et constitue une barrière de protection efficace entre l'environnement et les muqueuses. Il peut également remplir d'autres fonctions selon l'organe dans lequel il est produit. Par exemple, le mucus joue un rôle vital dans l'épuration mucociliaire dans les voies respiratoires. Le mucus respiratoire, tapissant l'ensemble des voies respiratoires (des fosses nasales jusqu'aux bronchioles terminales), est composé de deux phases : une « phase sol » en contact avec les cellules ciliées et une « phase gel » recouvrant la partie apicale des cils (**Figure 2**) (Ali and Pearson, 2007).

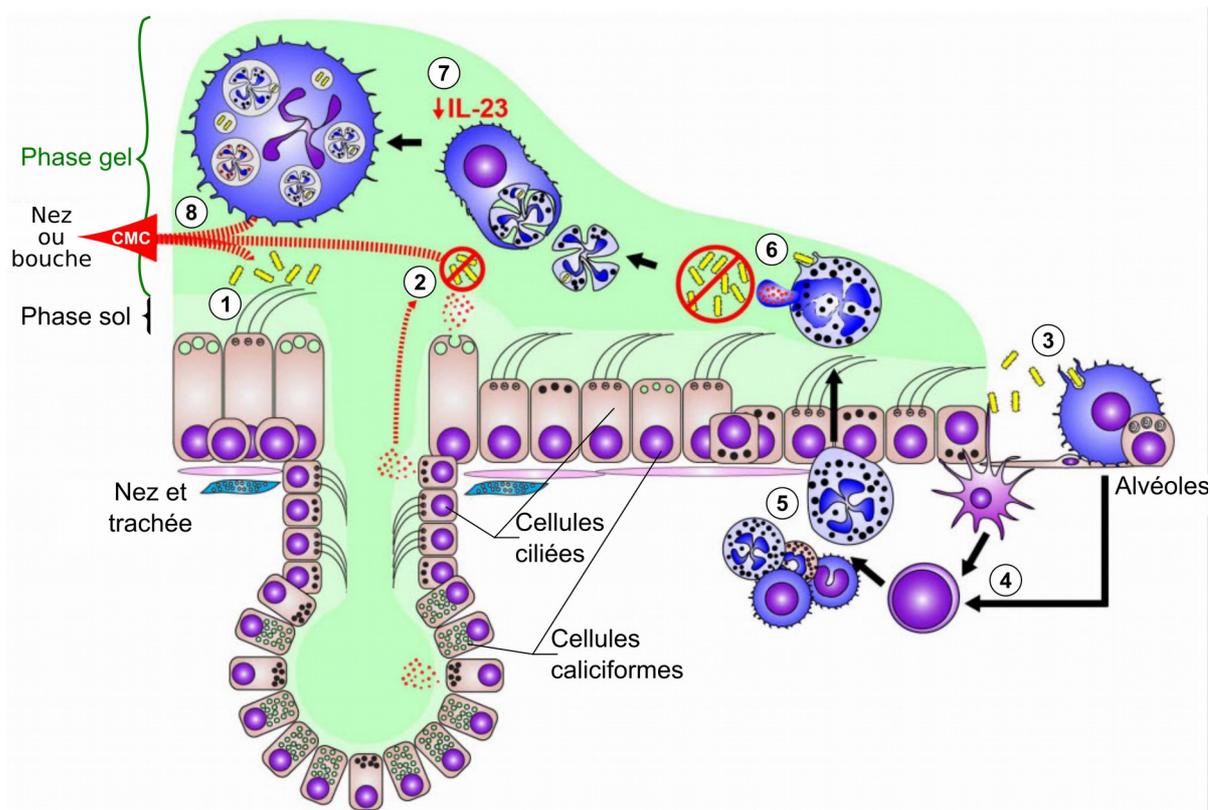


Figure 2 : Clairance des bactéries et des particules dans les voies respiratoires.

Le mucus pulmonaire est composé de deux phases : une phase « gel », de forte viscosité, qui piège les particules inhalées, et une phase « sol » qui permet les battements des cils qui font remonter la phase gel vers le pharynx.

1 : Engluage et élimination directe par clairance mucociliaire (CMC) des particules inhalées, comme des bactéries (en jaune) par exemple.

2 : Élimination par CMC des bactéries après que celles-ci aient été tuées.

3 : Détection et phagocytose des bactéries, qui échappent aux deux premiers mécanismes, par les macrophages et les cellules dendritiques des voies respiratoires inférieures et des alvéoles.

4 : Sécrétion d'interleukine-13 (IL-13) par les macrophages et les cellules dendritiques qui active la réponse inflammatoire innée.

5 : Recrutement de monocytes et de granulocytes.

6 : Accumulation des cellules inflammatoires recrutées dans les voies respiratoires où elles tuent les bactéries par phagocytose.

7 : Apoptose des lymphocytes recrutés qui sont ensuite phagocytés par les macrophages.

8 : Élimination par CMC des macrophages après apoptose. Adapté de (Roy et al., 2014).

Les particules et micro-organismes inhalés sont piégés par la phase gel qui est très viscoélastique. La phase sol, ou liquide périciliaire, aqueuse et de très faible viscosité, permet le battement des cils des cellules de l'épithélium. Les battements ciliaires font remonter les corps étrangers piégés dans la phase gel jusqu'au pharynx où ils sont déglutis. Seule la phase gel est transportée par le battement des cils.

Dans l'appareil urogénital féminin, le mucus joue un rôle primordial dans la reproduction, en influençant la migration des spermatozoïdes. En dehors de la phase ovulatoire, le mucus est épais, visqueux, de pH acide et forme une barrière physique qui limite l'accès des spermatozoïdes dans le tractus génital. Lors de l'ovulation, le volume de mucus augmente et sa viscosité diminue ce qui va faciliter le passage des spermatozoïdes (Brunelli et al., 2007).

1.1.4 Propriétés rhéologiques

Les propriétés rhéologiques du mucus sont dues aux mucines, et essentiellement aux mucines sécrétées, qui ont la capacité de polymériser et de former un gel de mucus. Par microscopie électronique, il a été montré que les mucines soit forment de longs filaments linéaires, flexibles et de longueur variable (de 200 à 1400 nm), soit s'organisent en réseau (**Figure 3**), par l'établissement de ponts disulfures et d'autres interactions, ce qui va conduire à la formation d'un mucus plus ou moins poreux (Sheehan et al., 1986).

Des liaisons de différentes natures entre mucines seraient impliquées dans les propriétés rhéologiques du mucus, comme des liaisons réversibles entre les domaines hydrophobes et riches en résidus cystéine retrouvés dans la grande région centrale des mucines (domaine CYS). Cette hypothèse a été formulée suite à la description du changement d'organisation des mucines dans le mucus cervical en fonction du cycle. Lors des périodes pré-ovulatoire et post-ovulatoire, il a été montré que les mucines forment un réseau dense « filamenteux ». Par contre, lors de l'ovulation, les mucines s'agrègent et s'organisent en structures compactes sphériques pour former un mucus « globulaire » (**Figure 4**). L'établissement de liaisons réversibles entre les domaines CYS serait responsable de ce changement de conformation du mucus (Bansil and Turner, 2006; Brunelli et al., 2007).

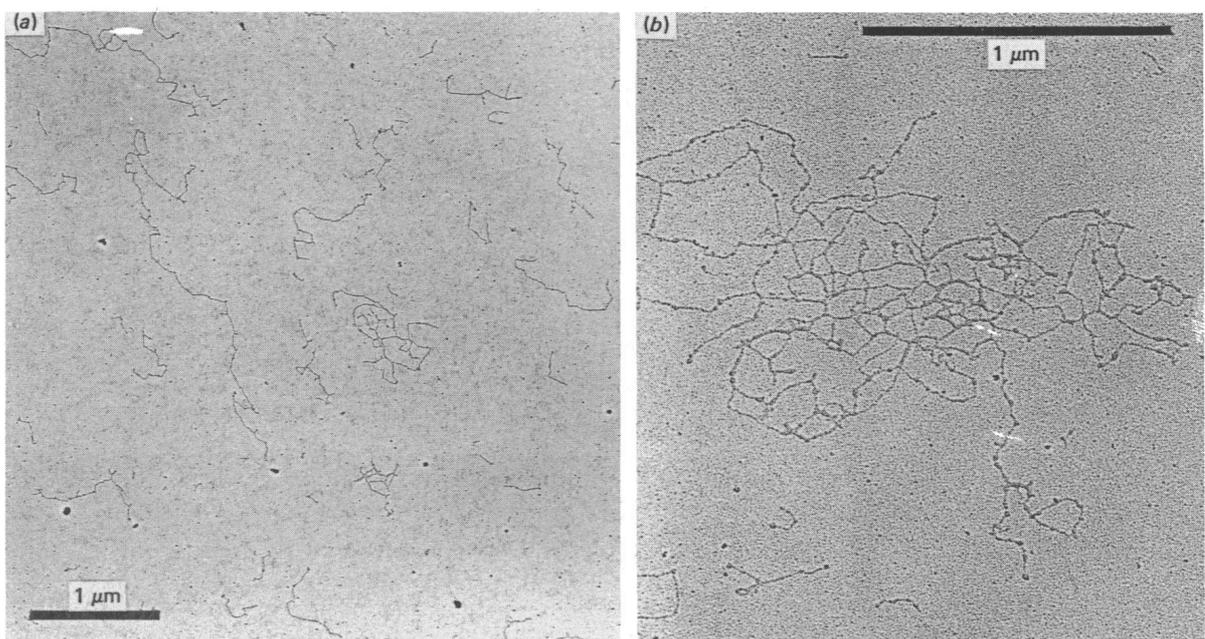


Figure 3 : Mucines bronchiques humaines vues en microscopie électronique.

Les mucines forment de longs filaments linéaires (**A**) ou s'organisent en réseau (**B**) (Sheehan et al., 1986).

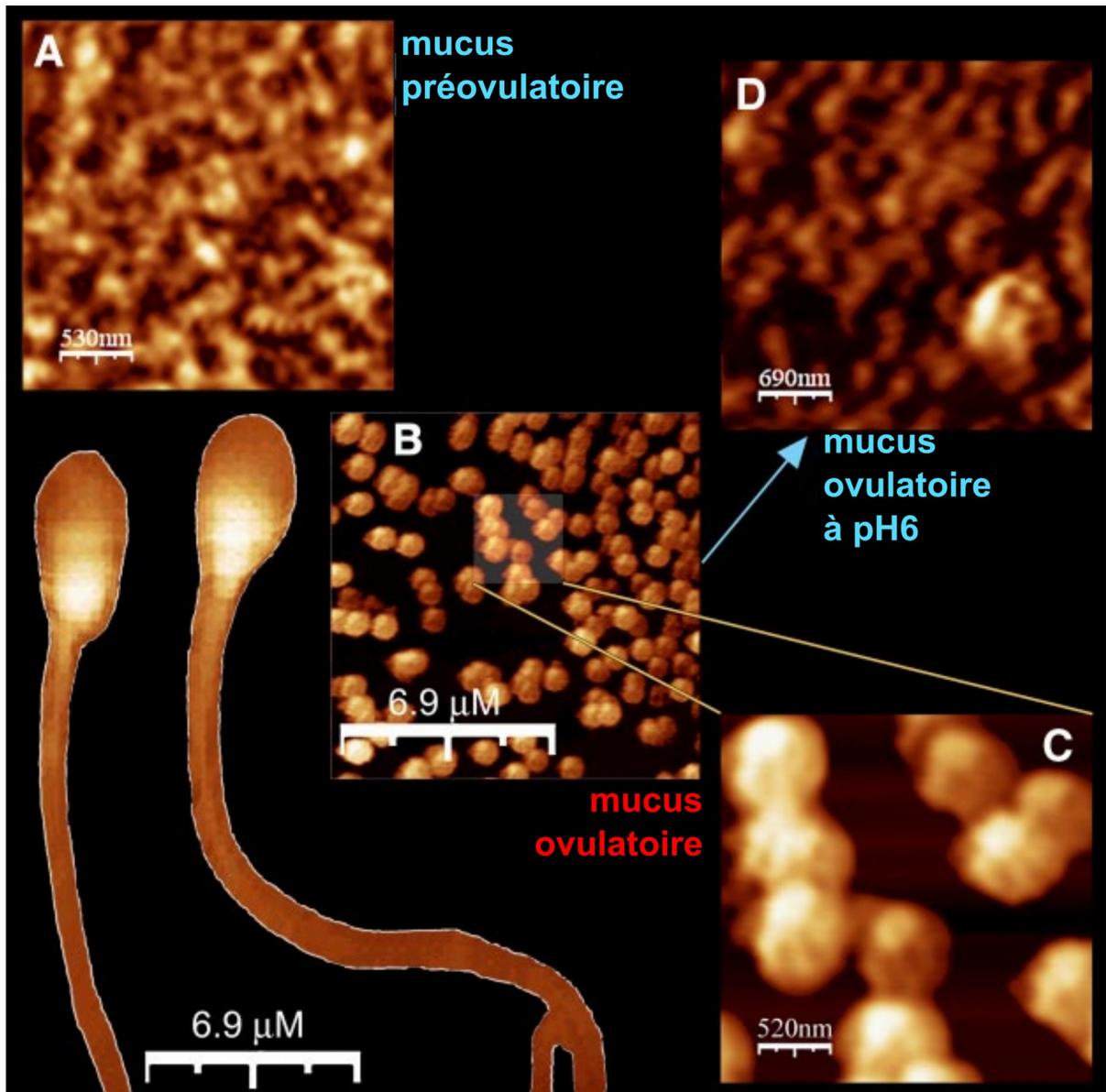


Figure 4 : Structure du mucus cervical humain en fonction du cycle menstruel.

Adapté de (Brunelli et al., 2007).

1.2 Les mucines

1.2.1 Définition

Les mucines représentent le constituant organique majeur des gels de mucus et leur confèrent leurs propriétés rhéologiques. Ce sont des glycoprotéines de très haute taille moléculaire pouvant atteindre plusieurs millions de daltons. Elles sont caractérisées par de nombreuses régions répétées en tandem (TR pour « Tandem Repeat ») riches en résidus de proline (Pro) et en résidus hydroxylés (sérine (Ser) et thréonine (Thr)) qui portent de nombreuses chaînes oligosaccharidiques (Rose and Voynow, 2006). Ces chaînes glycaniques représentent plus de 70 % du poids sec de la molécule et sont attachées, par des liaisons O-glycosidiques, entre les groupements hydroxyles des résidus Ser et Thr de l'axe peptidique de la mucine et des résidus de *N*-acétylgalactosamine (Strous and Dekker, 1992).

A ce jour, 22 mucines ont été identifiées. Parmi elles, seules 11 sont produites uniquement par des cellules épithéliales et peuvent par définition être considérées comme de vraies mucines. Elles sont classées en deux grandes familles : les mucines membranaires et les mucines sécrétées (**Figure 5**).

1.2.2 Les différents types de mucines

1.2.2.1 Mucines membranaires

Les mucines membranaires possèdent un domaine transmembranaire hydrophobe et un court domaine cytoplasmique (Hatstrup and Gendler, 2008). Dans cette famille, on trouve les mucines : MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC18, MUC20 (Rose and Voynow, 2006) et MUC21 (Itoh et al., 2008). Cependant, MUC3A et MUC3B sont probablement deux séquences du même et unique gène *MUC3* (Desseyn et al., 2008b). De plus, les mucines membranaires possèdent un site de clivage protéolytique et peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire et donc être retrouvées dans le mucus. Il a également été rapporté une forme sécrétée de MUC1 et MUC4 engendrée par épissage alternatif. Cependant, l'existence de ces variants protéiques, au moins pour MUC4, reste à démontrer (Desseyn et al., 2008b; Hatstrup and Gendler, 2008).

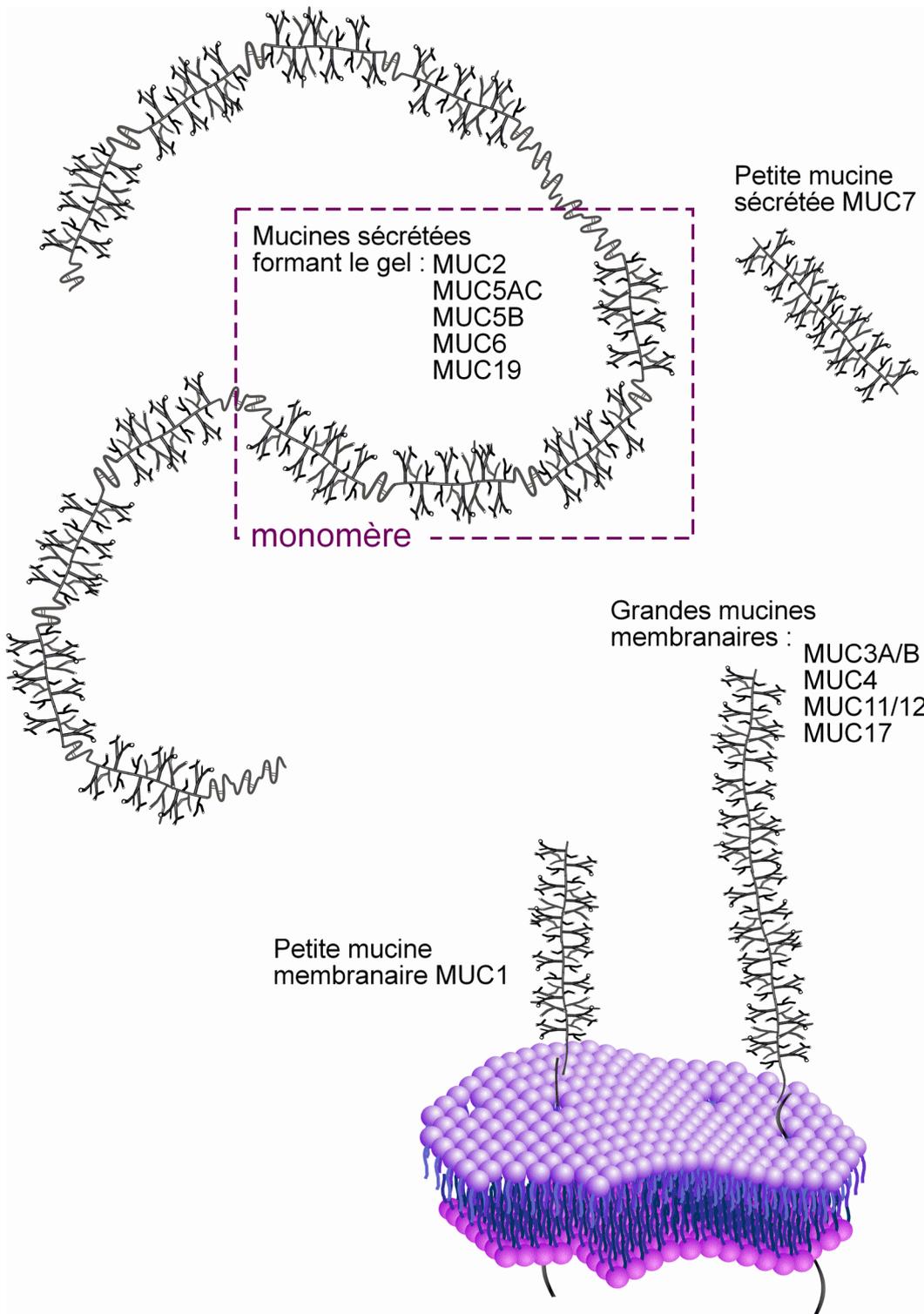


Figure 5 : Représentation schématique des mucines membranaires et sécrétées.

1.2.2.2 Mucines sécrétées

Les mucines sécrétées, formant le gel de mucus par oligomérisation, sont au nombre de cinq chez l'Homme et le rongeur : MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC19. Elles sont désignées Muc2, Muc5ac, Muc5b, Muc6 et Muc19 chez la souris. Elles sont synthétisées par des cellules épithéliales spécialisées, les cellules mucipares, et par des glandes de la sous-muqueuse (Perez-Vilar and Mabolo, 2007).

Les mucines MUC7 et MUC8 ont également été décrites comme étant des mucines sécrétées. Cependant, la mucine MUC7 et la taille prédite de MUC8 sont petites et ont la caractéristique de ne pas former d'oligomères. La production de MUC8 n'est pas encore clairement établie (Rose and Voynow, 2006). La petite mucine MUC9 a la particularité d'être retrouvée sous les formes membranaire et sécrétée (Ali and Pearson, 2007).

Mon sujet de thèse est centré sur l'étude de l'une des mucines gélifiantes, MUC5B. Le chapitre suivant est consacré aux caractéristiques communes des cinq mucines gélifiantes, en soulignant les particularités de MUC5B.

2 MUC5B, une mucine sécrétée gélifiante

2.1 Organisation génomique des gènes de mucines

Les gènes codant les mucines sécrétées gélifiantes *MUC5AC*, *MUC5B*, *MUC2*, *MUC6* et *MUC19* ont été caractérisés chez l'Homme et chez la souris. Par convention, les gènes sont écrits en italique et les protéines en lettres droites.

2.1.1 Gènes de mucines gélifiantes humaines

2.1.1.1 Le cluster 11p15

Les quatre gènes *MUC6*, *MUC2*, *MUC5AC* et *MUC5B* sont localisés sur le bras court du chromosome 11 humain en p15.5 et sont organisés en cluster, dans l'ordre suivant (Pigny et al., 1996) :

télomère-*HRAS*-*MUC6*-*MUC2*-*MUC5AC*-*MUC5B*-*IGF2*-centromère

Les gènes *MUC2*, *MUC5B* et *MUC5AC* sont orientés dans le même sens alors que *MUC6* est orienté en sens inverse. Des cinq gènes de mucines gélifiantes, la structure génomique de *MUC5B* a été la première entièrement déterminée (Desseyn et al., 1998b, 1997a, 1997b; Offner et al., 1998; Van Seuning et al., 2000). *MUC5B* est constitué de 49 exons (l'exon premier est appelé exon 0) répartis sur 39 kb. Le transcrit de *MUC5B*, d'une taille de 17,6 kb, code une protéine de 5701 acides aminés (aa).

Les structures génomiques des cinq gènes codant les mucines gélifiantes sont très similaires avec un grand exon central (>10 kb) comportant les séquences répétées en tandem, qui correspond au 30^{ème} exon pour *MUC2*, au 31^{ème} pour *MUC6*, *MUC5B* et *MUC5AC* et au 33^{ème} pour *MUC19*. Le gène *MUC6* est plus petit que les quatre autres car seulement deux exons codent sa région carboxy-terminale alors que 18 exons ont été identifiés en aval de l'exon central pour *MUC2*, *MUC5B*, *MUC5AC* et *MUC19* (Desseyn et al., 2008a).

2.1.1.2 *MUC19*

MUC19 n'a été identifiée qu'en 2004 (Chen et al., 2004; Zhu et al., 2011).

MUC19 est localisé sur le chromosome 12 humain en q12 (Culp et al., 2004). Comme les autres mucines gélifiantes, le gène *MUC19* contient un grand exon central (~12 kb) comportant des séquences répétées. La particularité de *MUC19* est la présence d'une grande région hypervariable (HRV), en amont de la séquence codant le premier domaine de type D du facteur de von Willebrand (VWD), contenant des séquences répétées riches en sérine. Parmi les 20 épissages différents identifiés dans l'HRV, le variant le plus long (182 exons) code un transcrit d'environ 25 kb. La protéine codée par l'HVR a une structure similaire à la protéine C des glandes sous-maxillaires (*Smgc*) retrouvée chez la souris (Zhu et al., 2011).

2.1.2 Gènes de mucines gélifiantes murines

Chez la souris, le cluster des quatre gènes codant *Muc6*, *Muc2*, *Muc5ac* et *Muc5b* (ordre et sens de transcription des gènes) est conservé sur le chromosome 7 murin (**Figure 6**) (Desseyn and Laine, 2003). *Muc19* est localisé sur le chromosome 15 en F1 et code deux transcrits : *Smgc* par les exons 1 à 18 et *Muc19* par les exons 1 et 19 à 60 (Culp et al., 2004; Zinzen et al., 2004).

2.1.3 Conservation phylogénétique

Parmi les mucines, il a été montré que les mucines gélifiantes sont apparues précocement dans l'évolution des métazoaires (Lang et al., 2007). De plus, il a été montré que les mucines gélifiantes ont un ancêtre commun avec le facteur de von Willebrand (vWF) (Desseyn et al., 2000).

MUC19 est le premier gène codant une mucine gélifiante à dériver de l'ancêtre commun avec le vWF (**Figure 7**). De plus, la forte similarité de séquence entre les quatre autres mucines gélifiantes (*MUC2*, *MUC5AC*, *MUC5B* et *MUC6*) comparées à *MUC19* suggère que ces quatre mucines sont plus récentes que *MUC19* (Zhu et al., 2011).

Parmi les quatre mucines gélifiantes du cluster, *MUC6* a été suggéré comme plus ancien que les trois autres. L'événement le plus récent serait la dichotomie d'un gène en les deux gènes actuels *MUC5AC* et *MUC5B* (**Figure 7**) (Desseyn et al., 1998a; Zhu et al., 2011).

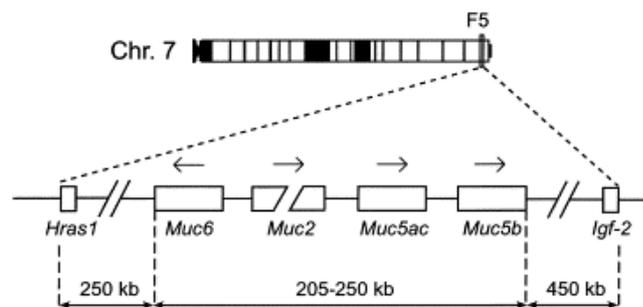


Figure 6 : Cluster des gènes codant les mucines gélifiantes Muc6, Muc2, Muc5ac et Muc5b chez la souris.

Le cluster est localisé sur le chromosome 7, bande F5. Les flèches indiquent le sens de transcription des gènes (Desseyn and Laine, 2003).

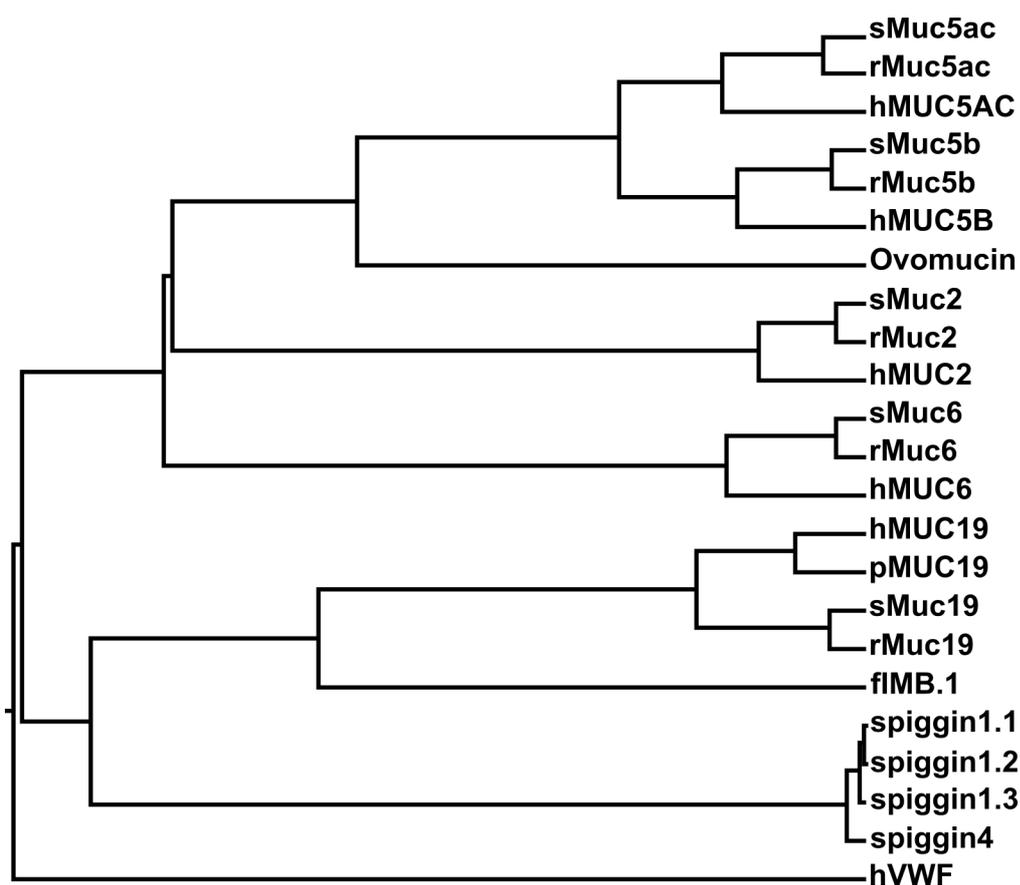


Figure 7 : Analyse phylogénétique des mucines gélifiantes.

L'ovomucine (protéine du blanc d'œuf) est considérée comme l'orthologue de MUC5AC et de MUC5B chez la poule. FIMB.1 et spiggin sont des orthologues de MUC19 chez le xénope (amphibien) et l'épinoche (poisson), respectivement. h, homme ; p, porc ; r, rat ; s, souris. Adapté de (Zhu et al., 2011).

2.2 Biosynthèse des mucines gélifiantes

Les mucines gélifiantes sont synthétisées et sécrétées par des cellules spécialisées, les cellules caliciformes, aussi appelées cellules à mucus ou, à tort, cellules en « gobelet » (**Figure 8**) (Perez-Vilar and Mabolo, 2007).

Après transcription et traduction, les chaînes peptidiques des mucines sont transloquées grâce au peptide signal dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) où débute la *N*-glycosylation des mucines et éventuellement leur C-mannosylation sur les domaines CYS (voir §2.3.1.1.2). Les mucines sécrétées dimérisent dans le RE via leur région carboxy-terminale riche en résidus de cystéine (Bell et al., 2001; Perez-Vilar and Mabolo, 2007). Les dimères de mucines sont ensuite transportés dans l'appareil de Golgi où ils multimérisent via leur région amino-terminale. C'est également dans l'appareil de Golgi que les mucines acquièrent leur *O*-glycosylation. L'ajout de résidus d'acide neuraminique (NeuAc) et de sulfate en fin de *O*-glycosylation confère aux mucines une forte charge négative (Perez-Vilar et al., 1998; Turner et al., 1999). Les mucines sont ensuite stockées et concentrées dans des granules de sécrétion qui sont transportés de l'appareil de Golgi vers la surface apicale de la cellule où les mucines sont sécrétées par exocytose (Thornton et al., 2008) (**Figure 9**). Au contact de l'eau, les mucines forment le gel de mucus.

2.3 Composition des mucines gélifiantes

2.3.1 La composante peptidique

La composante peptidique des mucines gélifiantes, ou apomucine, est organisée en trois régions distinctes : les régions amino- et carboxy-terminales, qui sont riches en résidus cystéine (Cys), et la région centrale qui est composée de domaines riches en résidus Ser, Thr et Pro (25 à 45 % de la composition totale en aa) portant les nombreuses chaînes *O*-glycanniques (**Figure 10**) (Strous and Dekker, 1992).

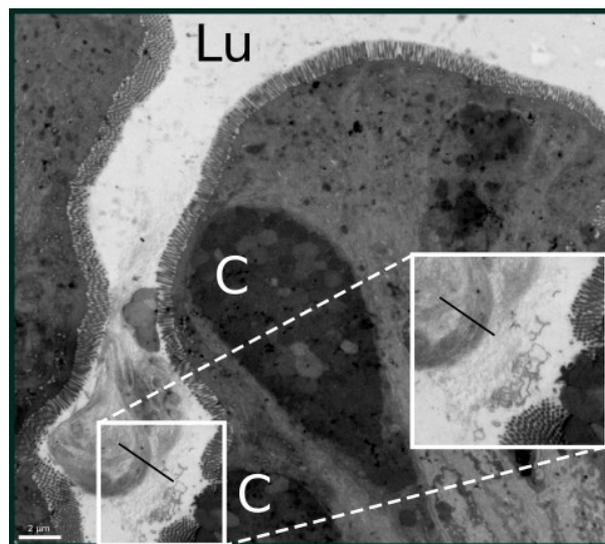


Figure 8 : Cellules caliciformes vues en microscopie électronique.

Les cellules caliciformes (C), ici sur une coupe de côlon de souris en microscopie électronique, sont reconnaissables car gorgées de granules de sécrétion contenant la mucine gélifiante Muc2. La flèche indique une cellule à mucus qui « dégranule » avec la formation du mucus au contact de l'eau dans la lumière. Les cellules à mucus coexistent dans l'épithélium intestinal avec d'autres types cellulaires comme des colonocytes dans le côlon reconnaissables aux villosités de surface. Lu, lumière intestinale. Échelle = 2 µm. Adapté de (Desseyn, 2016).

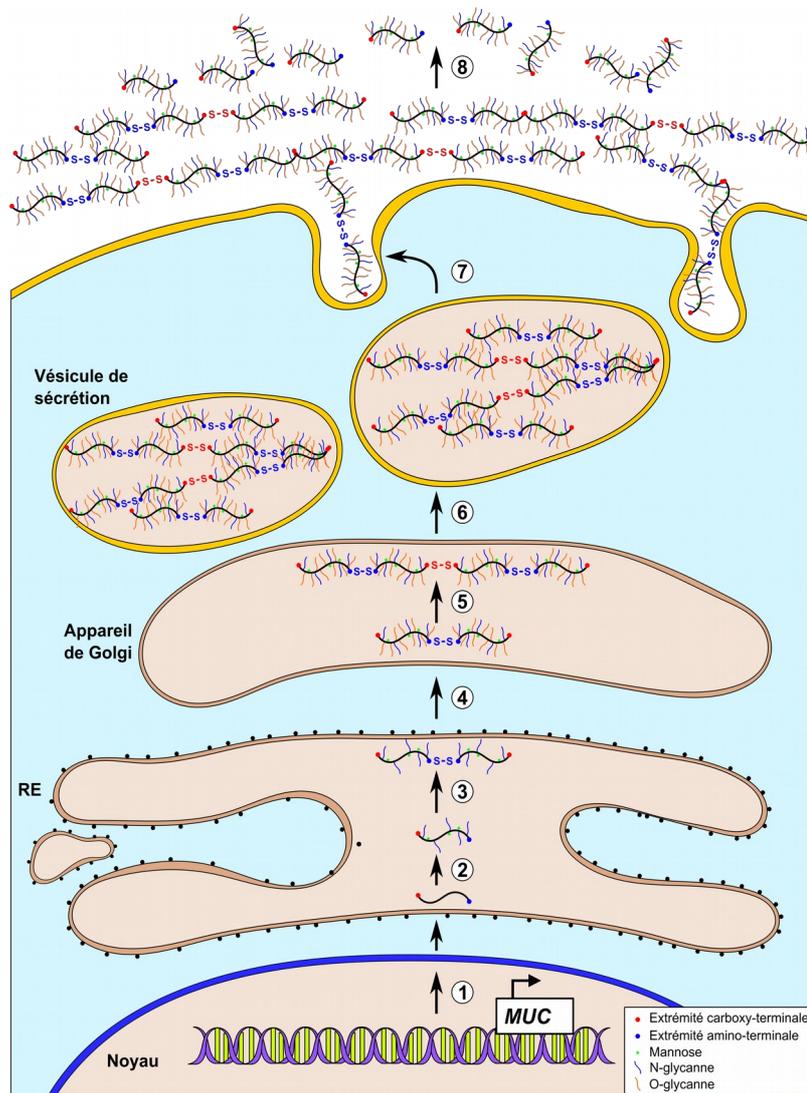


Figure 9 : Biosynthèse des mucines gélifiantes.

- 1 : Transcription et traduction des gènes codant les mucines.
- 2 : N-glycosylation et potentielle C-mannosylation des mucines dans le réticulum endoplasmique (RE).
- 3 : Dimérisation des monomères de mucines via l'établissement de liaisons covalentes entre leur région carboxy-terminale.
- 4 : Transport vers l'appareil de Golgi des dimères de mucines où a lieu la O-glycosylation.
- 5 : Multimérisation des dimères de mucines via l'établissement de liaisons covalentes entre leur région amino-terminale.
- 6 : Stockage des mucines dans des granules de sécrétion.
- 7 : Sécrétion des mucines par exocytose et formation du gel de mucus au contact de l'eau.
- 8 : Dégradation des mucines par les bactéries de la flore.

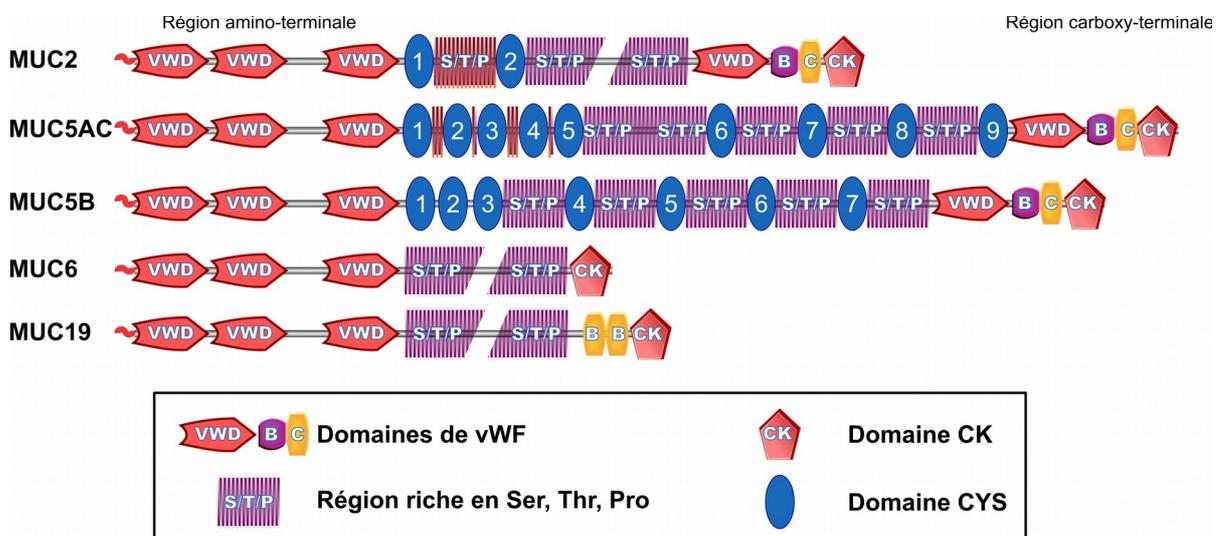


Figure 10 : Représentation schématique des mucines gélifiantes humaines MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC19.

2.3.1.1 La région centrale

2.3.1.1.1 Les régions riches en résidus S/T/P

La région centrale des mucines est riche en résidus Ser, Thr et Pro (région S/T/P) et est généralement organisée en motifs répétés en tandem (TR). Dans les espèces avec un temps de génération plus court que chez l'Homme, comme la souris, il est souvent difficile de déterminer une séquence consensus des TR (Desseyn et al., 2002; Desseyn and Laine, 2003). De plus, ces motifs ne sont pas conservés pour chaque mucine entre les espèces suggérant une pression de sélection sur la richesse en résidus hydroxylés et de proline mais pas sur les séquences peptidiques. Le nombre, la séquence et la longueur des TR sont variables d'une mucine à l'autre. Au sein de la région centrale d'une mucine donnée, il a été montré que le nombre de TR peut être variable dans l'espèce humaine d'un individu à l'autre, et même entre les deux allèles de chaque individu, ce qui est à l'origine du polymorphisme de type VNTR (pour « Variable Number Tandem Repeat ») (Debailleul et al., 1998; Vinall et al., 1998).

2.3.1.1.2 Le domaine CYS

Le domaine « CYS » est riche en résidus Cys (9,3 % dans les domaines CYS des mucines de mammifères) et comprend quelques résidus Ser et Thr. Il est constitué d'une centaine d'aa et contient 10 résidus Cys aux positions très conservées chez les mammifères (Desseyn et al., 1998a). Le domaine CYS est un domaine hydrophobe, nu et peu glycosylé, ce qui le rend susceptible à l'action des protéases (Thornton et al., 1997).

La fonction du domaine CYS reste méconnue, mais le fait qu'il soit conservé dans l'évolution suggère qu'il joue un rôle important, notamment dans le repliement et le compactage des mucines (Desseyn, 2009). Ce domaine se replierait pour former une structure globulaire qui serait stabilisée via l'établissement de cinq ponts disulfures (Cone, 2009). Des travaux utilisant un domaine CYS recombinant, exprimé dans la lignée fibroblastique CHO-K1 Lec 3.2.8.1 et non sécrété, ont permis de proposer une structure secondaire du domaine (Ambort et al., 2011). Ce domaine pourrait également être impliqué dans l'établissement de liaisons hydrophobes entre

les domaines CYS des mucines, conduisant alors à la formation d'un réseau de mucus plus ou moins serré (Bansil and Turner, 2006; Brunelli et al., 2007; Desseyn, 2009; Desseyn et al., 1997b). Les propriétés rhéologiques du gel de mucus seraient ainsi influencées par le nombre de domaines CYS des mucines et par la distance entre ces domaines (Bansil and Turner, 2006; Brunelli et al., 2007).

Les travaux de notre équipe ont démontré un rôle biologique important *in vivo* du domaine CYS dans les propriétés de la muqueuse intestinale. Une souris transgénique sécrétant, dans la lumière intestinale, une protéine recombinante constituée d'un chapelet de 12 domaines CYS a été créée. Le mucus colique est mieux préservé lors des coupes histologiques et moins perméable à des particules inertes. Les mucines, qui composent ce mucus, ont un profil de glycosylation différent. La charge lactobacillaire est également plus importante, au moins dans l'iléon. Ces souris sont plus résistantes à une colite induite chimiquement ainsi qu'à une infection expérimentale par des bactéries AIEC (pour « Adherent and Invasive *Escherichia coli* strain ») (Gouyer et al., 2015). Tous ces éléments montrent qu'il est possible de moduler les propriétés du mucus *in vivo* (Desseyn et al., 2016).

2.3.1.2 Les régions terminales

Les régions amino-terminale et carboxy-terminale des mucines possèdent des domaines qui présentent une grande similarité avec le facteur de von-Willebrand (vWF). Le vWF est une glycoprotéine sécrétée dans le sang, capable de former des homopolymères et impliquée dans la formation d'agrégats plaquettaires lors de lésions vasculaires. Le fait que les mucines possèdent des domaines très similaires à ceux du vWF suggère que les mucines sont capables de s'assembler sous forme de polymères (Perez-Vilar and Hill, 1999; Sadler, 2009; Sheehan et al., 2004).

2.3.1.2.1 La région carboxy-terminale

Les séquences codant les régions carboxy-terminales des cinq mucines gélifiantes sont similaires entre elles. Ces séquences sont riches en résidus Cys et composées des domaines D4-B-C-CK, dans le cas des mucines MUC5AC, MUC2 et MUC5B, et des domaines C-CK ou CK dans les mucines MUC6 et MUC19 (**Figure 10**). Le motif CK pour « Cystine Knot », d'environ 85 aa, possède 11 résidus

Cys aux positions très conservées (Meitinger et al., 1993).

2.3.1.2.2 La région amino-terminale

La région amino-terminale des cinq mucines gélifiantes est constituée de trois domaines D homologues (D1, D2 et D3) et d'un domaine D tronqué (D') situé entre les domaines D2 et D3 (**Figure 10**). Ces domaines sont également retrouvés dans le vWF (Perez-Vilar and Mabolo, 2007). La séquence codant la région amino-terminale est riche en résidus Cys. La position des résidus Cys est très conservée entre les régions amino-terminales des mucines et le vWF. Comme décrit pour le vWF (Sadler, 2009), ces domaines sont impliqués dans la multimérisation des dimères de mucines (Ridley et al., 2014).

2.3.2 La composante glycanique

La partie glycanique des mucines représente 50 à 80 % de leur poids sec. Elle est principalement composée de *N*-acétylgalactosamine (GalNac), de galactose (Gal), de fucose, de *N*-acétylglucosamine (GlcNac) et d'acide sialique. L'assemblage des différents sucres se fait par des séries de glycosylations successives, grâce aux glycosyltransférases, et a lieu dans l'appareil de Golgi. Les chaînes *O*-glycanniques sont formées de trois régions : le noyau, le squelette et la région périphérique (**Figure 11**). Elles diffèrent par leur longueur, leur composition et leur acidité (Ten Hagen et al., 2003).

Le « noyau » est composé du résidu GalNac directement attaché à un groupement hydroxyle d'un résidu Ser ou Thr de l'apomucine par une liaison en α et des premiers monosaccharides directement liés au résidu GalNac. Le GalNac, qui correspond à l'antigène sanguin Tn, et le Gal β (1-3)GalNac, qui correspond à l'antigène sanguin T, sont masqués par l'ajout d'autres sucres (**Figure 11**). Ensuite, le « squelette » se forme à partir du noyau par ajout de résidus Gal liés en β (1-3) et de GlcNac liés en β (1-4) ; puis vont se greffer les chaînes périphériques sur le squelette. Les chaînes périphériques se terminent généralement par l'ajout de résidus Gal, GalNac, fucose, acide sialique ou acide sulfate liés par une liaison en α .

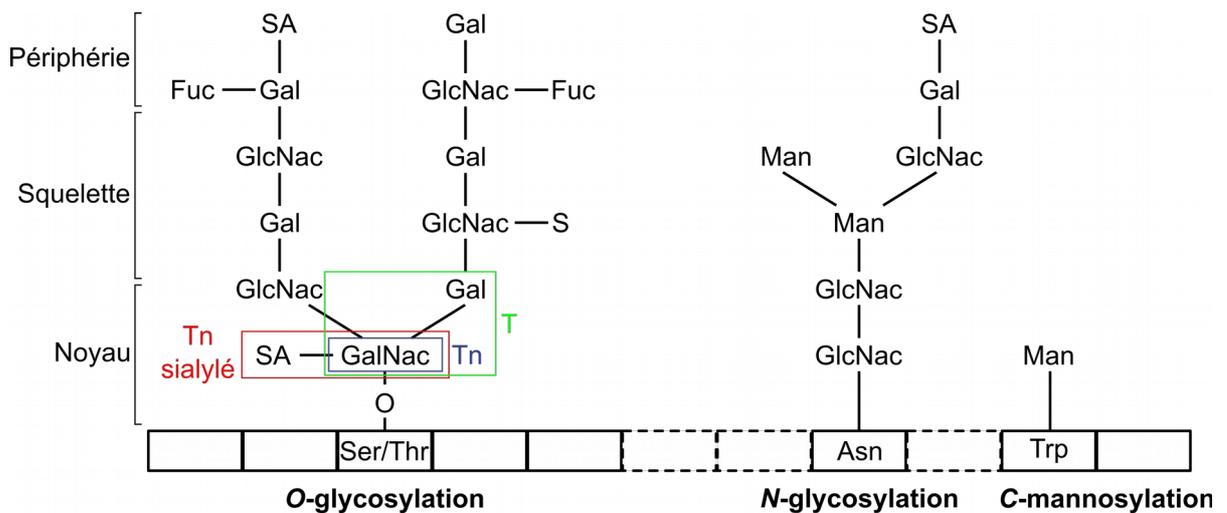


Figure 11 : Représentation schématique des chaînes glycaniques des mucines.

Les antigènes T, Tn et Tn sialylé sont encadrés sur le schéma. Fuc, fucose ; Gal, galactose ; GalNac, *N*-acétylgalactosamine ; GlcNac, *N*-acétylglucosamine ; Man, mannose ; S, sulfate ; SA, acide sialique (Lamblin and Roussel, 1993; Valque, 2011).

Les sucres de la région périphérique confèrent aux mucines des activités antigéniques de groupe sanguin (Lewis, A, B, H) (Strous and Dekker, 1992). Les sucres composant les chaînes glycaniques des mucines déterminent les propriétés physiques et biologiques des mucines : les résidus d'acide sialique, de Gal et de GlcNac confèrent une charge négative aux mucines, alors que le fucose participe à l'hydrophobicité des mucines (Rose and Voynow, 2006). Les sucres des O-glycanes servent également de substrat métabolique aux bactéries de la flore commensale du mucus (Tailford et al., 2015).

Les mucines sont également *N*-glycosylées (Rose and Voynow, 2006). La *N*-glycosylation est la liaison covalente d'un résidu GlcNac sur un résidu asparagine (Asn) au sein d'une séquence peptidique consensus Asn-X-Ser/Thr, le X étant n'importe quel aa sauf une Pro (Denny et al., 1996). D'autres oligosaccharides, tels que le mannose, le Gal, le GalNac, le fucose et l'acide sialique sont greffés sur le résidu GlcNac (**Figure 11**). La *N*-glycosylation est initiée dans le RE et se poursuit dans l'appareil de Golgi. Elle aurait un rôle important dans le repliement, le tri, le transport et la sécrétion de la mucine (Parry et al., 2006), et semble nécessaire à la dimérisation des mucines sécrétées (Bell et al., 1998).

La *C*-mannosylation est une modification co-translationnelle qui a lieu dans le RE et qui fait intervenir une enzyme récemment caractérisée (Buettner et al., 2013; Niwa et al., 2016). Elle consiste en une liaison carbone-carbone entre le premier résidu tryptophane (Trp) d'une séquence consensus Trp-Xaa-Xaa-Trp et un mannose (**Figure 11**) (Furmanek and Hofsteenge, 2000). Une des caractéristiques de tous les domaines CYS est de posséder une séquence consensus de *C*-mannosylation. Cependant, la *C*-mannosylation effective du domaine est encore discutée (Ambort et al., 2011; Perez-Vilar et al., 2004; Zanetta et al., 2004). Il a été suggéré que la *C*-mannosylation serait nécessaire au bon repliement du domaine CYS et jouerait également un rôle important dans le packaging des mucines ou encore dans le trafic intracellulaire (Perez-Vilar et al., 2004).

2.4 Caractéristiques de MUC5B

2.4.1 MUC5B humaine

2.4.1.1 La région carboxy-terminale

La région 3' du gène *MUC5B* s'étend sur environ 11 kb et comprend 18 exons ayant des tailles comprises entre 32 et 781 pb et 18 introns ayant des tailles comprises entre 114 et 1118 pb. La partie 3' du gène *MUC5B* présente une similarité de séquence avec la partie 3' du facteur vWF et code un peptide de 808 aa riche en résidus Cys (Desseyn et al., 1997b) et en Pro (9,5%) (Desseyn et al., 1997a). L'extrémité carboxy-terminale de MUC5B est composée des différents domaines D4, B, C, retrouvés dans le vWF et d'un domaine CK (**Figure 12**). La partie carboxy-terminale de MUC5B contient également 15 sites potentiels de *N*-glycosylation.

Une des caractéristiques de la région 3' de *MUC5B* est de posséder un polymorphisme de type VNTR. En effet, une séquence de 59 pb riche en GC a été retrouvée répétée entre 3 et 8 fois dans une cohorte de 86 individus dans l'intron 36. Il a été suggéré que ce polymorphisme pourrait être impliqué dans la régulation de MUC5B (Desseyn et al., 1999).

2.4.1.2 La région centrale

MUC5B fait preuve d'exception par rapport aux autres mucines sécrétées car elle ne présente pas de polymorphisme de type VNTR dans son exon central (Vinall et al., 1998). La région centrale de MUC5B est codée par un unique exon de 10713 pb, qui ne contient pas de site d'épissage interne (Desseyn et al., 1998b, 1997b). Ce grand exon central code un peptide de 3570 aa composé de 19 domaines (Desseyn et al., 1997b). La région centrale de MUC5B est composée de l'alternance des différents sous-domaines suivants (**Figure 12**) :

- un domaine R-end de 111 aa, riche en Thr et Ser (48,6 %) et Pro (11,5 %), retrouvé 4 fois dans MUC5B (Desseyn et al., 1997b) ;

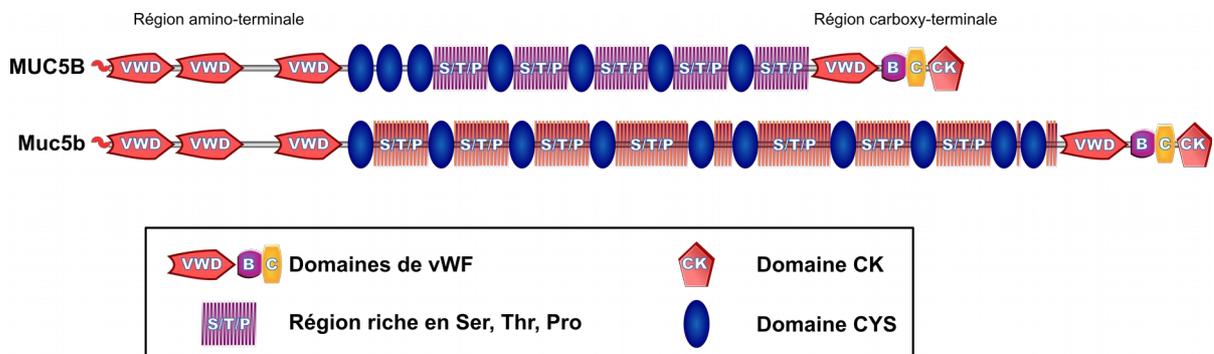


Figure 12 : Représentation des mucines humaine et murine MUC5B/Muc5b.

- cinq TR composés d'une séquence de 29 aa répétée respectivement 11, 11, 17, 11 et 22 fois. Ces domaines sont riches en résidus Ser et Thr (37,2 %) et Pro (11,5 %) et chacun de ces domaines porte également un site potentiel de N-glycosylation (Desseyn et al., 2008a, 1997b) ;

- un domaine CYS qui est retrouvé 7 fois dans MUC5B (Desseyn et al., 1997b).

2.4.1.3 La région amino-terminale

La région 5' du gène *MUC5B* s'étend sur 15,2 kb et comprend 30 exons (de l'exon 0 à l'exon 29) (Desseyn et al., 1998b; Perrais et al., 2001). La partie 5' du gène présente une similarité de séquence avec la partie 5' du *vWF* et code un peptide de 1286 aa riche en résidus Cys (Desseyn et al., 1998b). Le peptide déduit s'organise en régions D1-D2-D' et D3 (**Figure 12**). Cette région amino-terminale est impliquée dans la multimérisation de la mucine (Ridley et al., 2014).

2.4.1.4 Le promoteur de *MUC5B*

La séquence promotrice de *MUC5B* a été identifiée (Chen et al., 2001a; Perrais et al., 2001; Van Seuningen et al., 2000). Sur le promoteur de *MUC5B*, des sites de liaison de différents facteurs de transcription (FT) ont été mis en évidence : deux sites de liaison du facteur nucléaire- κ B (NF- κ B) et un site de liaison de la protéine activatrice-1 (AP-1) ont été identifiés (Chen et al., 2001a). Des sites potentiels de liaison aux FT GATA et TTF-1 qui sont impliqués dans la formation, la différenciation et la fonction des cellules tapissant le tractus respiratoire ont également été décrits (Jonckheere et al., 2011; Van Seuningen et al., 2001, 2000).

2.4.2 Muc5b murine

Le gène *Muc5b* murin a été caractérisé *in silico* (Chen et al., 2001b), puis cloné et séquencé (Escande et al., 2002). *Muc5b* se situe sur le chromosome 7 dans la région sythénique du fragment chromosomique qui porte le cluster de mucines. Il s'étend sur environ 36 kb et contient 49 exons.

Les gènes *MUC5B* humain et *Muc5b* murin ont des organisations génomiques

semblables (Escande et al., 2002). Trente six des 49 exons ont exactement la même taille entre les deux gènes et les autres exons présentent des tailles très similaires, à l'exception de l'exon central qui est plus petit chez la souris (7,9 kb). Deux transcrits de *Muc5b* sont générés par épissage alternatif et diffèrent par la présence ou l'absence de l'exon 1.

Muc5b code une protéine de 4782 aa qui présente 43 % de similarité de séquence avec son orthologue humain. Les séquences protéiques des régions amino- et carboxy-terminales de *Muc5b* sont très similaires à celles de MUC5B (respectivement 64 % et 62 %). La grande région centrale de *Muc5b* est composée de régions S/T/P associées à 10 domaines CYS. Par contre, le domaine R-end trouvé dans la séquence humaine n'est pas retrouvé dans la mucine murine (**Figure 12**).

Une forte similarité de séquence est retrouvée sur les 170 premiers nucléotides de la séquence promotrice de la mucine murine et humaine (67,5 %) et montre que la séquence de la TATA box est identique entre les deux espèces (Jonckheere et al., 2011).

2.5 Régulation de l'expression génique des mucines gélifiantes

2.5.1 Régulation épigénétique

Parmi les mécanismes de régulation épigénétique de l'expression de gènes, on trouve la méthylation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et des modifications des histones (**Figure 13**). La régulation épigénétique de l'expression des mucines reste très peu étudiée.

MUC2 est la mucine dont la régulation épigénétique a été la plus étudiée. Il a été montré une corrélation entre le niveau de méthylation des sites CpG du promoteur de *MUC2* et l'expression de *MUC2 in vitro* dans des cellules de cancers du côlon et *in vivo* dans des cancers du pancréas. Il a également été suggéré que l'acétylation des histones activerait l'expression de *MUC2* (Thai et al., 2008).

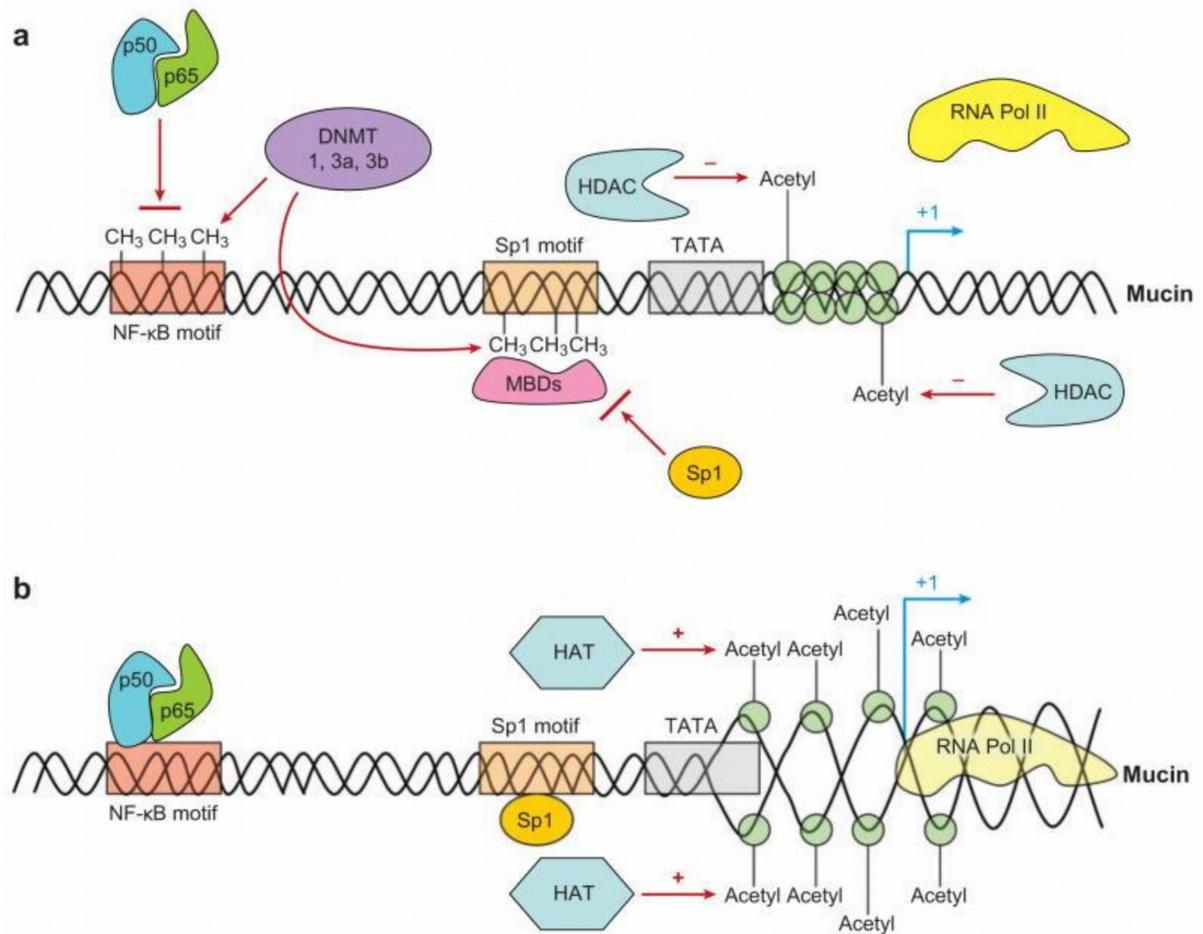


Figure 13 : Mécanisme théorique de la régulation épigénétique de la transcription des gènes de mucines.

(a) Expression faible d'un gène de mucine. La méthylation de l'ADN inhibe la fixation des facteurs de transcription par action directe ou via les MBDs (pour « methyl binding proteins »). Les ADN méthyltransférases (DNMT) catalysent le transfert de groupements méthyles. La structure du nucléosome est relativement fermée à cause des histones désacétylées.

(b) Expression forte d'un gène de mucine. La perte de méthylation de l'ADN permet aux facteurs de transcription de se fixer sur leurs sites de liaison. L'acétylation des histones permet l'ouverture des nucléosomes et augmente la transcription.

HAT, acétylases d'histones ; HDAC, désacétylases d'histones ; NF-κB, facteur nucléaire-κB ; RNA Pol II, ARN polymérase II. Adapté de (Thai et al., 2008).

Dans des modèles de lignées cellulaires cancéreuses (KATO III et AGS), il a été montré que certains sites CpG présents sur le promoteur de *MUC5B* sont méthylés et que cette méthylation serait responsable de la répression de *MUC5B* (répression levée par traitement à l'azacytidine) (Perrais et al., 2001).

2.5.2 Régulation transcriptionnelle

Des mécanismes communs de régulation transcriptionnelle des gènes codant les mucines gélifiantes ont été mis en évidence, impliquant des facteurs de transcription, des cytokines, des facteurs de croissance, des médiateurs lipidiques, des hormones et des produits bactériens (**Figure 14**).

2.5.2.1 Régulation par des produits bactériens

La régulation de l'expression des mucines par les bactéries a été mise en évidence par le fait que les maladies pulmonaires obstructives, comme la mucoviscidose ou la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), sont caractérisées par une colonisation et une infection des voies respiratoires, et une sur-production de mucines et de mucus. L'activation des différentes voies de signalisation conduisant à une sur-expression des mucines se fait, notamment, par le lipopolysaccharide (LPS) et l'acide lipotéichoïque (LTA), qui sont respectivement des composants de la paroi des bactéries à Gram- et Gram+ (Rose and Voynow, 2006).

2.5.2.2 Régulation par des médiateurs inflammatoires

La régulation transcriptionnelle des mucines se fait aussi bien par des cytokines pro-inflammatoires que des cytokines anti-inflammatoires. Il a été montré que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α (pour « tumor necrosis factor α »), qui sont des cytokines pro-inflammatoires, induisent une métaplasie des cellules caliciformes et une hypersécrétion de mucines lors de maladies inflammatoires. Concernant les cytokines anti-inflammatoires, l'IL-4 n'a pas d'effet probant sur la production de mucines mais induit une métaplasie des cellules caliciformes, l'IL-9 stimule faiblement l'expression de *MUC5AC* et l'IL-13 induit une métaplasie des cellules à mucus, une augmentation de la production de *MUC5AC* et potentiellement une sur-expression de *MUC5B* (Thai et al., 2008; Van Seuning et al., 2001).

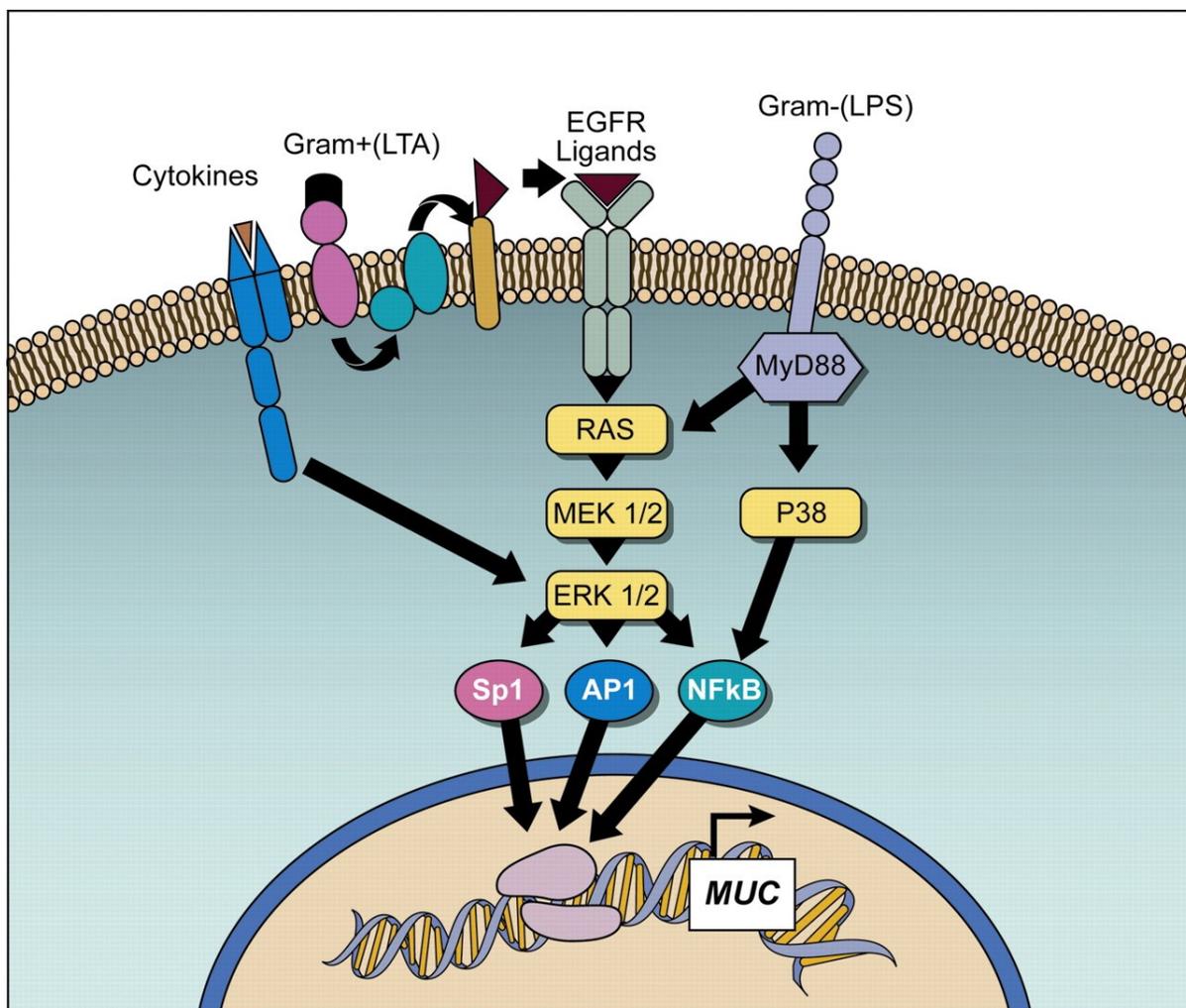


Figure 14 : Représentation schématique des voies de signalisation régulant la transcription des gènes des mucines gélifiantes, sous l'influence de cytokines, sous-produits bactériens et facteurs de croissance.

AP1, protéine activatrice 1 ; EGFR, epidermal growth factor receptor ; ERK, extracellular signal-regulated kinases ; LPS, lipopolysaccharide ; LTA, acide lipotéichoïque ; MEK, mitogen-activated protein kinase ; NFκB, facteur nucléaire κB (Rose and Voynow, 2006).

Dans notre étude, nous avons besoin d'un agent pharmacologique avec des propriétés sécrétagogues des mucines, d'activation de l'expression des mucines gélifiantes et de la différenciation des cellules caliciformes. Nous avons choisi l'IL-13 dont l'effet a été démontré *in vitro* et *in vivo*. Chez des souris, il a été montré que la sur-expression chronique d'IL-13 dans les voies respiratoires entraîne une hypersécrétion de mucus et une hyperplasie des cellules à mucus (Zhu et al., 1999). Le lien direct entre IL-13 et différenciation des cellules à mucus a été mis en évidence *in vitro* dans des cellules de trachée de cobaye. Il a été montré que l'IL-13 favorise la différenciation des cellules trachéales indifférenciées en cellules à mucus matures, au détriment de la différenciation des cellules en cellules ciliées. L'IL-13 induit également une augmentation de la production de MUC5AC (Kondo et al., 2002). Il a aussi été montré que l'IL-13 induit l'hyperplasie et la métaplasie des cellules à mucus, au moins en partie, par l'activation de la voie de signalisation STAT6 (Kuperman et al., 1998; Mathew et al., 2001; Tekkanat et al., 2001).

2.5.2.3 Régulation par des facteurs de transcription

Des sites potentiels de fixation de facteurs de transcription, dont Sp1, NF- κ B, CREB et AP-1, ont été mis en évidence sur les promoteurs des gènes codant les mucines gélifiantes (Thai et al., 2008; Van Seuningen et al., 2001).

Il a été montré que des sites potentiels de fixation pour les facteurs de transcription AP-1, NF- κ B, Sp1 et c-Myc sont situés sur le promoteur de *MUC5B* (Thai et al., 2008). Trois sites potentiels de liaison du NF- κ B sur le promoteur de *MUC5B* ont été décrits. Le NF- κ B serait impliqué dans la régulation de l'expression de *MUC5B* induite par stimulation avec de l'IL-1 β et de l'IL-17 (Fujisawa et al., 2011).

2.5.2.4 Régulation par des médiateurs lipidiques

L'expression des mucines est également régulée par des médiateurs lipidiques, dont les prostaglandines, les leukotriènes, les acides hydroxyeicosatétraénoïques et le facteur d'activation plaquettaire (PAF) (Van Seuningen et al., 2001). Ces médiateurs lipidiques sont produits à partir de l'acide arachidonique (AA), un acide gras polyinsaturé (AGPI) de la série (n-6), libéré des phospholipides membranaires par l'action de phospholipases. Cette libération d'AA

fait suite à l'activation des cellules, notamment par le LPS (Slomiany and Slomiany, 2006).

Le rôle du PAF serait particulièrement important dans l'induction de l'hyperplasie des cellules à mucus et l'augmentation de la sécrétion de mucines dans des maladies inflammatoires des voies respiratoires (Van Seuning et al., 2001). Au contraire, le PAF serait impliqué dans la diminution de l'expression des mucines salivaires lors d'infections à *Porphyromonas gingivalis* (Slomiany and Slomiany, 2006).

Les travaux du laboratoire ont également montré que les AGPI de la série (n-3) permettent de moduler l'expression de mucines pulmonaires. En effet, chez la souris de type sauvage, un régime enrichi en acide docosahexaénoïque (DHA) et en acide eicosapentaénoïque (EPA) permet de diminuer l'expression de *Muc5b* dans le poumon, après infection par *Pseudomonas aeruginosa* (Tetaert et al., 2007).

2.5.2.5 Régulation hormonale

L'expression des mucines serait également régulée par les hormones. Dans l'endocervix, il a été montré que les taux d'expression de *MUC5B* et *MUC4* sont inversement proportionnels à la concentration en progestérone (Gipson et al., 1999). Par contre, dans l'œil, la production des mucines (*Muc4* et *Muc5ac*) n'est sous l'influence ni de la progestérone, ni de l'œstrogène (Lange et al., 2003).

2.5.3 Régulation transcriptionnelle du cluster 11p15

Des cinq mucines gélifiantes, *MUC2*, -6, -5AC et -5B sont localisés en cluster 11p15 et leur expression est cellule et tissu spécifique. L'équipe d'Ann Harris (Chicago, USA) a cherché s'il existe un mécanisme de régulation qui coordonne l'expression des gènes de ce cluster et a montré *in vitro* l'implication du CTCF (pour « CCCTC-binding factor ») (Gosalia et al., 2013). Le CTCF est une protéine de 82 kDa qui, en se fixant à la chromatine, entraîne des modifications tridimensionnelles des chromosomes et rend les gènes plus ou moins disponibles à des facteurs de transcription. Les auteurs ont étudié 13 sites de fixation possibles du CTCF retrouvés dans le cluster, dont trois dans le gène *MUC5B*. Ils ont montré que la fixation du

CTCF sur ces trois sites de fixation est ubiquitaire dans les cellules étudiées (LS180, LS174T, HT-29, A549, Calu-3, BxPC-3, HEK293 et Capan-1), avec des taux d'occupation des sites par le CTCF extrêmement différents d'un type cellulaire à l'autre. Ils ont aussi montré que le taux de fixation du CTCF est corrélé au niveau d'expression des gènes codant les mucines. Ils ont ensuite démontré l'indépendance des sites de fixation du CTCF les uns par rapport aux autres. La déplétion d'un site de fixation du CTCF n'entraîne pas de modification de l'expression des gènes où se trouvent les autres sites de fixation. Enfin, dans des cellules Calu-3 (lignée cellulaire de carcinome du poumon), ils ont montré que le LPS induit une augmentation de l'expression de *MUC2* et *MUC5AC* et une diminution de l'expression de *MUC5B*, accompagnées d'une perte de liaison du CTCF notamment sur les sites IV (situé entre *MUC6* et *MUC2*) et les sites XI et XII (situés respectivement aux extrémités 5' et 3' de *MUC5B*), ce qui suggère que la perte de liaison du CTCF est primordiale pour l'activation de ces gènes en réponse à un stimulus par le LPS (Gosalia et al., 2013).

2.6 Conclusion

Malgré la connaissance des séquences des gènes codant les mucines gélifiantes chez l'Homme et chez la souris, les mécanismes de régulation de l'expression des mucines restent encore flous et sont relativement peu étudiés. De plus, il semble qu'un même facteur de régulation puisse avoir des effets opposés suivant le tissu d'expression de la mucine étudiée et que les différents types de médiateurs (bactériens, inflammatoires, lipidiques...) soient étroitement liés.

Dans les chapitres suivants, nous allons passer en revue l'expression de *MUC5B* en situations normale et pathologique chez l'Homme et chez la souris. Les sites de production de *MUC5B/Muc5b* en situations normale et pathologique sont récapitulés sur la **Figure 15**.

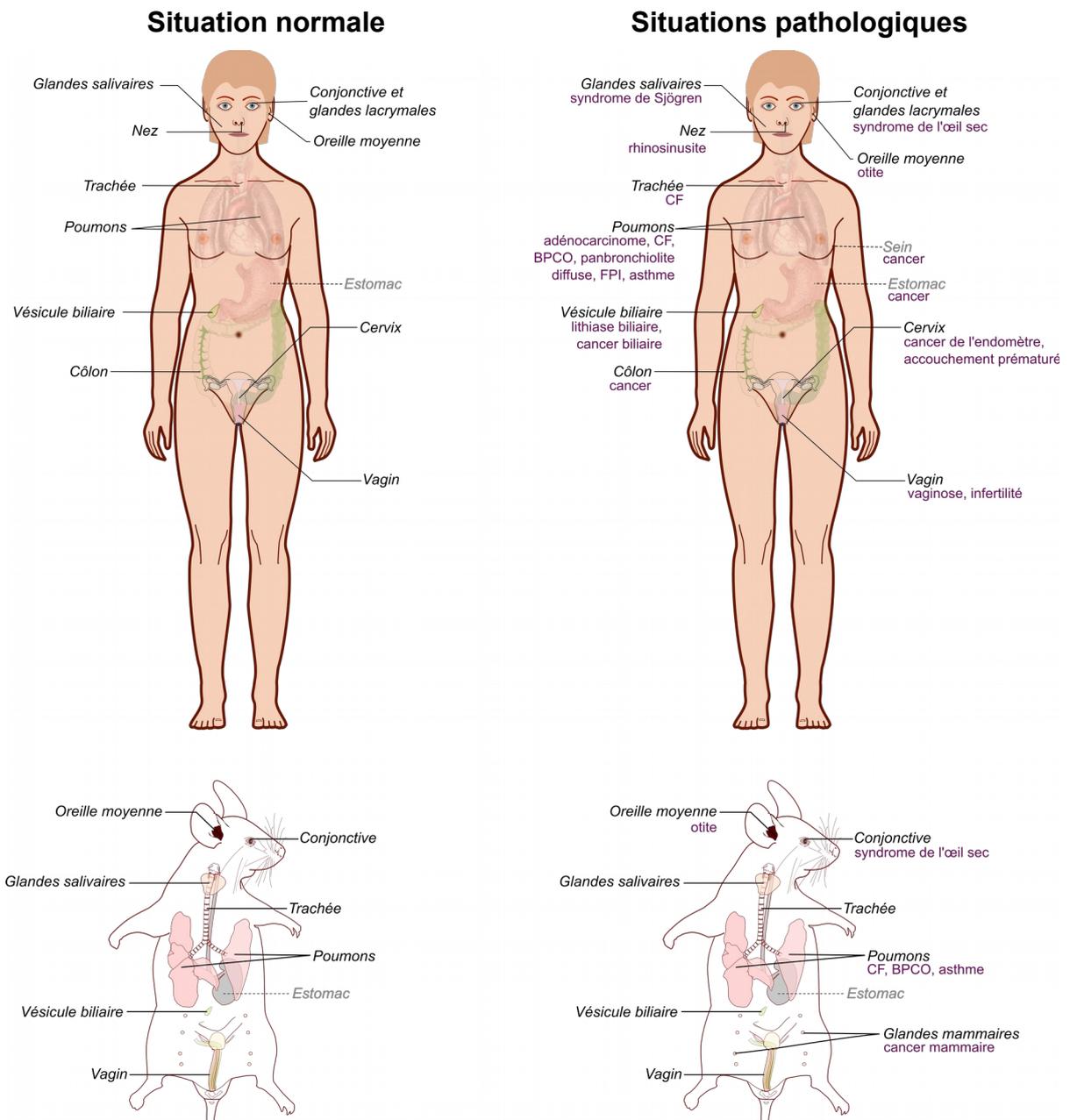


Figure 15 : Sites de production de MUC5B/Muc5b en situations normale et pathologique chez l'Homme et la souris.

En noir : organes où la mucine MUC5B/Muc5b est détectée (expression ou production) à l'âge adulte ; en gris : organe où MUC5B/Muc5b est exprimée transitoirement ; en violet : pathologies où des anomalies de l'expression de MUC5B/Muc5b ont été rapportées. BPCO, bronchopneumopathie chronique obstructive ; CF, cystic fibrosis ; FPI, fibrose pulmonaire idiopathique. Dessin du corps humain, Wikipedia Commons ; dessin vectoriel de la souris, JL Dessey.

3 Expression de MUC5B en situation normale

3.1 Voies respiratoires

3.1.1 Cavité nasale

3.1.1.1 Rappels anatomique et histologique

Le nez est la porte d'entrée du système respiratoire. En plus d'une fonction respiratoire, le nez permet l'olfaction et conditionne l'air inhalé avant son entrée dans les voies respiratoires inférieures (filtration, humidification et réchauffement de l'air). Il est également le lieu d'absorption des gaz et vapeurs hydrosolubles, de piégeage des particules inhalées et de métabolisation des xénobiotiques atmosphériques. Ces mécanismes participent à la protection des échanges gazeux qui ont lieu dans les poumons (Treuting and Dintzis, 2012).

Le nez est constitué de deux fosses nasales, allant chacune de la narine au nasopharynx, séparées par la cloison nasale. Alors que la cavité nasale principale est bordée d'os, le vestibule nasal est bordé de cartilage flexible et est recouvert d'un épithélium squameux, semblable à celui de la peau, contenant un nombre variable de follicules pileux près des narines. La cavité nasale principale est recouverte de la muqueuse nasale, elle-même recouverte d'une couche continue de mucus. Les cornets (supérieur, moyen et inférieur), des structures osseuses recouvertes de muqueuse nasale, participent à l'augmentation de la surface de la cavité nasale principale qui est de 150–200 cm² chez l'Homme. La cavité nasale principale et les cornets sont recouverts par l'épithélium transitoire, l'épithélium respiratoire et l'épithélium olfactif (**Figure 16**). L'épithélium transitoire, un épithélium cuboïde peu ou pas cilié, fait la jonction entre le vestibule et la cavité nasale principale. La majorité de la surface de la cavité nasale est recouverte par l'épithélium respiratoire, un épithélium pseudostratifié cylindrique, principalement constitué de cellules ciliées et de cellules caliciformes dont la densité augmente selon un axe antéro-postérieur. L'épithélium olfactif, un neuroépithélium cylindrique pseudostratifié composé de cellules réceptrices neuro-sensorielles, de cellules basales et de cellules de soutien ne recouvre que 3 % de la surface nasale (Treuting and Dintzis, 2012).

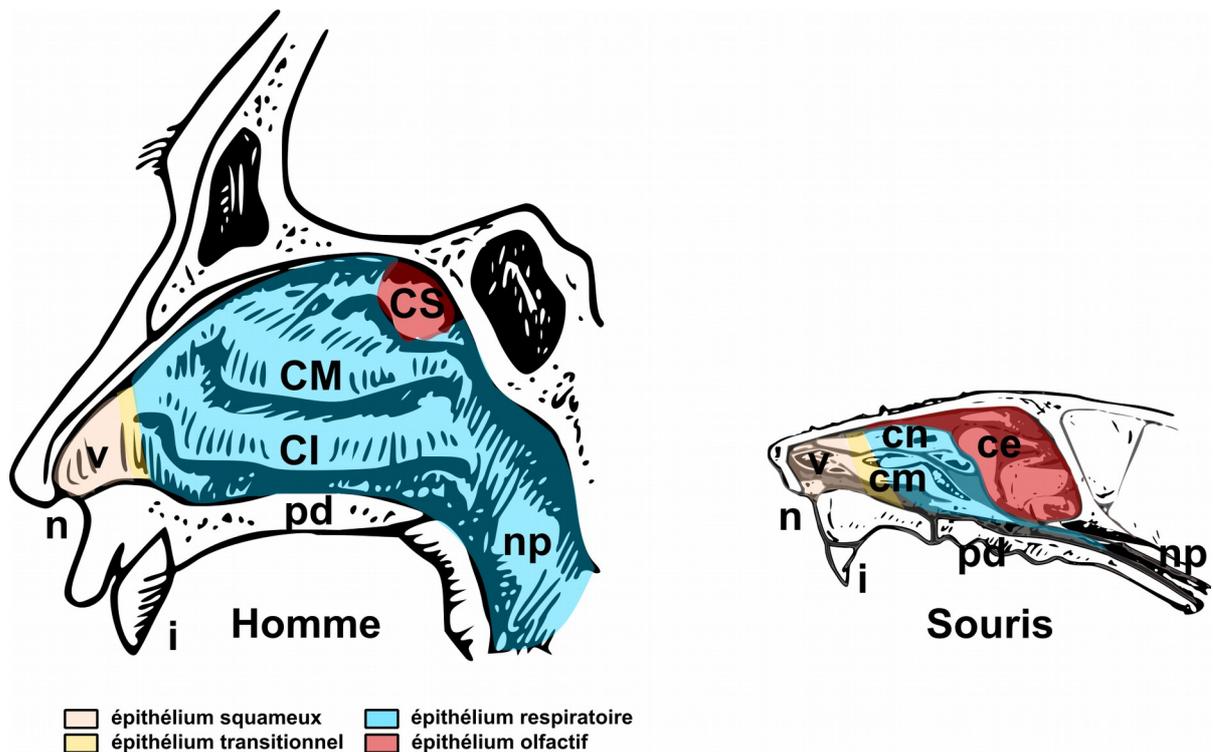


Figure 16 : Représentation schématique de la fosse nasale droite de l'Homme et de la souris.

La cloison nasale a été retirée, exposant ainsi la paroi latérale de la fosse nasale droite. Les couleurs indiquent les différents types d'épithélium tapissant la cavité nasale. ce, cornet ethmoïdien ; CI, cornet inférieur ; cm, cornet maxillaire ; CM, cornet moyen ; cn, cornet nasal ; CS, cornet supérieur ; i, incisive ; n, narine ; np, nasopharynx ; pd, palais dur ; v, vestibule. Adapté de (Treuting and Dintzis, 2012).

La particularité de l'Homme est de posséder plusieurs sinus paranasaux : les sinus maxillaires, les sinus frontaux, les sinus ethmoïdiens et les sinus sphénoïdiens (Treuting and Dintzis, 2012).

3.1.1.2 Mucines nasales

Les principales mucines sécrétées de la muqueuse naso-sinusienne sont MUC5AC, MUC5B et MUC8, et la principale mucine membranaire est MUC4. *MUC5AC* est principalement exprimé par les cellules caliciformes de l'épithélium de surface et plus faiblement dans les glandes de la sous-muqueuse, alors que *MUC5B* est principalement exprimé dans les cellules à mucus des glandes de la sous-muqueuse et plus faiblement dans les cellules caliciformes de l'épithélium de surface. *MUC8* est fortement exprimé dans l'épithélium de surface et les glandes de la sous-muqueuse. *MUC4* est exprimé par la plupart des cellules de l'épithélium de surface et plus faiblement dans les glandes de la sous-muqueuse. Il a également été montré que *MUC1* et *MUC2* sont exprimés dans la muqueuse naso-sinusienne (Ali, 2009).

3.1.1.3 Nez de la souris

3.1.1.3.1 Particularités anatomique et histologique

La souris respire uniquement par le nez. La cavité nasale a aussi une fonction olfactive qui est plus développée que chez l'Homme. En effet, alors que l'épithélium olfactif ne recouvre que 3 % de la surface de la cavité nasale humaine, l'épithélium olfactif recouvre près de 50 % de la surface de la cavité nasale murine. De plus, alors que la structure de la cavité nasale principale de l'Homme est relativement simple, la cavité nasale murine a une structure très complexe, faite de nombreux plis et ramifications. La surface relative de la cavité nasale de la souris est cinq fois plus grande que celle de l'Homme et permet une meilleure protection des voies respiratoires inférieures. Contrairement à l'Homme, la souris n'a pas de follicules pileux dans le vestibule nasal, mais possède des organes olfactifs accessoires dans la cavité nasale principale. En ce qui concerne les sinus paranasaux, la particularité de la souris est de n'avoir que des sinus maxillaires (Treuting and Dintzis, 2012).

3.1.1.3.2 Mucines murines nasales

Chez la souris, Muc5b est principalement produite par les cellules des glandes de la sous-muqueuse nasale (Lin et al., 2014).

3.1.2 Arbre trachéo-bronchique

3.1.2.1 Rappels anatomique et histologique

L'épithélium qui tapisse la muqueuse respiratoire est en continuité avec celui formant les glandes de la sous-muqueuse. Dans la trachée et les bronches principales, l'épithélium est pseudo-stratifié et composé principalement de cellules ciliées, de cellules basales, de cellules neuroendocrines et de cellules caliciformes. Les cellules ciliées et les cellules caliciformes sont responsables du mécanisme de clairance mucociliaire. Par microscopie électronique, il a été montré que les cellules caliciformes contiennent des granules à mucus. Des cellules séreuses sont également retrouvées dans les petites bronches et bronchioles. Ces cellules contiennent des granules de sécrétion de taille inférieure à ceux retrouvés dans les cellules caliciformes. Les cellules séreuses produisent et secrètent des mucines neutres et probablement des lipides (Jeffery and Li, 1997).

Dans les bronchioles, l'épithélium acquiert une morphologie cuboïdale monostratifiée et les cellules caliciformes sont remplacées par des cellules Club, anciennement appelées cellules de Clara*. La fonction des cellules Club n'est pas clairement déterminée. Les cellules Club sont impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques, secrètent la protéine CCSP (pour « Club Cell Secretory Protein ») qui aurait un rôle anti-inflammatoire et synthétisent des anti-protéases et l'hypophase, un composé du surfactant (Jeffery and Li, 1997). Au niveau des jonctions bronchioles-alvéoles, on retrouve des cellules neuroendocrines ainsi que des cellules progénitrices qui expriment la protéine CCSP (Wong et al., 2009). Dans les alvéoles, lieu où se font les échanges gazeux, l'épithélium respiratoire est monostratifié et constitué de cellules très aplaties : les pneumocytes I et II (**Figure 17**).

* La dénomination Clara a été abandonnée car elle faisait référence à Max Clara, anatomiste nazi qui a décrit ces cellules en 1937 (Winkelmann and Noack, 2010).

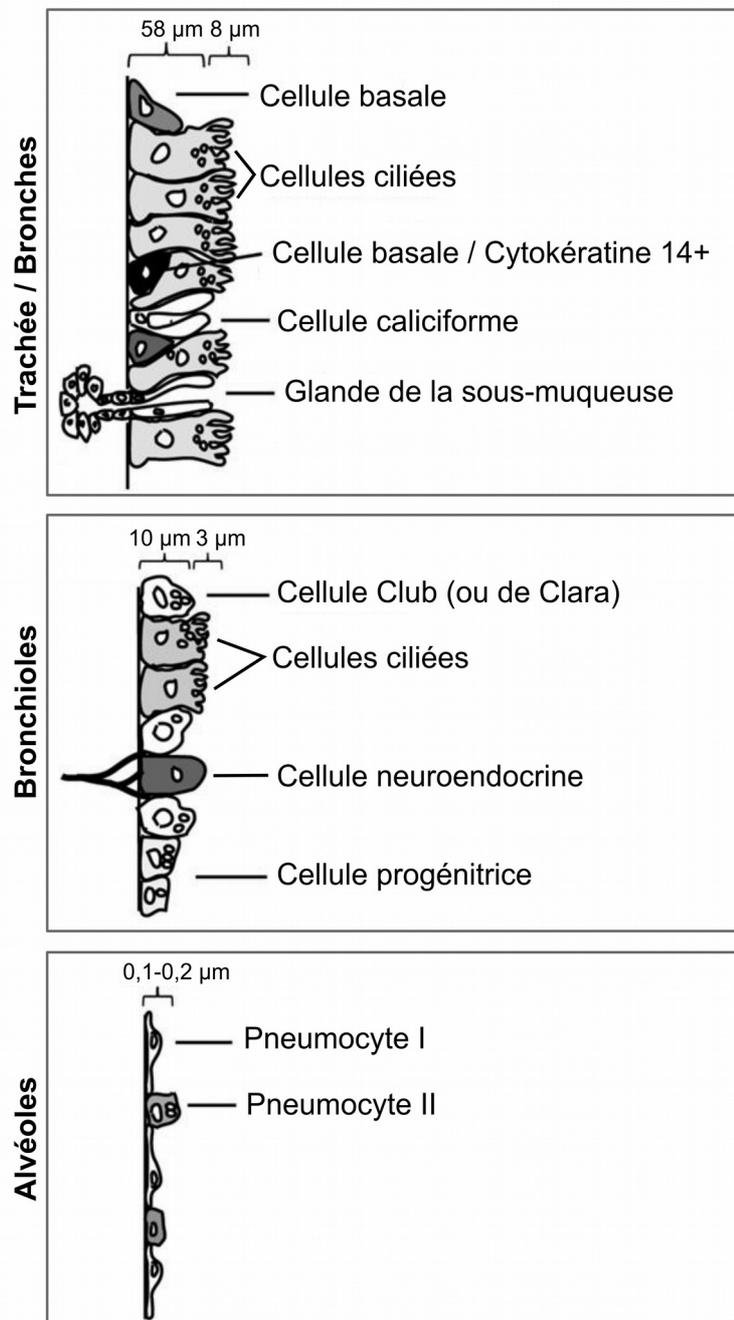


Figure 17 : Les différents types cellulaires du tractus respiratoire.

Adapté de (Galluzzo and Bocchetta, 2011).

Chez l'Homme, les cellules caliciformes mucosécrétantes sont nombreuses dans la trachée et les bronches principales mais sont de plus en plus rares en périphérie. Les glandes de la sous-muqueuse ne sont présentes que dans la trachée et les bronches principales (Jeffery and Li, 1997).

3.1.2.2 Mucines du tractus respiratoire

Dès la 9,5^{ème} semaine d'aménorrhée (SA), des ARNm *MUC1* et *MUC2* sont détectés dans la trachée, les bronches en développement, les tubules épithéliaux et les sacs terminaux. L'expression de *MUC1* et *MUC2* précède la différenciation épithéliale. Les ARNm *MUC5AC*, *MUC5B* et *MUC7* sont détectés plus tardivement, simultanément à la différenciation des cellules de l'épithélium bronchique (Buisine et al., 1999). Les ARNm *MUC5B* sont détectés à partir de la 13^{ème} SA. À ce stade, l'expression de *MUC5B* est faible et diffuse dans l'épithélium bronchique. À partir de la 18^{ème} SA, *MUC5B* est exprimé dans l'épithélium des glandes de la sous-muqueuse et parfois faiblement dans les cellules épithéliales de surface. L'expression de *MUC5B* apparaît simultanément avec la différenciation des cellules épithéliales et suit le développement des glandes de la sous-muqueuse. Dès la 23^{ème} SA, le territoire d'expression de *MUC5B* est restreint à l'épithélium des glandes de la sous-muqueuse dans la trachée et les bronches (Buisine et al., 1999; Reid et al., 1997).

À l'âge adulte, les gènes *MUC1*, *MUC2*, *MUC4*, *MUC5AC*, *MUC5B*, *MUC7*, *MUC8*, *MUC11*, *MUC13*, *MUC15*, *MUC19* et *MUC20* sont exprimés dans les voies respiratoires (Rose and Voynow, 2006). *MUC5B* et *MUC5AC* sont les mucines majeures du tractus respiratoire adulte. La mucine *MUC5B* est produite et sécrétée par des cellules à mucus des glandes de la sous-muqueuse (Audie et al., 1993; Reid et al., 1997) (**Figure 18**).

3.1.2.3 Tractus respiratoire murin

3.1.2.3.1 Particularités anatomique et histologique

Chez la souris, les glandes de la sous-muqueuse sont présentes uniquement dans la partie supérieure de la trachée, alors qu'elles sont présentes tout le long de la trachée chez l'Homme (Innes and Dorin, 2001).

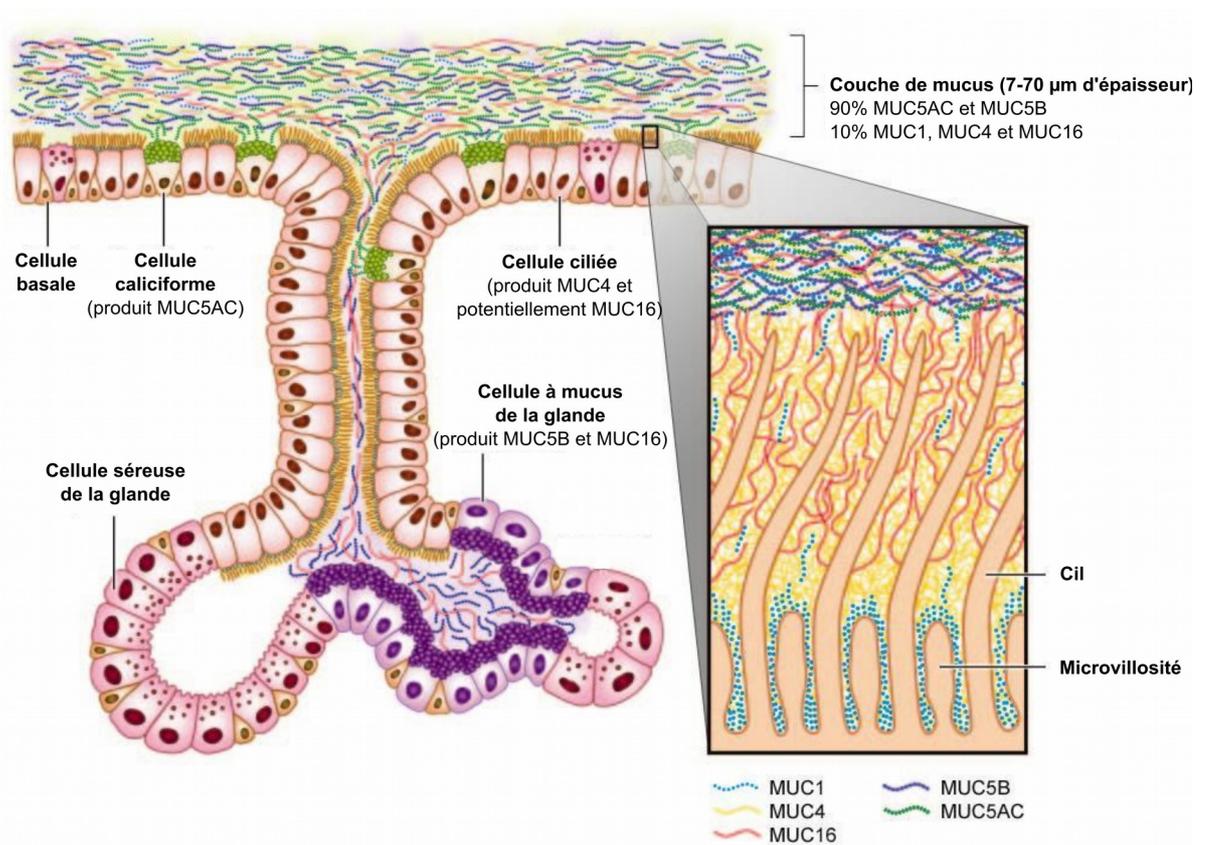


Figure 18 : Expression des mucines dans les voies respiratoires.

Adapté de (Hattrup and Gendler, 2008).

L'épithélium respiratoire de la souris est composé de trois types cellulaires : des cellules ciliées (environ 40 %), des cellules Club et des cellules basales (Evans et al., 2004; Hayashi et al., 2004). Quelques rares cellules à mucus sont présentes dans la trachée. Les cellules Club possèdent quelques granules de sécrétion localisés à leur pôle apical. Il a été montré que les cellules Club sécrètent une petite quantité de Muc5b en situation normale (Zhu et al., 2008).

3.1.2.3.2 Mucines murines des voies respiratoires

Chez la souris adulte, *Muc1*, *Muc2*, *Muc4*, *Muc5ac*, *Muc5b*, *Muc6* et *Muc19* sont exprimés dans les voies respiratoires (Rose and Voynow, 2006). Muc5b est produite par les cellules trachéo-bronchiques dès le 14,5^{ème} jour du développement embryonnaire (Roy et al., 2011). Muc5b et Muc5ac restent les principales mucines gélifiantes de l'arbre respiratoire murin.

3.2 Segment antérieur de l'œil

3.2.1 Rappels anatomique et histologique

Typiquement, le film lacrymal est décrit comme constitué de trois couches : une couche externe lipidique, une couche interne aqueuse et une couche muqueuse adjacente à l'épithélium de surface (**Figure 19**). Ce modèle classique à trois couches est néanmoins de plus en plus contesté. En effet, la frontière entre les couches muqueuse et aqueuse n'étant pas nette, il serait peut-être plus juste de décrire le film lacrymal comme un gel muqueux hydraté, avec un gradient de mucines qui est croissant vers la surface oculaire (DEWS, 2007a).

La couche muqueuse du film lacrymal est produite par les cellules en calice de la conjonctive qui est un épithélium squameux stratifié non-kératinisé recouvrant la face postérieure des paupières et la face antérieure de l'œil (**Figure 19**). La conjonctive palpébrale, ou tarsale, commence au bord des paupières et recouvre l'intérieur des paupières. La conjonctive se replie ensuite pour former la conjonctive fornicaire, aussi appelée fornix. La conjonctive bulbaire, ou globulaire, recouvre la face antérieure du globe oculaire et se termine au niveau du limbus, où commence la cornée (Treuting and Dintzis, 2012).

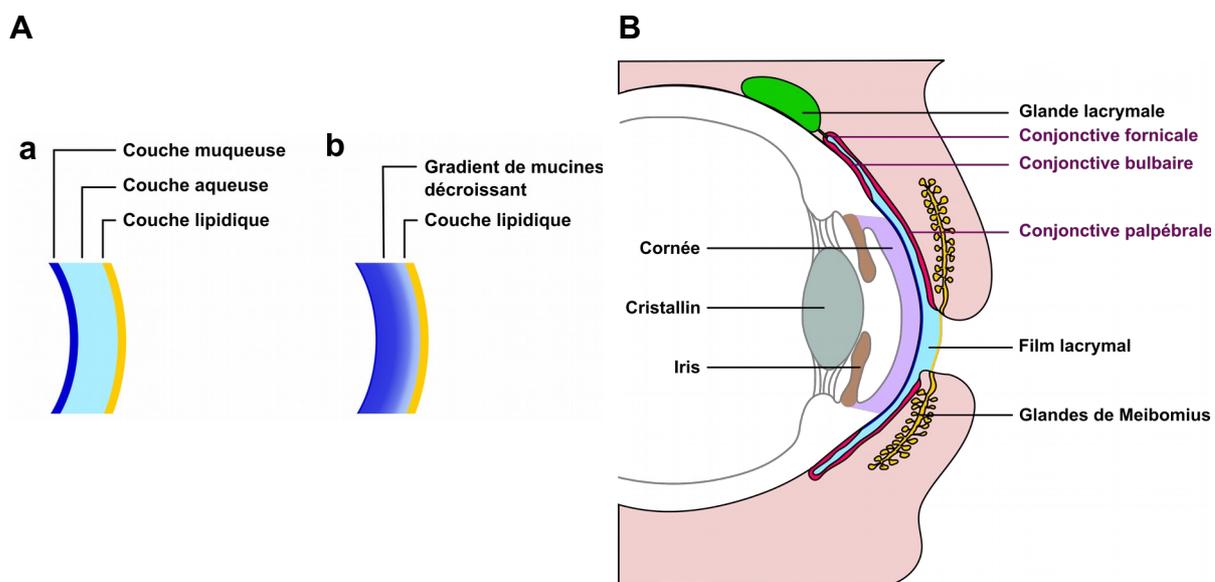


Figure 19 : Représentation schématique du film lacrymal et du segment antérieur de l'œil.

A. Le film lacrymal est classiquement représenté composé de trois couches : une couche externe lipidique, une couche interne aqueuse et une couche muqueuse adjacente à l'épithélium de surface (**a**). La frontière entre les couches aqueuses et muqueuses n'étant pas nette, il a été proposé une nouvelle représentation du film lacrymal qui serait un gel muqueux hydraté, avec un gradient de mucines qui est inversement proportionnel à la distance à la surface oculaire (**b**). Dans les deux représentations, la couche lipidique permet de limiter l'évaporation du film lacrymal.

B. La conjonctive recouvre la face postérieure des paupières (conjonctive palpébrale), forme un pli appelé sac conjonctival ou fornix (conjonctive fornicaire) et recouvre la face antérieure du globe oculaire, sauf la cornée (conjonctive bulbaire). Adapté de (Netter, 2015).

Chez l'Homme, les cellules en calice sont individuelles et leur densité varie suivant leur localisation (1000 à 56000 cellules/mm²). Le fornix est particulièrement riche en cellules en calice (**Figure 20**). Certaines cellules en calice se regroupent également pour former des glandes lacrymales accessoires : les glandes de Manz et les cryptes de Henlé (Duane et al., 2006). La couche muqueuse a un rôle d'agent hydratant, réduisant la tension de surface oculaire relativement hydrophobique, et permettant d'humidifier les cellules cornéennes et conjonctivales (DEWS, 2007a).

La partie aqueuse des larmes est produite par la glande lacrymale qui est une glande exocrine constituée de cellules acineuses et myoépithéliales. Elle est composée de deux lobes (un grand lobe orbital et un petit lobe palpébral) et ses sécrétions sont déversées à la surface de l'œil au niveau du fornix (Treuting and Dintzis, 2012).

La couche lipidique du film lacrymal est produite par les glandes de Meibomius, des glandes sébacées, qui déversent leurs sécrétions au bord des paupières (**Figure 19**) (Treuting and Dintzis, 2012). Cette couche sert à limiter l'évaporation du film lacrymal.

3.2.2 Mucines de l'œil

À la surface oculaire, il a été montré que les mucines membranaires MUC1 et MUC16 sont produites par les cellules épithéliales de la conjonctive et de la cornée et que MUC4 est principalement produite par les cellules épithéliales conjonctivales (Gipson, 2004). Les cellules en calice de la conjonctive produisent les mucines gélifiantes MUC5AC et MUC19 (Yu et al., 2008). De faibles expressions de *MUC2*, *MUC5B*, *MUC11* et *MUC15* ont également été rapportées à la surface oculaire (Gipson, 2004). Les mucines MUC1, MUC5AC, MUC5B, MUC7 et MUC19 sont également produites par les glandes lacrymales (Paulsen et al., 2004; Yu et al., 2008).

La production des mucines oculaires sembleraient être très précoce dans le développement embryonnaire. Des cellules en calice contenant des sialomucines apparaissent dès la 9^{ème} SA dans le fornix de la conjonctive (Miyashita et al., 1992).

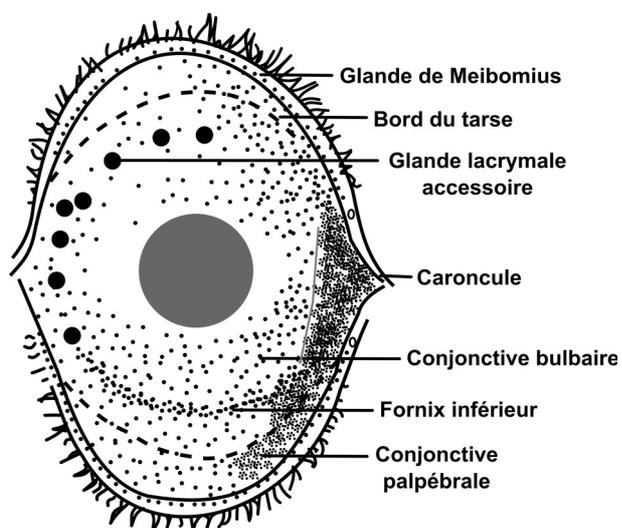


Figure 20 : Représentation schématique de la répartition des cellules à mucus de la conjonctive.

Adapté de (Lemp, 1992).

3.2.3 Segment antérieur de l'œil murin

3.2.3.1 Particularités anatomique et histologique

Les yeux des souris et des Hommes sont similaires. La principale caractéristique de l'œil de la souris est la proportion du cristallin. Alors qu'il occupe un faible volume chez l'Homme, le cristallin de la souris occupe près de 75 % du volume du globe oculaire. À l'arrière du globe oculaire se trouve la glande de Harder, une glande sébacée modifiée, qui n'est pas présente chez l'Homme. Chez la souris, on trouve deux paires de glandes lacrymales principales : une petite intra-orbitale et une extra-orbitale localisée à la base antéro-ventrale de l'oreille (Treuting and Dintzis, 2012).

Comme chez l'Homme, la conjonctive est composée de trois parties (palpébrale, fornicaire et bulbaire) et recouvre la face postérieure des paupières et la surface antérieure de l'œil. Elle recouvre également la membrane nictitante, aussi appelée troisième paupière, qui est absente chez l'Homme (Treuting and Dintzis, 2012). Alors que les cellules en calice de la conjonctive humaine sont principalement individuelles, les cellules en calice de la conjonctive de la souris sont regroupées en clusters (Gipson and Tisdale, 1997).

3.2.3.2 Mucines murines de l'œil

Les cellules de la conjonctive expriment principalement *Muc5ac*, ainsi que *Muc1*, *Muc4* et très faiblement *Muc5b* (Marko et al., 2014). Contrairement à l'Homme, *Muc19* n'est pas exprimé dans l'œil de la souris (Das et al., 2010).

3.3 Oreille moyenne

3.3.1 Rappels anatomique et histologique

Chez l'Homme, l'oreille est divisée en trois parties : l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne (**Figure 21**). Les oreilles externe et interne sont dépourvues de cellules caliciformes qui sont retrouvées uniquement dans l'oreille moyenne et la trompe d'Eustache.

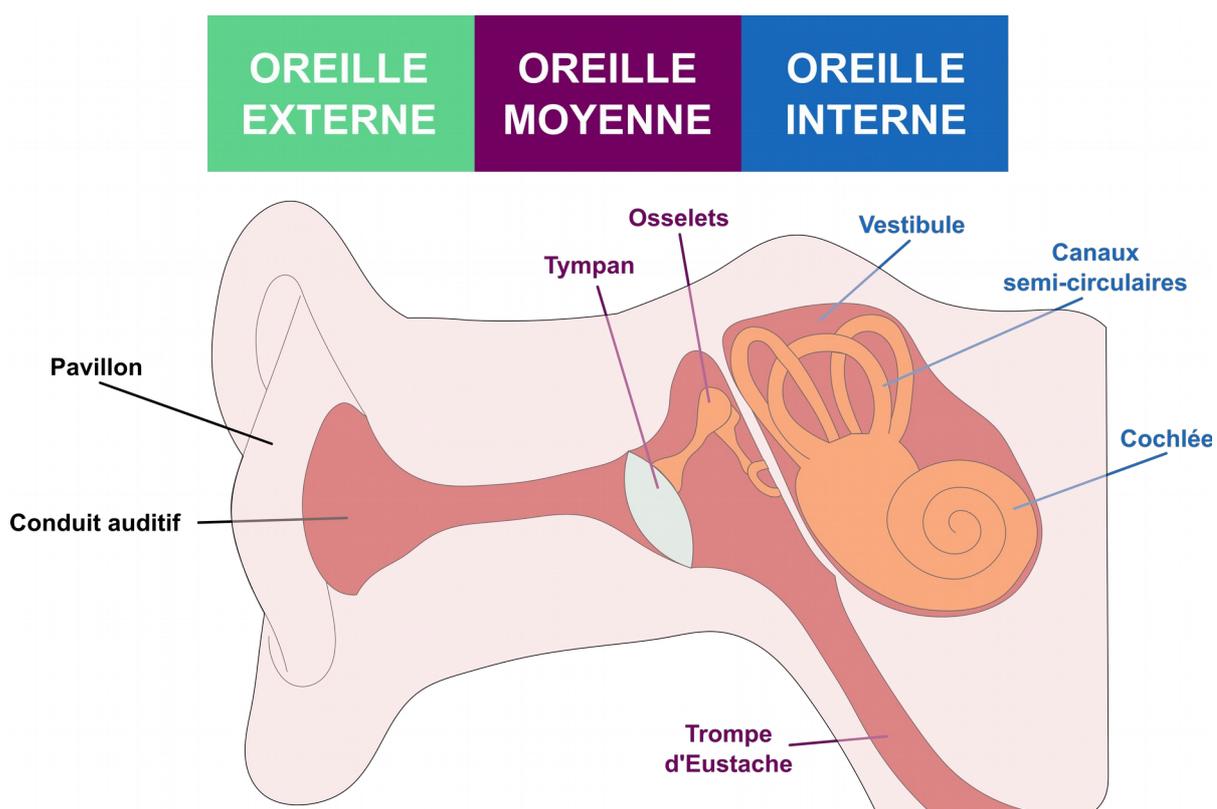


Figure 21 : Représentation schématique de l'oreille.

Adapté de (Télé-Québec, 2016).

L'oreille moyenne (bulle tympanique et face interne du tympan) est tapissée d'un épithélium de type respiratoire, composé de cellules ciliées et de quelques cellules à mucus. Chez l'Homme, la face interne du tympan est recouverte d'un épithélium respiratoire modifié, composé d'une couche de cellules cuboïdes dépourvue de cellules ciliées et de cellules en calice. La trompe d'Eustache est recouverte d'un épithélium cilié pseudostratifié avec de nombreuses cellules caliciformes (Treuting and Dintzis, 2012).

3.3.2 Mucines de l'oreille moyenne

En conditions normales, du mucus est produit en continu dans l'oreille moyenne. Il est évacué de la cavité tympanique par la trompe d'Eustache vers le nasopharynx. Son rôle est d'empêcher les bactéries de remonter par la trompe d'Eustache et d'éviter l'adhésion des bactéries sur l'épithélium (Kubba et al., 2000). Dans la trompe d'Eustache, il a été montré que les mucines gélifiantes MUC5B et MUC5AC sont produites à des quantités similaires. MUC5AC est uniquement produite par l'épithélium de surface alors que MUC5B est produite à la fois par l'épithélium de surface et des glandes de la sous-muqueuse. Les mucines membranaires MUC1 et MUC4 sont également produites par l'épithélium de la trompe d'Eustache mais en plus faible quantité. Dans l'oreille moyenne, seule MUC5B est produite, en faible quantité, principalement autour de l'orifice de la trompe d'Eustache et les zones adjacentes (Lin et al., 2001). Il est possible que d'autres mucines plus récemment identifiées soient également produites dans l'oreille moyenne. En effet, il a été montré *in vitro* que les cellules HMEEC-1 (lignée immortalisée de cellules épithéliales d'oreille moyenne humaine) expriment les gènes codant les mucines MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC8, MUC9, MUC11, MUC13, MUC15, MUC16, MUC18, MUC19 et MUC20 (Kerschner, 2007).

3.3.3 Oreille moyenne murine

3.3.3.1 Particularités anatomique et histologique

Comme celle de l'Homme, l'oreille de la souris est divisée en trois parties : l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne, qui ont les mêmes fonctions

chez les deux espèces. L'histologie des différents tissus de l'oreille est la même, cependant quelques différences anatomiques sont à noter. Contrairement au pavillon de l'oreille humaine qui a de nombreux plis, le cartilage de pavillon de l'oreille de la souris est très peu plissé. À la base de ce cartilage se trouve la glande de Zymbal (glande sébacée modifiée) qui est absente chez l'Homme. Contrairement à la chaîne des osselets qui est libre en suspension dans la cavité de l'oreille moyenne chez l'Homme, la chaîne des osselets est en partie fusionnée avec la membrane du tympan chez la souris, ce qui limite sa mobilité. Cette organisation de type microtypique permet à la souris une meilleure audition des sons à haute fréquence que l'Homme (Treuting and Dintzis, 2012).

3.3.3.2 Mucines murines de l'oreille moyenne

Les gènes *Muc1*, *Muc2*, *Muc3*, *Muc4*, *Muc5ac*, *Muc5b*, *Muc9*, *Muc13*, *Muc15*, *Muc16*, *Muc18*, *Muc19* et *Muc20* sont exprimés dans l'oreille moyenne de souris (Kerschner et al., 2010).

3.4 Glandes salivaires

3.4.1 Rappels anatomique et histologique

Le système salivaire est composé de trois paires de glandes salivaires principales (les parotides, les sous-mandibulaires et les sublinguales) chez l'Homme et de nombreuses glandes mineures ou accessoires (plusieurs centaines disséminées dans l'ensemble des muqueuses orales sauf les gencives, le tiers antérieur du palais, le raphé palatin et la partie centrale de la face dorsale de la langue) (Gauzeran, 2011). Les trois glandes salivaires principales ont la même structure anatomique : elles sont composées d'acini reliés entre eux par des canaux intercalés, qui se jettent dans les canaux intra- puis inter-lobulaires, qui eux-mêmes se regroupent dans les canaux excréteurs qui se vident dans la cavité orale (Treuting and Dintzis, 2012).

Toutes les glandes sécrètent de la salive qui participe à la digestion, au goût, à la protection et à la lubrification des dents et de la cavité orale (Treuting and Dintzis, 2012). La répartition quantitative de la production de salive est la suivante : sou-

mandibulaires 60 %, parotides 25 %, glandes salivaires mineures 10 % et sublinguales 5 % (Gauzeran, 2011). Suivant la glande productrice, les sécrétions salivaires peuvent être séreuses, muqueuses ou mixtes. Les parotides, qui sont les plus grosses glandes salivaires chez l'Homme, sont composées d'acini séreux. Les glandes sous-mandibulaires sont composées d'acini mixtes, avec des cellules séreuses et muqueuses. Les glandes sublinguales sont principalement constituées d'acini muqueux (Treuting and Dintzis, 2012). Les glandes salivaires accessoires sont essentiellement constituées d'acini muqueux (Gauzeran, 2011). Les canaux excréteurs des glandes sous-mandibulaires et sublinguales s'ouvrent dans la cavité orale près des incisives, alors que l'ouverture du canal excréteur des parotides est près des molaires (**Figure 22**) (Treuting and Dintzis, 2012).

3.4.2 Mucines des glandes salivaires et de l'œsophage

Les deux mucines majeures identifiées dans la salive humaine sont MUC5B et MUC7 (Tabak et al., 1982). MUC5B est exprimée et sécrétée par les acini muqueux des glandes sous-mandibulaires (Audie et al., 1993) et sublinguales (Piludu et al., 2003; Troxler et al., 1997), ainsi que par les glandes salivaires mineures palatines et labiales (Cohen et al., 1990). MUC5B est présente en plus grande quantité dans la partie antérieure de la langue (Pramanik et al., 2010). Ceci est dû au fait que les glandes salivaires mineures sécrètent des volumes différents suivant leur localisation. Il a ainsi été montré que l'épaisseur de salive est plus importante sur la partie antérieure de la langue (44,4 μm) que sur les autres surfaces buccales (par exemple 7,3 μm sur la partie antérieure du palais dur et 21,6 μm sur le palais mou) (Won et al., 2001). Dans la salive, MUC5B est retrouvée sous différentes glycoformes (Veerman et al., 2003).

Il a également été montré que MUC4 est exprimée dans les glandes sous-mandibulaires (Liu et al., 1998) et MUC19 dans les glandes salivaires sublinguales et sous-mandibulaires (Chen et al., 2004). Cependant, la présence de MUC19 dans la salive humaine reste incertaine alors que sa présence a été montrée dans la salive de nombreux mammifères (Rousseau et al., 2008). Il a également été montré que MUC1 est produite par les surfaces labiales et buccales (Pramanik et al., 2010).

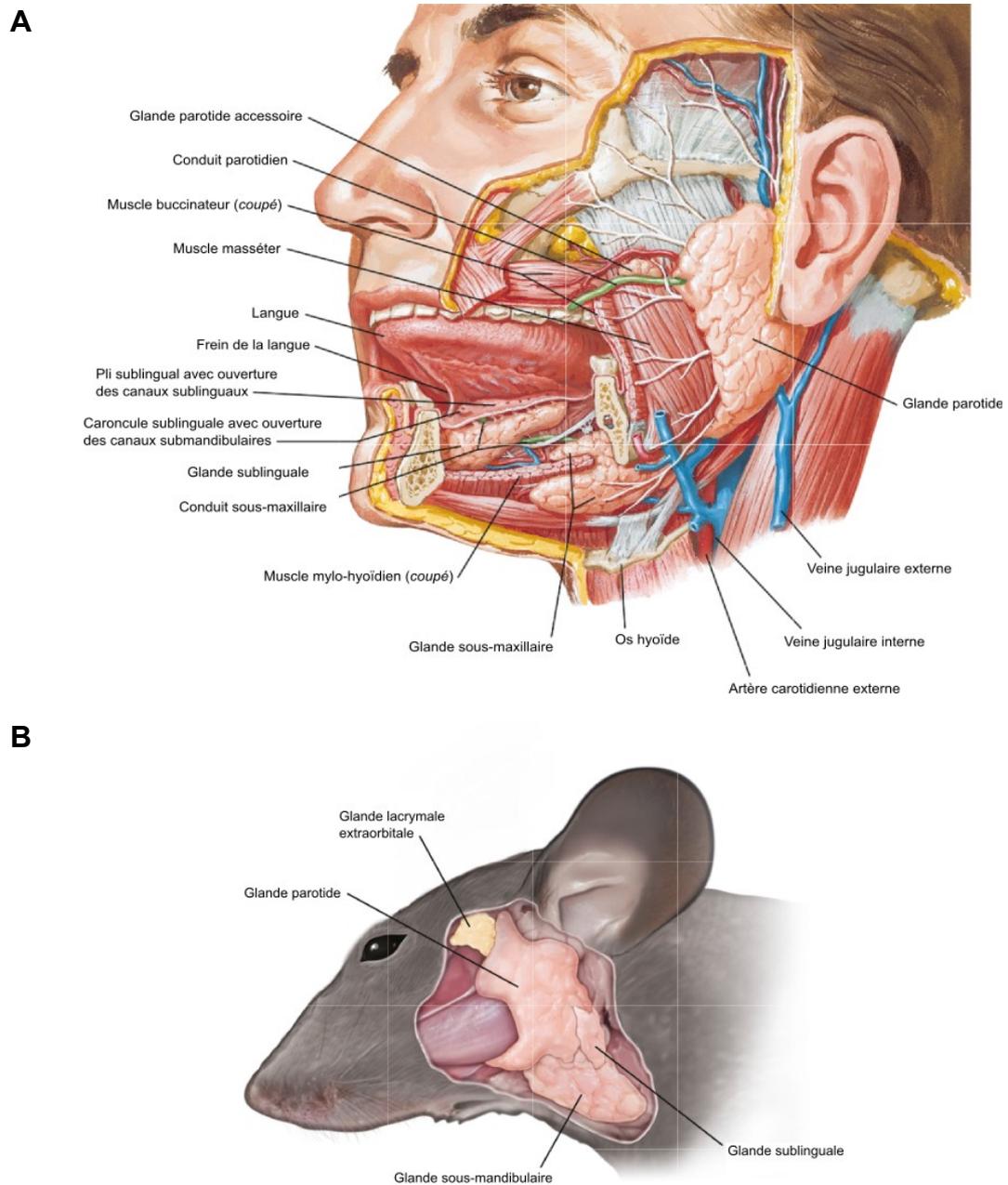


Figure 22 : Représentation schématique de la région cervicale de l'Homme et de la souris.

Les glandes salivaires sont dans la cavité buccale chez l'Homme (**A**) alors qu'elles sont en dehors chez la souris (**B**). Adapté de (Treuting and Dintzis, 2012).

Les mucines sécrétées par les glandes salivaires participent également à la formation du mucus qui recouvre l'épithélium œsophagien. Il est également produit par les glandes de la sous-muqueuse de l'œsophage. La coloration au bleu alcian-acide périodique de Schiff (AB-PAS) montre que les glandes de la sous-muqueuse de l'œsophage contiennent des mucines neutres et acides. Il a été montré que MUC5B est la mucine majeure produite et sécrétée par les glandes de la sous-muqueuse de l'œsophage en situation normale (Arul et al., 2000).

3.4.3 Glandes salivaires murines

3.4.3.1 Particularités anatomique et histologique

Contrairement à l'Homme, les glandes salivaires principales de la souris ne sont pas situées dans la cavité buccale (**Figure 22**). Comme chez l'Homme, on trouve trois paires de glandes salivaires principales (les parotides, les sous-mandibulaires aussi appelée sous-maxillaires, et les sublinguales) et de nombreuses glandes mineures (dans le palais dur, le palais mou, la muqueuse buccale, la partie postérieure de la langue et la muqueuse sous-linguale) (Das et al., 2010; Treuting and Dintzis, 2012). Contrairement à l'Homme, la glande salivaire sous-maxillaire est la plus grosse. Un dimorphisme sexuel de la glande sous-maxillaire est aussi observé. Chez les mâles, les cellules bordant les canaux de la glande sous-maxillaire sont grosses, de forme cylindrique et contiennent de nombreux granules, alors que, chez les femelles, les cellules sont plus petites avec peu de granules distincts. La glande sous-maxillaire peut être jusqu'à deux fois plus grosse chez les mâles que chez les femelles (Treuting & Dintzis 2012).

3.4.3.2 Mucines murines salivaires

Chez la souris, les mucines gélifiantes exprimées sont *Muc2* (faiblement), *Muc5ac*, *Muc5b* et *Muc19* (Das et al., 2010).

3.5 Tractus gastro-intestinal

3.5.1 Mucines gastriques humaines

MUC5B n'est pas exprimé par l'épithélium gastrique adulte ; cependant, une

expression transitoire de *MUC5B* a été observée au cours du développement embryonnaire.

Dans l'estomac, l'expression des gènes de mucines commence dès la 8^{ème} SA avec l'expression des mucines *MUC1*, *MUC4*, *MUC5AC*, *MUC5B* et *MUC6*. Ces gènes sont exprimés avant la différenciation des cellules épithéliales. Les mucines *MUC5AC* et *MUC6* sont les mucines les plus exprimées dans l'estomac embryonnaire et foetal. A la 8^{ème} SA, le gène *MUC5B* est exprimé uniformément dans l'épithélium. Puis, de la 18^{ème} à la 27^{ème} SA, *MUC5B* est détecté dans l'épithélium de surface du fundus et dans les glandes de l'antra (Buisine et al., 2000b).

3.5.2 Mucines gastriques murines

Chez la souris, *Muc5ac* et *Muc6* sont les principales mucines gélifiantes gastriques (Gouyer et al., 2010). La mucine *Muc5b* est produite au 11,5^{ème} jour du développement embryonnaire dans l'estomac mais n'est plus exprimée chez la souris après la naissance (Valque, 2011).

3.6 Vésicule biliaire

3.6.1 Rappels anatomique et histologique

La vésicule biliaire est la poche de stockage de la bile produite par les hépatocytes du foie. Chez l'Homme, elle est située sous le lobe droit du foie. La libération de la bile dans l'intestin grêle, via le canal biliaire, se fait sous l'influence de la cholécystokinine (enzyme digestive). L'épithélium tapissant la paroi interne de la vésicule biliaire est de type cylindrique simple, avec la présence de diverticules qui sont des invaginations de l'épithélium de surface (Treuting and Dintzis, 2012).

3.6.2 Mucines de la vésicule biliaire

Au cours du développement embryonnaire humain, *MUC5B* est exprimé par l'épithélium de surface et des replis profonds de l'épithélium de la vésicule biliaire dès la 18^{ème} SA, et son expression persiste chez l'adulte (Buisine et al., 2000a). A l'âge adulte, les gènes *MUC1*, *MUC2*, *MUC3*, *MUC5AC*, *MUC5B* et *MUC6* sont exprimés dans les voies biliaires (Vandenhoute et al., 1997), avec une prédominance

de MUC5B (Van Klinken et al., 1998).

3.6.3 Vésicule biliaire murine

3.6.3.1 Particularités anatomique et histologique

La vésicule biliaire de la souris fait saillie au niveau de l'isthme central du lobe médian du foie. Histologiquement, elle est similaire à celle de l'Homme ; on note juste une diminution de la quantité de muscles lisses et de tissu conjonctif et un épithélium de surface plutôt cuboïde que cylindrique (Treuting and Dintzis, 2012).

3.6.3.2 Mucines murines biliaires

Chez la souris, les gènes *Muc1*, *Muc3*, *Muc4*, *Muc5ac* et *Muc5b* sont exprimés dans la vésicule biliaire normale (Valque et al., 2011; Wang et al., 2004).

3.7 Cervix

3.7.1 Rappels anatomique et histologique

Le système génital féminin est dynamique, avec des modifications morphologiques selon le statut hormonal pendant le cycle menstruel, la grossesse et la ménopause.

L'utérus humain correspond à une cavité triangulaire unique reliée au vagin par le cervix, aussi appelé col de l'utérus (**Figure 23**). L'épithélium recouvrant les parois de l'utérus, l'endomètre, subit des modifications morphologiques en fonction du cycle menstruel, composé des phases proliférative (folliculaire), sécrétrice (lutéale) et menstruelle. L'épithélium endométrial se transforme ensuite en un épithélium cylindrique muqueux-sécrétant au niveau de l'endocervix. L'ectocervix, la portion du cervix exposée dans le vagin, est recouvert par un épithélium squameux lisse et continu à l'épithélium squameux vaginal (Treuting and Dintzis, 2012).

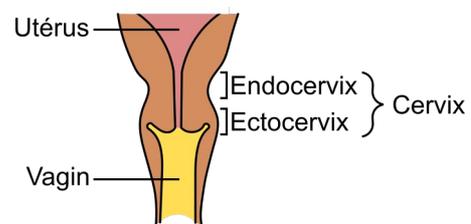


Figure 23 : Représentation schématique du cervix.

3.7.2 Mucines du mucus cervical

Les mucines *MUC1*, *MUC2*, *MUC4*, *MUC5AC*, *MUC5B*, *MUC6* et *MUC8* sont exprimées dans l'endocervix normal (partie supérieure du col de l'utérus), avec une expression relativement faible de *MUC2* et *MUC5AC* (Audie et al., 1995; Gipson et al., 1997; Hebbar et al., 2005). Une prédominance des mucines *MUC4* et *MUC5B* a été montrée dans l'endocervix, avec une corrélation inverse entre le niveau d'expression de ces deux mucines et le taux de progestérone suggérant une régulation hormonale de la production de ces mucines (Gipson et al., 1999). Il a été montré une variation de l'expression de *MUC5B* au cours du cycle, avec un pic de production de *MUC5B* au moment de l'ovulation (Gipson et al., 2001) qui coïncide avec le changement d'organisation du mucus qui devient globulaire au moment de l'ovulation, alors qu'il a une structure filamenteuse lors des périodes pré- et post-ovulatoires (Brunelli et al., 2007). De plus, des modifications de glycosylation des mucines du mucus cervical ovulatoire ont été mises en évidence (Andersch-Björkman et al., 2007).

3.7.3 Tractus génital murin

3.7.3.1 Particularités anatomique et histologique

Chez la souris, le cycle œstral dure 4 à 6 jours et est divisé en quatre phases : le proestrus, l'œstrus, le metestrus et le diestrus. L'utérus murin est composé de deux cornes qui se rejoignent au niveau du corps utérin. La cavité utérine est séparée en deux par une cloison. L'épithélium cylindrique recouvrant l'utérus se transforme en épithélium squameux stratifié à mesure qu'on se rapproche du cervix, et cet épithélium est continu à la muqueuse vaginale (Treuting and Dintzis, 2012).

3.7.3.2 Mucines murines dans le tractus génital

Chez la souris, il a été montré que les mucines *Muc1*, *Muc4* et *Muc5b* sont produites dans le tractus reproducteur (utérus, cervix et/ou vagin) (Lange et al., 2003; Pemberton et al., 1992; Valque et al., 2011).

Seule l'expression de *Muc1* en fonction du cycle œstral a été étudiée. Il a été montré que *Muc1* est exprimée uniquement dans l'utérus avec une forte expression

pendant les phases de pro-estrus et d'estrus et une diminution en diestrus. Lors de la gestation, Muc1 est à peine détectable dans l'utérus jusqu'au 4^{ème} jour de gestation (moment de l'attachement du blastocyte) alors que son expression est maintenue dans le cervix et le vagin (Surveyor et al., 1995).

3.8 Conclusion

Quel que soit l'organe considéré, le profil d'expression de MUC5B/Muc5b est très conservé entre l'Homme et la souris, même si la présence de la protéine n'a pas encore été vérifiée dans tous les organes chez la souris. L'expression précoce de MUC5B, dès le développement embryonnaire, suggère un rôle important de la mucine dans le maintien de l'homéostasie dans les tissus où la mucine est produite.

Des anomalies de l'expression de MUC5B ont été mises en évidence ou suggérées dans de nombreuses pathologies touchant les muqueuses sécrétrices. Ces anomalies d'expression ou de production de MUC5B/Muc5b sont présentées dans le chapitre suivant.

4 MUC5B et pathologies

4.1 Anomalies des mucines

4.1.1 Anomalies de glycosylation des mucines

De nombreuses anomalies de glycosylation des mucines ont été décrites dans les processus de cancérisation des cellules, mais elles peuvent également intervenir dans d'autres pathologies non cancéreuses.

Les glycosylations aberrantes se traduisent le plus souvent par un raccourcissement des chaînes glycaniques ou par une glycosylation terminée de manière incorrecte (Kim et al., 1996). Une synthèse de nouveaux motifs glycaniques qui entraînent l'extension des chaînes glycaniques et une hypersialylation des mucines peuvent également avoir lieu sur les cellules tumorales (Guillot et al., 2004).

Ces anomalies de glycosylation des mucines entraînent : une augmentation de l'expression de certains antigènes par rapport aux tissus normaux, une réapparition de l'expression d'antigènes normalement exprimés lors du développement embryonnaire (Gipson et al., 2001), une expression d'antigènes incompatibles avec le groupe sanguin de l'individu, une disparition de l'expression d'antigènes normalement exprimés en situation saine et une expression de nouveaux antigènes (Kim et al., 1996). Ces anomalies touchent à la fois les chaînes O- et N-glycaniques (Dwek et al., 2001; Kanska et al., 1998). Par exemple, il a été montré que la glycosylation incomplète des mucines conduit à l'apparition des antigènes Tn (GalNac α 1-O-Ser/Thr) et T (Gal β 1,3-Tn) dans plus de 90 % des adénocarcinomes et de leurs métastases (Itzkowitz et al., 1989; Kim et al., 1996), et que l'antigène Tn sialylé est également exprimé dans les adénocarcinomes mammaires, pulmonaires, ovariens et dans la majorité des cancers gastriques, pancréatiques et œsophagiens (Pinho et al., 2007).

4.1.2 Dérégulation de l'expression des mucines

Des anomalies d'expression des mucines ont été rapportées dans de nombreuses pathologies : soit une augmentation ou une diminution de l'expression des mucines, soit une apparition ou une réapparition de l'expression des mucines. Par exemple, il a été montré une augmentation de l'expression de *MUC1* dans la plupart des carcinomes (sein, poumon, pancréas...) (Situ et al., 2011; Taylor-Papadimitriou et al., 1999). Au contraire, dans le cas de sécheresses oculaires, les expressions de *MUC1* et de *MUC5AC* sont fortement diminuées (Mantelli et al., 2013). Dans des otites moyennes chroniques, il a été montré une production anormale de la mucine membranaire *MUC4* qui n'est pas exprimée par l'oreille moyenne en conditions normales (Lin et al., 2003, 2001). Il a été montré une réapparition de l'expression de *MUC5B* dans certains adénocarcinomes gastriques, alors que cette mucine n'est exprimée dans l'estomac que transitoirement au cours du développement embryonnaire (Buisine et al., 2000b).

4.2 MUC5B et cancers

4.2.1 Rôle des mucines dans le cancer

Les mucines membranaires et sécrétées à la surface des cellules tumorales masquent les antigènes tumoraux, ce qui permet à la cellule tumorale d'échapper à la surveillance du système immunitaire. Les mucines produites à la surface des cellules cancéreuses protègent donc celles-ci du milieu extérieur. De plus, la couche de mucus, établie à la surface de la cellule tumorale, lui confère une protection vis-à-vis des composés cytotoxiques et des agents utilisés lors des chimiothérapies, et pourrait servir de réservoir aux différentes molécules telles que les facteurs de croissance et les cytokines (Hollingsworth and Swanson, 2004) (**Figure 24**).

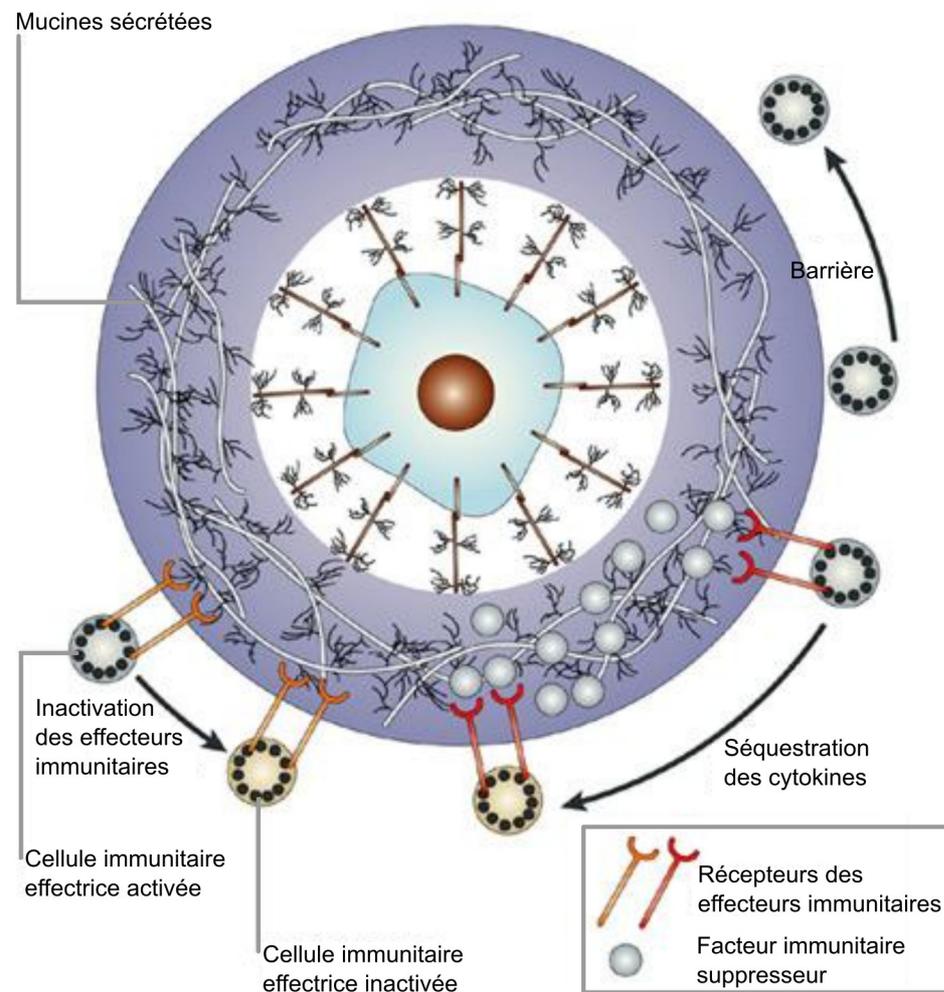


Figure 24 : Protection de la cellule tumorale grâce à la sécrétion de mucines à sa surface.

Adapté de (Hollingsworth and Swanson, 2004).

Alors que les mucines sont uniquement retrouvées au pôle apical des cellules épithéliales en situation normale, on les retrouve sur toute la surface des cellules tumorales, ce qui crée un encombrement stérique empêchant les interactions cellulaires. Ceci permet aux cellules tumorales de se détacher les unes des autres et de disséminer au travers de l'organisme. La sur-production de motifs glycaniques sialylés à la surface des cellules tumorales leur permet de traverser la paroi endothéliale en se liant aux sélectines et ainsi de passer dans la circulation sanguine et coloniser d'autres organes (Kim et al., 1996).

Le domaine extracellulaire des mucines membranaires est également capable d'interagir avec des récepteurs et ainsi de moduler les interactions avec d'autres cellules. Par exemple, le domaine extracellulaire de MUC1 est capable de se lier à la protéine ICAM-1, exprimée à la surface des lymphocytes et monocytes et ainsi d'inhiber l'action des cellules du système immunitaire (Hollingsworth and Swanson, 2004).

4.2.2 MUC5B et cancers épithéliaux

4.2.2.1 Cancer du sein

4.2.2.1.1 Chez la femme

Le cancer du sein représente la seconde cause de mortalité chez la femme, juste après le cancer du poumon. Le développement du cancer du sein se fait en différentes étapes : hyperplasie ductale, hyperplasie atypique ductale, carcinome *in situ* et carcinome invasif (Mukhopadhyay et al., 2011).

Une dérégulation de l'expression des gènes *MUC1*, *MUC2*, *MUC4*, *MUC5AC*, *MUC5B*, *MUC6* et *MUC16* a été observée dans le cancer mammaire (Mukhopadhyay et al., 2011). *MUC5B* a été détecté par RT-PCR dans des tumeurs primitives du sein, alors que *MUC5B* n'est pas exprimé dans le tissu mammaire normal (Berois et al., 2003). La présence anormale de la protéine a été confirmée par immunohistochimie. *MUC5B* est retrouvée dans 81 % des tumeurs primitives et son marquage est principalement cytoplasmique et péri-nucléaire dans les cellules tumorales. *MUC5B* est également retrouvée dans le mucus extracellulaire de carcinomes mucineux ou

colloïdes. Au stade de carcinome *in situ*, le marquage de MUC5B est cytoplasmique et retrouvé dans 50 % des prélèvements. Il a également été montré la présence de MUC5B dans l'épithélium d'apparence normale prélevé à proximité de la tumeur dans 42 % des cas (Sóñora et al., 2006).

4.2.2.1.2 Cancer mammaire murin

Des travaux antérieurs du laboratoire ont montré que Muc5b (ARN et protéine) est détectée dans toutes les tumeurs mammaires prélevées chez des souris MMTV-Hras, une lignée transgénique murine qui développe spontanément des tumeurs mammaires, alors que Muc5b n'est pas produite (ARN et protéine) dans le tissu mammaire normal de souris de type sauvage (Valque et al., 2011). Pour étudier son rôle dans la tumorigenèse, le laboratoire a transfecté des cellules MCF-7, cellules tumorales mammaires humaines, avec un plasmide bicistronique codant une mini-mucine Muc5b couplée à la luciférase. Il a été montré que la mini-mucine Muc5b favorise la prolifération cellulaire et l'invasion de cellules de tumeurs mammaires. Les cellules MCF-7 ont ensuite été greffées chez des souris immunodéficientes. Ces expériences montrent que la mini-mucine Muc5b stimule la croissance des tumeurs mammaires et la dissémination métastatique (Valque et al., 2012).

4.2.2.2 Cancers gastriques et colorectaux

4.2.2.2.1 Chez l'Homme

Alors que MUC5B n'est exprimée que transitoirement dans l'estomac au cours du développement embryonnaire mais pas à l'âge adulte, il a été montré la réapparition de l'expression de MUC5B dans certains carcinomes gastriques (Buisine et al., 2000b). Dans une étude portant sur l'évaluation de 50 carcinomes gastriques, il a été montré que MUC5B est exprimée dans 22 % des cas mais n'aurait pas d'impact sur la survie des patients (Pinto-de-Sousa et al., 2004). Il a également été rapporté l'expression de MUC5B dans des tumeurs colorectales (Walsh et al., 2013).

4.2.2.2.2 Chez la souris

Comme chez l'Homme, la mucine Muc5b n'est pas produite dans l'estomac sain après la naissance. Elle n'est produite que transitoirement au cours du

développement embryonnaire (Valque, 2011). Aucune donnée de la littérature ne montre une expression de *Muc5b* dans des modèles de cancers gastriques ou colorectaux.

4.2.2.3 Cancer de l'endomètre

4.2.2.3.1 Chez la femme

Alors que *MUC1*, *MUC5B* et *MUC8* sont déjà fortement exprimés en situation normale dans le cervix et l'endocervix, il a été montré une sur-expression de ces trois mucines dans des adénocarcinomes de l'endomètre. Par contre, dans le cas de tumeurs cervicales, il a été montré une augmentation de l'expression de *MUC1*, sans changement de l'expression de *MUC5B* et *MUC8* (Hebbar et al., 2005).

4.2.2.3.2 Chez la souris

La seule étude qui montre la production de *Muc5b* dans le tractus reproducteur femelle murin émane du laboratoire (Valque, 2011). Aucune donnée n'a été publiée montrant une expression ou production anormale chez la souris dans des modèles pathologiques.

4.3 MUC5B et pathologies respiratoires

Une sur-expression de *MUC5B* a été décrite dans un grand nombre de maladies respiratoires, notamment la mucoviscidose, la fibrose pulmonaire idiopathique, la bronchopneumopathie chronique obstructive, la panbronchiolite et l'asthme, ainsi que dans les sinusites chroniques et les polypes nasaux.

4.3.1 La mucoviscidose

4.3.1.1 Définition

La mucoviscidose, aussi appelée fibrose kystique (Cystic Fibrosis ou CF), est la maladie autosomale récessive la plus fréquente dans les populations d'origine caucasienne et est due à des mutations sur le gène *CFTR* (pour « Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator »). Depuis la découverte du gène *CFTR* en 1989, plus de 1500 mutations différentes ont été découvertes sur le gène dont la plus fréquente (70 % des cas) est la mutation $\Delta F508$ qui correspond à la perte d'un triplet dans

l'exon 10 codant la phénylalanine 508 (Rowe et al., 2005).

La mucoviscidose atteint essentiellement les tissus épithéliaux exocrines (tissu respiratoire, pancréas, foie, intestin, glandes sudoripares et voies génitales). Cependant, les modifications les plus importantes impliquent les voies respiratoires où l'absence du canal CFTR conduit à la formation d'un gel de mucus épais, visqueux et stagnant qui obstrue les voies respiratoires et prédispose à des infections chroniques par des bactéries opportunistes (Ratjen and Döring, 2003).

En Europe, l'incidence de la mucoviscidose est d'environ 1 pour 2000 nouveau-nés. Avec le diagnostic précoce de la maladie et l'amélioration des thérapies, l'espérance de vie des patients a dépassé les 30 ans. Cependant, cet allongement de la durée de vie s'accompagne du développement de nombreuses comorbidités dont des complications pancréatiques, gastro-intestinales et hépatiques ainsi que de l'ostéoporose (Munck et al., 2015; Paccou et al., 2010).

4.3.1.2 La protéine CFTR

La protéine CFTR est une protéine transmembranaire de 1480 aa localisée au pôle apical des cellules épithéliales du tractus intestinal, des canaux pancréatiques, des canaux sudoripares, des canaux biliaires, du canal déférent et de l'appareil respiratoire (Davis, 2006). Le canal CFTR est un membre de la famille des transporteurs membranaires ABC (pour « ATP Binding Cassette ») qui permet aux cellules épithéliales de sécréter des ions, dont les ions chlorure et bicarbonate. Cette sécrétion a principalement lieu dans les cellules séreuses et les glandes de la sous-muqueuse. Dans le cas de la mucoviscidose, le canal CFTR n'est pas ou peu fonctionnel, ce qui conduit à un défaut des mouvements ioniques au sein des épithéliums (Clunes and Boucher, 2007).

4.3.1.3 Physiopathologie

4.3.1.3.1 Signes cliniques

Les infections pulmonaires chroniques sont la principale cause de mortalité des patients. Ces infections induisent une réponse inflammatoire exacerbée qui conduit à la destruction progressive du tissu pulmonaire, à la fibrose et finalement à

la détresse respiratoire (Rowe et al., 2005). Les poumons sont initialement colonisés par *Haemophilus influenzae* puis par *Staphylococcus aureus*. La colonisation par *Pseudomonas aeruginosa* est plus tardive mais associée à un déclin beaucoup plus rapide des fonctions respiratoires car cette bactérie a la particularité de développer un phénotype mucoïde et a la capacité de former des biofilms, ce qui la rend résistante aux traitements antibiotiques utilisés (Hauser et al., 2011).

Il a également été observé une trachéomalacie, consistant en un rétrécissement expiratoire des parois trachéales, chez 15 % des patients mucoviscidosiques pédiatriques, associée à des manifestations plus sévères de la mucoviscidose (Fischer et al., 2014). Chez les patients adultes, la prévalence de la trachéomalacie est d'environ 70 % (McDermott et al., 2009).

Dans environ 10 % des cas, le symptôme clinique le plus précoce de la maladie est l'iléus méconial, qui est une obstruction intestinale due à des sécrétions visqueuses qui bouchent l'iléon. L'iléus méconial peut déjà exister *in utero* ou se manifester dans les 48 premières heures de vie, mais peut également avoir lieu en dehors de la vie néonatale (Davis and di Sant'Agnesse, 1984).

La plupart des problèmes gastro-intestinaux rencontrés chez les patients atteints de la mucoviscidose sont dus à une atteinte pancréatique. Les sécrétions pancréatiques obstruent les canaux pancréatiques à cause de leur hyperviscosité, conduisant à une insuffisance pancréatique exocrine retrouvée chez 90 % des patients (Ratjen and Döring, 2003). Les enzymes digestives ne sont plus déversées dans l'intestin et vont causer la lyse du tissu puis la fibrose pancréatique. La déficience en enzymes pancréatiques entraîne un retard de croissance pondérale dû à une mauvaise absorption des protéines, graisses et vitamines (Grossman and Grossman, 2005). De plus, environ 10 % des patients atteints de la mucoviscidose présentent une insuffisance pancréatique endocrine causée par la destruction des îlots de Langerhans conduisant à un diabète insulino-dépendant (Ratjen and Döring, 2003). Avec l'allongement de la durée de vie, la probabilité pour un patient mucoviscidosique de développer un diabète est aujourd'hui de 50 % (Onady and Stolfi, 2016).

Des problèmes au niveau de la vésicule biliaire sont également retrouvés chez plus de 40 % des patients. L'obstruction des canaux biliaires par les sécrétions de mucus conduisent à une hyperplasie et à une hyperprolifération des canaux biliaires ainsi qu'à une inflammation conduisant à une fibrose hépatique pouvant évoluer jusqu'à la cirrhose (Ratjen and Döring, 2003).

Une autre complication de la mucoviscidose, liée à l'amélioration de la durée de vie des patients, est l'ostéoporose et le risque accru de fracture vertébrale. Les maladies osseuses touchent 20 % des patients adolescents et 55-65 % des patients de 45 ans et plus. Elles sont une complication commune et grave et ont été corrélées à une sévérité importante de la mucoviscidose (Jacquot et al., 2016).

Presque tous les hommes atteints de la mucoviscidose sont stériles à cause d'une absence ou d'une atrésie des canaux déférents provoquée par la présence d'un mucus épais et visqueux. Chez la femme, il a été rapporté quelques anomalies du mucus cervical pouvant conduire également à des problèmes de fertilité (Ratjen and Döring, 2003).

4.3.1.3.2 Inflammation

Les patients mucoviscidosiques ont des taux anormalement élevés de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α (Coyne et al., 2002), l'IL1, l'IL6 et l'IL8 (Al-Turkmani et al., 2007). Cette inflammation est très précoce. En effet, il a été rapporté une expression de protéines pro-inflammatoires dans les poumons de fœtus âgés de 24 SA (Verhaeghe et al., 2007) et un nombre plus élevé de macrophages dans les poumons de fœtus mucoviscidosiques de 21 SA par rapport aux poumons de fœtus non-atteints (Hubeau et al., 2001). La présence de molécules inflammatoires et de neutrophiles a également été mise en évidence chez des enfants mucoviscidosiques dont les poumons n'ont pas encore été colonisés par des bactéries (Al-Turkmani et al., 2007).

Chez les patients, il existe un déséquilibre dans le métabolisme des acides gras polyinsaturés (AGPI) avec une altération dans la composition membranaire en AGPI. Il a été rapporté une augmentation du ratio AGPI de la série (n-6) / AGPI de la

série (n-3) avec une augmentation d'acide arachidonique (AA) et une diminution d'acide docosahexaénoïque (DHA) (Freedman et al., 2004). Or, les AGPI (n-3), comme le DHA, ont une activité anti-inflammatoire alors que les AGPI (n-6), dont l'AA, ont une activité pro-inflammatoire (Al-Turkmani et al., 2007; Freedman et al., 1999). Ce déséquilibre lipidique conduit donc à augmenter la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires, ce qui tend à exacerber la réponse inflammatoire (Freedman et al., 1999).

4.3.1.4 Anomalies du mucus

Chez les patients mucoviscidosiques, les premières lésions pulmonaires observées sont une dilatation et une hyperplasie des glandes de la sous-muqueuse dans les bronches et une métaplasie des cellules à mucus dans les bronchioles qui va rapidement conduire à la formation de bouchons de mucus dans les voies respiratoires périphériques (Wood et al., 1976). Cette hyperplasie/métaplasie des cellules à mucus est induite par l'inflammation et les bactéries présentes dans les voies respiratoires des patients et conduit à une hypersécrétion de mucus (**Figure 25**) (Rose and Voynow, 2006).

Cependant, une sur-expression des mucines reste encore discutée. Il a, dans un premier temps, été montré une forte concentration en MUC5AC et MUC5B dans des crachats de patients, avec une prédominance de la forme faiblement chargée de MUC5B, suggérant une modification de glycosylation des mucines (Kirkham et al., 2002). A l'inverse, il a ensuite été montré que la concentration en mucines serait relativement faible dans des crachats de patients comparée à celle de sujets sains. Il a été suggéré que cette diminution de l'expression des mucines serait due, non pas à un défaut de production, mais à un défaut de sécrétion ou à une dégradation des mucines à cause de la forte concentration en protéases induite par l'inflammation et les infections dans les voies respiratoires (Rubin, 2007). Il a aussi été rapporté que, malgré une diminution de la production des mucines dans les phases stables de la maladie, la sécrétion de MUC5B et MUC5AC augmente dans les phases d'exacerbation jusqu'à atteindre les concentrations en mucines gélifiantes retrouvées chez les sujets sains (Henke et al., 2007).

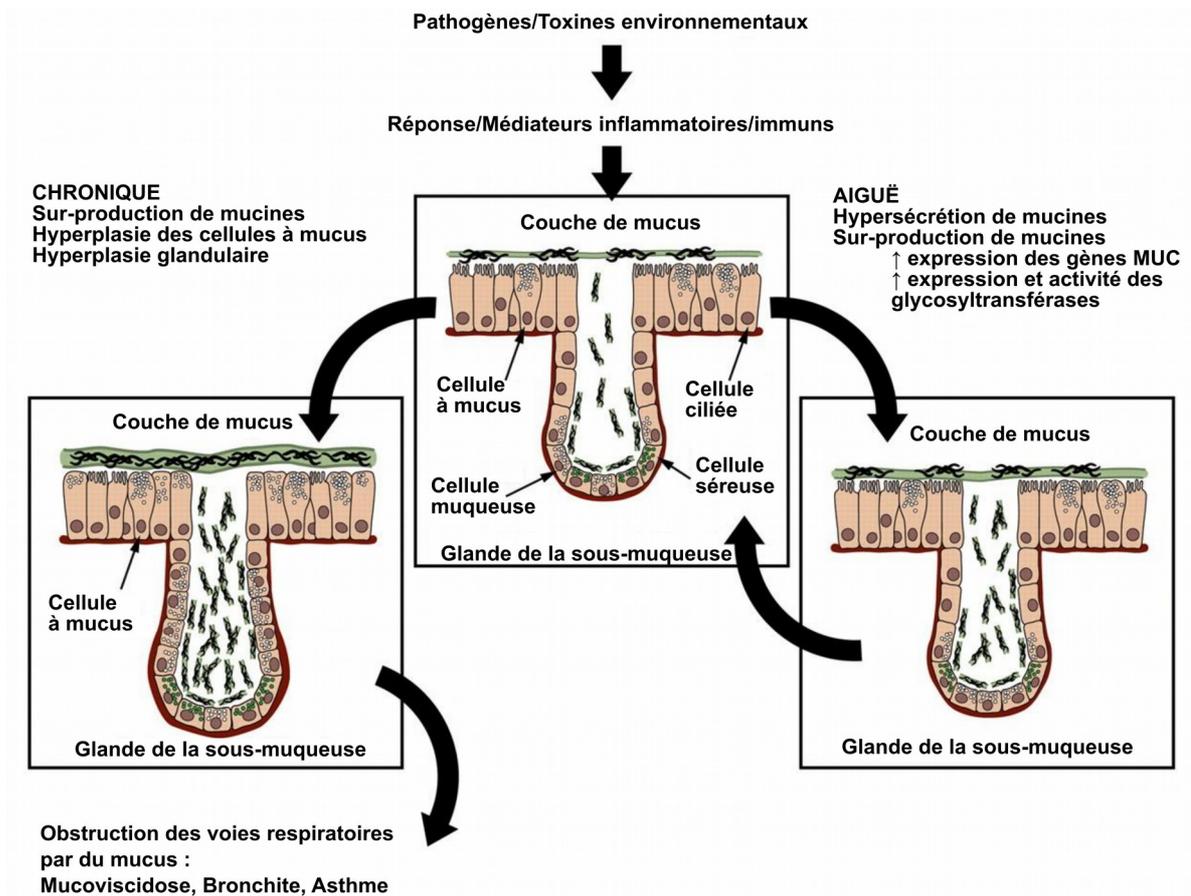


Figure 25 : Réponse des cellules sécrétrices des voies respiratoires à un stimulus aigu ou chronique.

Adapté de (Rose and Voynow, 2006).

Plus récemment, il a été montré que la concentration en mucines chez les patients mucoviscidosiques était largement sous-estimée lorsqu'elle est mesurée par des techniques immunologiques (immunohistochimie, Western-blot). Des techniques biophysiques (spectrométrie de masse, réfractométrie) montrent que la concentration en mucines serait trois fois plus élevée dans les sécrétions respiratoires de patients mucoviscidosiques que dans les sécrétions normales (Henderson et al., 2014).

L'hypothèse qui semble la plus plausible pour expliquer les anomalies de mucus dans la mucoviscidose, et qui fait consensus, est une déshydratation du mucus. En situation normale, le canal CFTR permet la sortie des ions chlore et bicarbonate hors de la cellule et assure un rétrocontrôle négatif sur le canal ENaC (pour « Epithelial sodium Channel »), limitant la réabsorption d'ions sodium. Chez les patients, le non-fonctionnement ou dysfonctionnement du canal CFTR empêche le transport des ions chlorure hors des cellules épithéliales et favorise l'absorption d'ions sodium et d'eau par les cellules via le canal ENaC qui est sur-activé puisque le CFTR n'assure plus son rôle de rétrocontrôle négatif sur lui (les mécanismes assurant ce rétrocontrôle négatif ne sont pas encore établis) (**Figure 26**). Ces anomalies dans le transport d'ions et d'eau entraînent une déshydratation et une modification du pH du mucus. La déshydratation du mucus induit une diminution de la hauteur du liquide périciliaire empêchant le bon fonctionnement des cils et donc l'évacuation normale du mucus (Clunes and Boucher, 2007; Ghosh et al., 2015).

Le mucus stagnant crée des niches hypoxiques favorisant le développement de certaines bactéries anaérobies et l'émergence d'un phénotype mucoïde de *P. aeruginosa* (Worlitzsch et al., 2002). Le mucus plus visqueux rend également les bactéries moins accessibles aux polynucléaires neutrophiles qui s'accumulent, s'engluent et meurent dans le mucus, larguant ainsi leur ADN et actine qui vont participer à augmenter la viscosité du mucus et donc à obstruer les voies respiratoires (**Figure 27**) (Fahy and Dickey, 2010). En plus d'une potentielle augmentation de la concentration des mucines, les bactéries, les cellules inflammatoires, l'ADN et l'actine participent à augmenter la fraction solide dans le mucus des patients (environ 7%), et donc la pression osmotique du mucus.

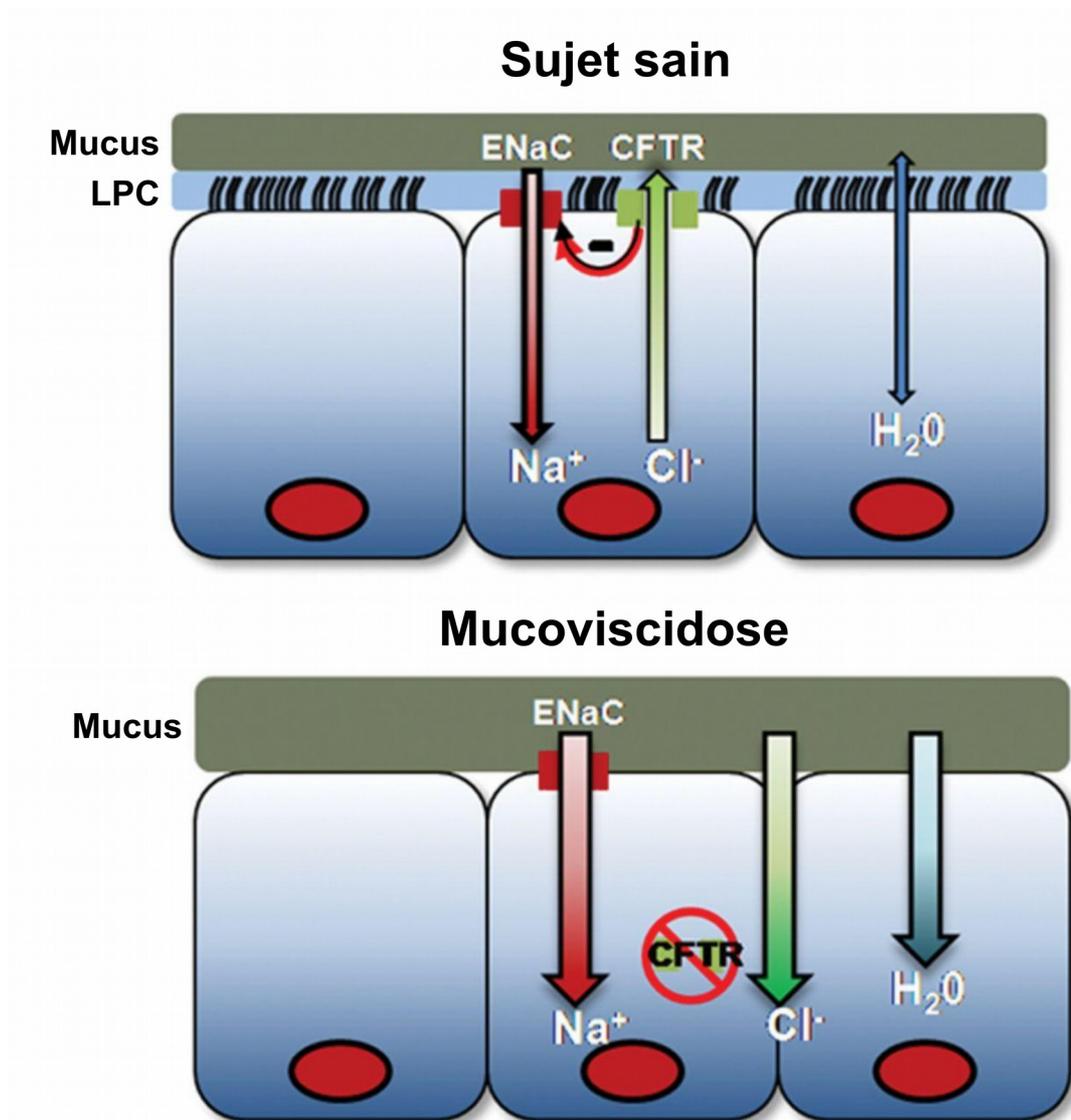


Figure 26 : Rôle de CFTR dans le maintien de l'hydratation du mucus dans les voies respiratoires de sujets sains et mucoviscidosiques.

Le dysfonctionnement total ou partiel du CFTR dans la mucoviscidose entraîne une augmentation de l'absorption de Na^+ via le canal EnaC, sur lequel CFTR n'assure plus son rétrocontrôle négatif. La réabsorption massive de Na^+ s'accompagne d'une absorption d'eau, induisant une diminution de l'épaisseur du liquide périciliaire (LPC) ne permettant plus aux cils de battre normalement. Le mucus n'est alors plus évacué et va adhérer à la surface des cellules épithéliales. Adapté de (Buchanan et al., 2009).

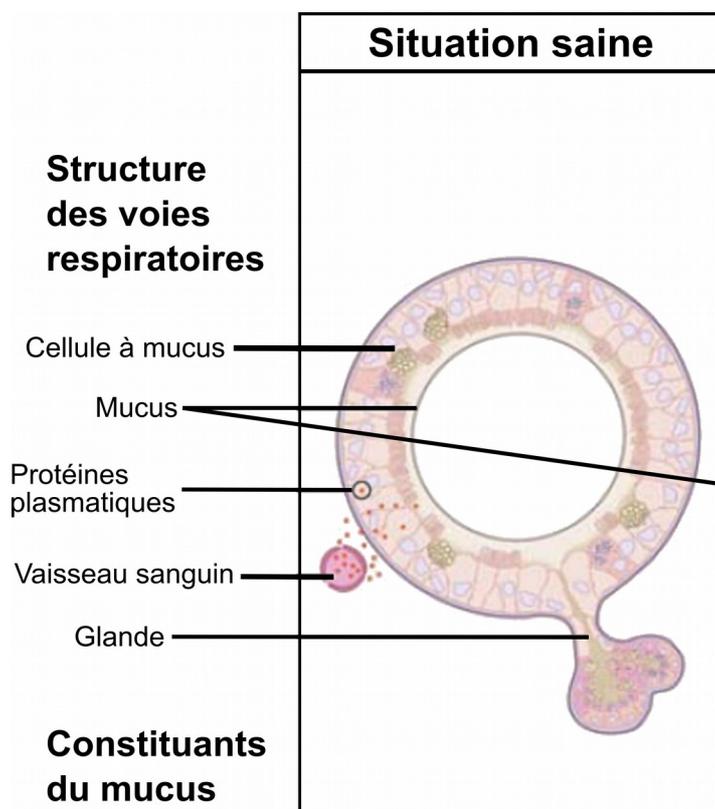
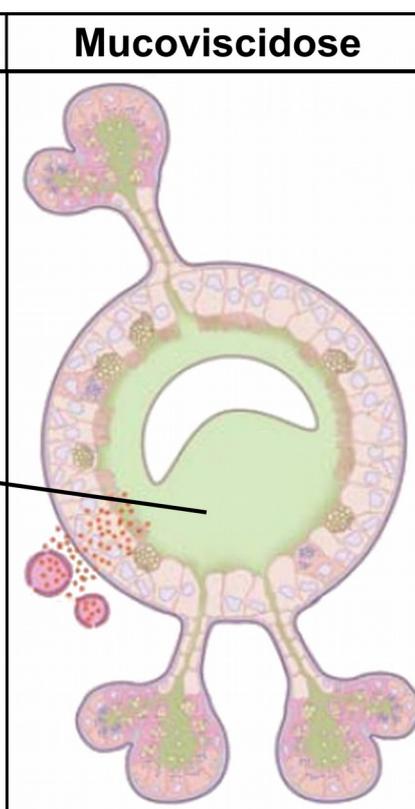
	Situation saine	Mucoviscidose
Structure des voies respiratoires		
Cellule à mucus		
Mucus		
Protéines plasmatiques		
Vaisseau sanguin		
Glande		
Constituants du mucus		
Mucines	X X	X X X X
Protéines plasmatiques	X	X X
Cellules inflammatoires	X	X X X X X
ADN		X X X X X
Actine		X X X X X
Bactéries		X X X X X

Figure 27 : Représentation schématique des voies respiratoires d'un individu sain et d'un individu atteint de mucoviscidose.

Dans la mucoviscidose, les glandes de la sous-muqueuse sont très prédominantes alors que le nombre de cellules à mucus dans l'épithélium respiratoire ne semble pas différent. La présence de bactéries, l'infiltration de cellules inflammatoires et l'ADN et l'actine issus de leur dégradation participent à augmenter la viscosité du mucus. Le nombre de X indique la quantité relative des constituants du mucus dans chaque situation. Adapté de (Fahy and Dickey, 2010).

Dans des modèles théoriques, il a été montré que lorsque la concentration en solides dans le mucus est supérieure à 6 %, la pression osmotique de la phase muqueuse est supérieure à celle du liquide périliciliaire, ce qui entraîne une rupture du liquide périliciliaire et l'adhésion du mucus à la surface des cellules (Ghosh et al., 2015). La pression osmotique des sécrétions produites par les patients est de 500 Pa, proche de celle du liquide périliciliaire, alors que la pression osmotique normale du mucus pulmonaire est de 100 Pa. Il a été montré que la pression osmotique du mucus atteint les 1000 Pa lorsque les sécrétions ne peuvent plus être évacuées par la toux, lors de transplantations pulmonaires chez des patients mucoviscidosiques (Henderson et al., 2014).

4.3.1.5 *Recommandations nutritionnelles européennes*

Des recommandations nutritionnelles ont été établies pour améliorer l'état nutritionnel des patients mucoviscidosiques. Les dernières recommandations établies par le consortium européen préconisent : d'adapter l'apport énergétique pour atteindre un poids et une taille normale ; dans le cas où elles sont nécessaires, une supplémentation en enzymes pancréatiques et en vitamines liposolubles doit être mise en place le plus tôt possible ; de supplémenter l'alimentation en sodium ; d'utiliser des compléments alimentaires, voir une nutrition entérale, si la croissance ou le statut nutritionnel sont insuffisants (Turck et al., 2016).

En ce qui concerne les AGPI essentiels, les agents anti-ostéoporotiques, l'hormone de croissance, les stimulants de l'appétit et les probiotiques, le consortium demande à ce que des études complémentaires soient réalisées avant de pouvoir établir des recommandations (Turck et al., 2016).

Le laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à l'étude des AGPI (n-3), notamment leurs effets sur la modulation de la réponse inflammatoire suite à une infection à *P. aeruginosa* dans des modèles murins de mucoviscidose (Pierre et al., 2007; Tetaert et al., 2007; Tiesset et al., 2011, 2009). Chez l'Homme, de nombreuses études ont été réalisées pour montrer l'effet d'une supplémentation en AGPI (n-3) chez les patients mucoviscidosiques, mais les principales limites à ces études sont des groupes contrôles peu ou pas adaptés et des doses utilisées très différentes

d'une étude à l'autre. Néanmoins, plusieurs études montrent qu'une supplémentation en AGPI (n-3) n'aurait à priori pas d'effet négatif, permettrait de diminuer la fréquence des exacerbations chez les patients et permettrait de diminuer les prises d'antibiotiques. Ces résultats restent à être confirmés par une étude à long terme, multicentrique, et sur des effectifs plus grands (Oliver and Watson, 2016).

4.3.1.6 Chez la souris

4.3.1.6.1 Modèles murins de la mucoviscidose

Depuis la découverte du gène *CFTR*, plusieurs lignées de souris génétiquement modifiées ont été créées, soit pour inactiver l'expression du gène *Cftr* (lignée *Cftr^{tm1Unc}* par exemple), soit en introduisant des mutations couramment rencontrées chez les patients (la lignée *Cftr^{tm1Eur}* porte la mutation $\Delta F508$).

Le phénotype principal observé chez les modèles murins de la mucoviscidose est le phénotype intestinal. La plupart des modèles animaux meurent d'une obstruction intestinale aux alentours du sevrage, à cause d'une surproduction de mucus excessivement visqueux. Ce phénotype intestinal est facilement contourné par l'utilisation soit du régime Peptamen™ (régime semi-élémentaire contenant des protéines hydrolysées et des triglycérides à chaînes moyennes), soit de laxatifs dans l'eau de boisson. Par contre, le phénotype respiratoire reste relativement faible. Très peu d'équipes observent le développement d'une inflammation pulmonaire spontanée, qui serait dépendante du fond génétique et de l'âge des souris, mais aussi de l'animalerie. C'est pourquoi, dans la majorité des études, une infection par *P. aeruginosa* ou une inflammation au LPS sont induites. Des anomalies de la trachée ont néanmoins été mises en évidence dans les lignées *Cftr^{tm1Unc}* et *Cftr^{tm1Eur}* pour lesquelles il a été observé une formation incomplète des cartilages de la trachée à la naissance (Wilke et al., 2011).

4.3.1.6.2 Mucines murines pulmonaires dans la mucoviscidose

Le laboratoire a montré, qu'à l'état basal, les souris déficientes pour le gène *Cftr* (*Cftr^{-/-}*) ont plus de cellules Club produisant Muc5b que les souris de type sauvage (Valque et al., 2011). Chez ces mêmes souris, il a été montré que l'instillation intratrachéale de LPS induit une surproduction de mucus et de Muc5ac

dans le poumon (Dif et al., 2010). Le laboratoire a également montré que, suite à une infection pulmonaire à *P. aeruginosa*, les souris $Cftr^{-/-}$ développent des bouchons de mucus avec une prédominance de Muc5b (Valque et al., 2011).

4.3.1.6.3 Effets des AGPI (n-3) dans la mucoviscidose

Comme chez l'Homme, un déséquilibre en AGPI a été montré dans différents modèles murins de la mucoviscidose, mais avec des résultats parfois contradictoires, sûrement dus à des génotypes, des conditions d'élevage et des âges différents (Mimoun et al., 2009). Il a notamment été montré que les souris $Cftr^{tm1Unc}$ ($Cftr^{-/-}$) présentent un déséquilibre en AGPI, avec une augmentation du ratio AA/DHA, qui est corrigé par un apport oral de DHA (Freedman et al., 1999).

Chez des souris de type sauvage, le laboratoire a montré qu'une supplémentation en EPA et DHA, à des doses extrapolables à une consommation humaine et pendant cinq semaines, permet de diminuer le ratio AGPI (n-6)/AGPI (n-3) dans les tissus, améliore la survie des souris suite à une infection par *P. aeruginosa* (Pierre et al., 2007) et diminue la sur-expression de Muc5b induite par l'infection à *P. aeruginosa* (Tetaert et al., 2007). Ce même régime permet de diminuer le ratio AGPI (n-6)/AGPI (n-3) dans les tissus des souris $Cftr^{-/-}$ et améliore la survie des souris $Cftr^{-/-}$ femelles suite à une infection expérimentale par *P. aeruginosa*. (Tiesset et al., 2011). Il a également été montré qu'une supplémentation en DHA pendant six semaines permet d'augmenter le ratio DHA/AA chez les souris $Cftr\Delta F508$ (Mimoun et al., 2009).

4.3.2 La fibrose pulmonaire idiopathique

4.3.2.1 Définition

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie fibroproliférante progressive, irréversible, limitée aux poumons, touchant préférentiellement les hommes à partir de 60 ans. Elle est caractérisée par une dyspnée progressive initialement d'effort, une toux non productive et des infiltrats interstitiels bilatéraux à la radiologie. Les explorations fonctionnelles respiratoires montrent une restriction des capacités respiratoires (syndrome restrictif), avec atteinte de la capacité

pulmonaire totale, de la capacité fonctionnelle résiduelle et du volume résiduel, due à la diminution de la compliance pulmonaire (Gross and Hunninghake, 2001).

Le pronostic de le FPI est extrêmement négatif puisque la maladie évolue vers une insuffisance respiratoire chronique restrictive et le décès. La médiane de survie est de 3 à 5 ans après le diagnostic (Eickelberg and Selman, 2010). Il n'existe, actuellement, aucun traitement disponible ayant fait preuve de son efficacité en dehors de la transplantation pulmonaire (Eickelberg and Selman, 2010; Selman and Pardo, 2013).

La FPI est caractérisée par une activation aberrante des cellules épithéliales alvéolaires qui produisent des médiateurs induisant la migration, la prolifération et l'activation des cellules mésenchymateuses, avec la transformation des fibroblastes en myofibroblastes, l'accumulation de matrice extracellulaire et la destruction de l'architecture pulmonaire (Selman and Pardo, 2013).

L'étiologie de la FPI est inconnue. Elle résulterait de l'agression récurrente des cellules épithéliales par différentes expositions aux fumées de cigarette, poussières et autres agents environnementaux. Chez des patients génétiquement prédisposés, ces agressions répétées endommagent les cellules épithéliales alvéolaires et conduisent à l'activation anormale de certaines voies inflammatoires, induisant des anomalies de cicatrisation en aboutissant à la formation de tissus fibrotiques (Gross and Hunninghake, 2001; Pardo and Selman, 2002). La fibrose induit la perte irréversible de la faculté de transferts gazeux au travers des alvéoles pulmonaires.

L'implication de prédispositions génétiques dans le développement d'une FPI est renforcée par le fait qu'elle touche des groupes familiaux, elle apparaît dans le cas de maladies génétiques multi-systèmes et que des individus exposés à des niveaux similaires à des agents fibrosants n'ont pas la même susceptibilité à la FPI. Il a été montré que la FPI est associée notamment à des mutations sur les gènes codant la protéine C du surfactant, la protéine A2 du surfactant, la mucine MUC5B et sur des gènes régulant la longueur des télomères (Renzoni et al., 2014).

4.3.2.2 Implication de *MUC5B* dans la FPI

Il a été montré que l'expression de *MUC5B* est 14 fois plus élevée chez les patients atteints de FPI que chez les sujets sains, avec notamment la présence de la protéine *MUC5B* dans des lésions fibreuses (kystes en formes de nid d'abeille) (Seibold et al., 2011) et dans les voies respiratoires terminales (Seibold et al., 2013). Le SNP (pour « Single Nucleotide Polymorphism ») rs35705950 dans le promoteur de *MUC5B* est associé à la survenue de la FPI chez les patients (Borie et al., 2013; Horimasu et al., 2015; Kropski et al., 2015; Peljto et al., 2015; Seibold et al., 2011; Stock et al., 2013; Van der Vis et al., 2016; Wang et al., 2014) et à une surproduction de *MUC5B* chez les sujets sains (Seibold et al., 2011). Il a récemment été montré que ce SNP est lié à une augmentation de l'activité du promoteur de *MUC5B*, et donc la production de *MUC5B*, dans le poumon de patients atteints de FPI, et plus particulièrement dans l'épithélium des bronchioles (Nakano et al., 2016). Ce polymorphisme a également été associé à une progression plus lente de la maladie et à une augmentation de la survie des patients atteints de FPI (Peljto et al., 2013), bien que les patients ayant ce polymorphisme ont une toux plus symptomatique (Scholand et al., 2014). Cependant, malgré la forte association entre le SNP dans le promoteur de *MUC5B* et la prévalence de la survenue de la FPI, aucun argument expérimental ne montre la relation entre *MUC5B* et FPI (Burch, 2011).

4.3.2.3 Modèles murins de la fibrose pulmonaire

Le principal modèle d'induction d'une fibrose pulmonaire chez la souris est le modèle utilisant la bléomycine. Parmi les autres modèles développés, mais peu utilisés, on trouve : l'instillation intratrachéale d'amiante, l'instillation de silice, l'instillation intratrachéale d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), l'infection par le virus de l'herpès-68- γ (chez des souris âgées) et le développement spontané d'une fibrose pulmonaire chez les souris *RAGE*^{-/-} et *relaxin*^{-/-} âgées (Moore et al., 2013). Plus récemment, un modèle par injection intrapéritonéale de paraquat (1,1-diméthyl-4,4-bipyridilium dichloride), un herbicide, a également été décrit (Sun et al., 2016).

Le modèle d'induction de fibrose pulmonaire le plus utilisé chez la souris reste le modèle d'instillation directe dans le tractus respiratoire (par voie intranasale ou

intratrachéale) de bléomycine. La bléomycine est un antibiotique fréquemment utilisé chez l'Homme en chimiothérapie dans le traitement de certains cancers, et dont l'un des principaux effets secondaires est d'induire une fibrose pulmonaire. Chez la souris, les doses les plus fréquemment utilisées varient de 1 à 2 mg/kg (soit 0,025 à 0,05 U/souris). La fibrose pulmonaire induite varie principalement en fonction du fond génétique et des souris et de la technique d'instillation utilisée (Scotton and Chambers, 2010), ainsi que de l'âge des souris (Moore et al., 2013).

L'implication de Muc5b dans le développement d'une fibrose pulmonaire n'a pas été étudiée chez la souris.

4.3.3 Bronchopneumopathie chronique obstructive

4.3.3.1 Chez l'Homme

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est l'une des causes principales de décès dans le monde. La BPCO est une maladie progressive, caractérisée par la limitation permanente des flux d'air et associée à un état inflammatoire. Elle apparaît après une exposition chronique à des composés nocifs de l'environnement (tabac et/ou gaz et particules), mais des facteurs génétiques prédisposent certaines populations à la BPCO. Les deux phénotypes principaux de la BPCO sont la bronchite chronique (BC) et l'emphysème. La BC est définie par la production d'expectorations et une toux pendant au moins trois mois pendant deux années consécutives. L'emphysème est défini comme étant la destruction des alvéoles. La BC est le principal phénotype mais la majorité des patients ont des symptômes des deux phénotypes. Les manifestations cliniques de la BC sont similaires aux symptômes pulmonaires précoces observés dans la mucoviscidose (production d'expectorations, transport de mucus anormal et inflammation chronique). L'exposition chronique au tabac induit une déshydratation de mucus des voies aériennes, notamment en agissant sur la protéine CFTR (**Figure 28**) (Ghosh et al., 2015).

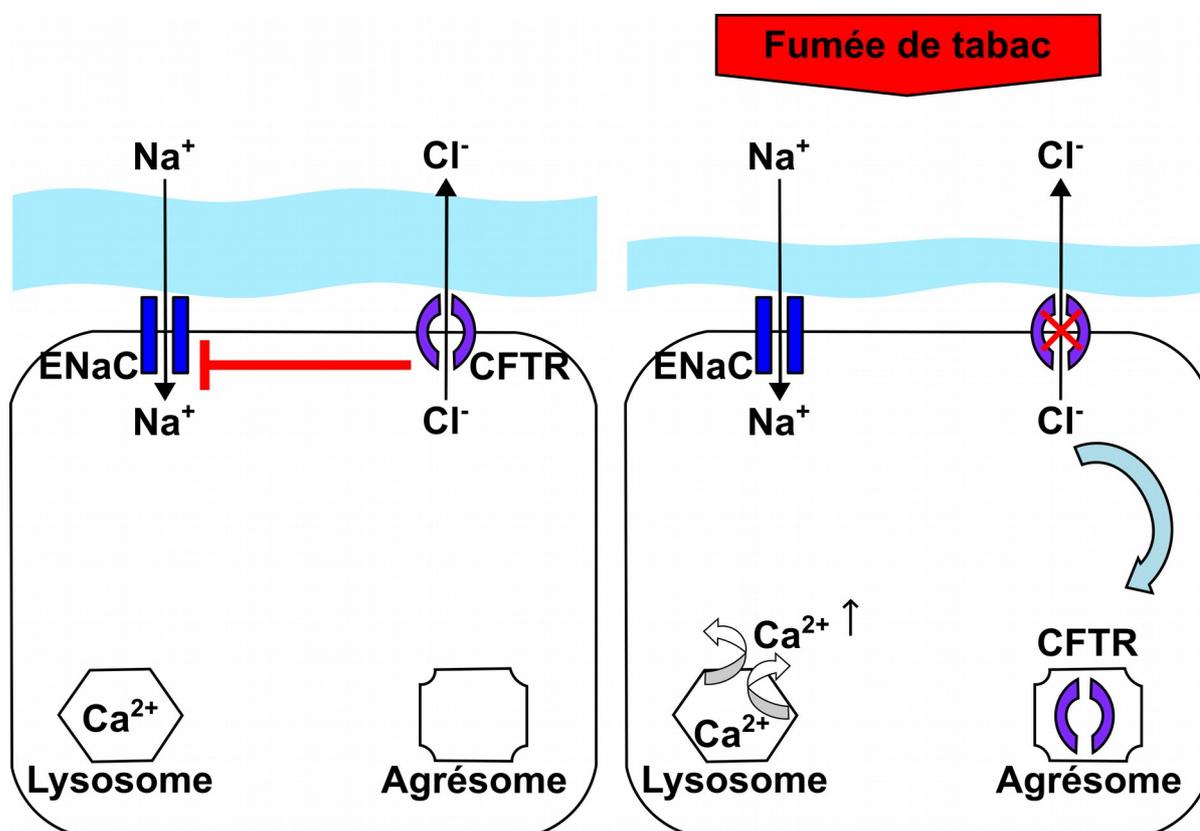


Figure 28 : Représentation schématique de l'action de la fumée de cigarette sur la protéine CFTR induisant une déshydratation du mucus pulmonaire dans la bronchopneumopathie chronique obstructive.

L'exposition des voies respiratoires à la fumée de cigarette entraîne une relocalisation du canal membranaire CFTR dans l'agrésome et une libération de Ca^{2+} par le lysosome qui conduisent à augmenter l'absorption du Na^+ à travers le canal ENaC et à diminuer l'épaisseur du mucus. Adapté de (Ghosh et al., 2015).

Cette déshydratation du mucus est renforcée par l'hypersécrétion de mucines. Dans la BC, il a été montré une hypertrophie des glandes de la sous-muqueuse et une hyperplasie/métaplasie des cellules à mucus dans les petites voies aériennes. Cette hypersécrétion de mucines conduit à la formation de bouchons composés à environ 7 % de solides (Ghosh et al., 2015). MUC5AC et MUC5B sont les principales mucines gélifiantes dans les crachats de patients atteints de BPCO, avec une prédominance de MUC5B. De plus, il a été montré que la concentration en MUC5B est corrélée à de plus mauvaises fonctions pulmonaires (Kirkham et al., 2008). Comme une augmentation de MUC5AC et une diminution de MUC5B dans les cellules épithéliales des voies respiratoires de patients atteints de BPCO avaient été montrées précédemment (Caramori et al., 2004; Innes et al., 2006; O'Donnell et al., 2004), il a été suggéré que plus la sévérité de la maladie augmente, plus les sécrétions des glandes de la sous-muqueuse, et plus particulièrement MUC5B, contribuent à la composition du gel de mucus (Kirkham et al., 2008). Une augmentation de l'expression de MUC5AC dans les glandes de la sous-muqueuse chez les patients atteints de BPCO a été montrée en plus de l'augmentation de l'expression de MUC5AC dans les cellules épithéliales des bronches. De plus, l'augmentation de MUC5AC dans les cellules épithéliales bronchiques est corrélée au nombre de cigarettes fumées par an chez les fumeurs atteints ou non de BPCO (Caramori et al., 2009).

Chez des patients atteints de BPCO, au début d'une exacerbation aiguë, il a été montré, qu'en plus d'une augmentation de l'expression des mucines (MUC5AC et MUC5B), il y a une diminution des protéases, une augmentation des anti-protéases et une augmentation de la stabilité des mucines. Le niveau d'expression augmenté de MUC5AC observé en début d'exacerbation reste trois fois plus élevé que chez les sujets sains, six semaines après le début de l'exacerbation, alors que le niveau d'expression de MUC5B revient à la normale (Chillappagari et al., 2015).

4.3.3.2 Chez la souris

Le principal facteur de risque de développer une BPCO étant le tabac, différents modèles murins de BPCO ont été mis en place par exposition de souris à

la fumée de cigarette. Chez des souris exposées à la fumée de deux cigarettes sans filtre, six jours par semaine, pendant six mois, il a été observé le développement d'un emphysème (dilatation et destruction des parois alvéolaires) ainsi que le recrutement de cellules inflammatoires (Hautamaki et al., 1997). Ce modèle a ensuite été optimisé pour réduire sa durée en utilisant un condensat de fumée de cigarette plutôt qu'une exposition directe à la fumée de cigarette ou en combinant une exposition à la fumée de cigarette avec une infection. Ainsi, l'instillation intranasale d'un condensat de fumée de cigarette, une fois par jour, pendant 40 jours, induit une inflammation pulmonaire et des changements cellulaires caractéristiques de ceux observés chez des patients atteints de BPCO (augmentation de la résistance pulmonaire suite à un challenge à la métacholine et augmentation de la concentration en *Muc5ac*) (Miller et al., 2002). Chez des souris infectées intranasalement par la bactérie *Haemophilus influenzae* inactivée, la fumée de cigarette induit une augmentation de l'expression de *Muc5ac* et *Muc5b*, alors que l'infection seule n'induit l'augmentation que de *Muc5ac* (Ganesan et al., 2014).

Le modèle murin couramment utilisé pour étudier l'obstruction des voies respiratoires par du mucus est la souris transgénique sur-exprimant β EnaC spécifiquement dans le poumon (souris β ENaC-Tg) (Mall et al., 2004). Cette lignée murine présente un déséquilibre de l'absorption du Na^+ et de la sécrétion de Cl^- , une déshydratation de la surface des voies respiratoires et le développement spontané d'une maladie pulmonaire obstructive caractérisée par une obstruction des voies respiratoires par du mucus, une inflammation neutrophilique et le développement précoce d'un emphysème (Mall et al., 2004, 2008). Grâce aux souris β ENaC-Tg, il a été montré que la déshydratation de la surface des voies respiratoires aggrave l'inflammation, la sur-expression des mucines (*Muc5ac* et *Muc5b*) et la destruction des parois des alvéoles induites par inhalation de fumée de cigarette, et accélère la formation de follicules lymphoïdes pulmonaires. Par contre, l'exposition à la fumée de cigarette n'induit pas de remodelage des parois des voies respiratoires ni la métaplasie des cellules à mucus chez les souris β ENaC-Tg (Seys et al., 2015).

4.3.4 Panbronchiolite diffuse

4.3.4.1 Chez l'Homme

La panbronchiolite diffuse est une maladie pulmonaire obstructive, auparavant associée à la BPCO. Elle se caractérise par une toux chronique avec production d'abondantes expectorations, une inflammation chronique des bronchioles avec accumulation de lymphocytes et de macrophages spumeux, une hyperplasie des cellules à mucus et une hypersécrétion de mucus (**Figure 29**) et des infections bactériennes chroniques à *Haemophilus influenzae* progressivement remplacé par *P. aeruginosa*.

Le seul traitement potentiellement efficace est la prise de 600 mg d'érythromycine tous les jours pendant deux ans. L'étiologie de la panbronchiolite diffuse reste inconnue, mais l'implication de prédispositions génétiques est suspectée car cette maladie touche principalement les populations asiatiques chez qui des gènes de susceptibilité ont été mis en évidence (HLA-B54 dans la population japonaise et HLA-A11 dans la population coréenne). Des variations dans les gènes *TAP* et *CFTR* ont également été observées chez des patients atteints de panbronchiolite diffuse, mais l'implication de ces gènes dans la susceptibilité à développer la maladie n'est pas confirmée (Keicho and Hijikata, 2011).

Il a été montré que le polymorphisme rs17235353, un polymorphisme d'insertion/délétion d'un dinucléotide CA (cytosine adénine) dans le promoteur de *MUC5B*, est significativement associé à la panbronchiolite diffuse. L'allèle comprenant la délétion induit une diminution de la transcription de *MUC5B* et agit donc comme un facteur de résistance à la maladie, alors que l'allèle comprenant l'insertion induit une hypersécrétion de MUC5B (Kamio et al., 2005).

4.3.4.2 Chez la souris

Un modèle murin mimant la panbronchiolite diffuse a été obtenu par infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* grâce au placement d'un tube recouvert de *P. aeruginosa* dans la bronche principale (Yanagihara et al., 1997).

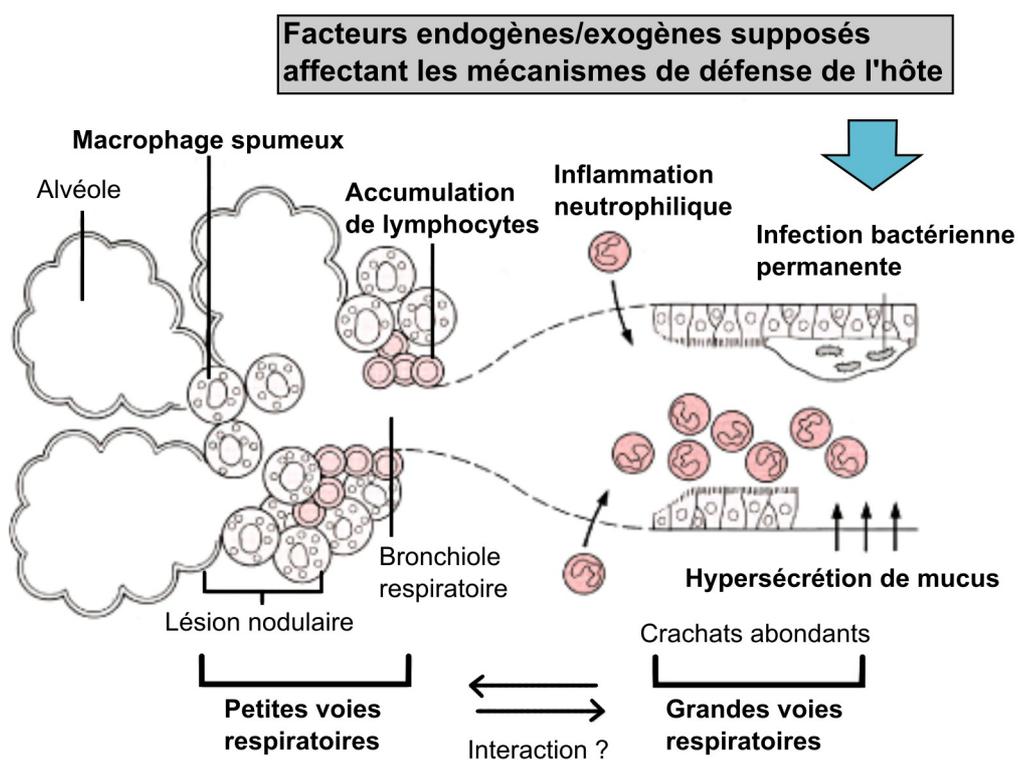


Figure 29 : Représentation schématique de la pathogenèse de la panbronchiolite diffuse.

Les caractéristiques de la panbronchiolite diffuse sont une accumulation de lymphocytes et de macrophages spumeux autour des voies respiratoires terminales et une hypersécrétion de mucus. Un défaut de défense de l'hôte serait également impliqué mais reste à être démontré. Adapté de (Keicho and Hijikata, 2011).

Il a été montré que la production de Muc5ac augmente progressivement pendant les 14 jours suivant l'installation du tube et que la clarithromycine, un antibiotique macrolide de la même famille que l'érythromycine, inhibe la production de Muc5ac lors d'infections pulmonaires chroniques à *P. aeruginosa* (Kaneko et al., 2003). L'implication de Muc5b dans la panbronchiolite diffuse n'a pas encore été étudiée chez la souris.

4.3.5 Asthme

4.3.5.1 Chez l'Homme

L'asthme est caractérisé par une inflammation chronique, une hypersécrétion de mucus, une hyperplasie des cellules à mucus et une hypertrophie des glandes sous-muqueuses. Il a été montré que les crachats de patients asthmatiques contiennent plus de MUC5AC et de MUC5B que des crachats de sujets sains (Kirkham et al., 2002). Il a également été montré que l'augmentation de l'expression des mucines chez les patients atteints d'asthme léger ou modéré est due à une hyperplasie des cellules à mucus et que la sécrétion des mucines n'est augmentée que dans le cas de formes modérées (Ordoñez et al., 2001). Chez un patient décédé après une crise d'asthme aiguë et sévère (*status asthmaticus*), la présence d'un mucus obstruant les voies respiratoires, anormalement visqueux, a été observée. La concentration en mucines de ce mucus était de 40 mg/mL, soit une concentration 50 fois plus élevée que la concentration estimée en mucines dans un mucus normal (Sheehan et al., 1995). Parmi les mucines constituant ce mucus, il a été mis en évidence une fraction résistante à la solubilisation composée d'au moins 96 % de la glycoforme de faible charge de MUC5B (Sheehan et al., 1999).

4.3.5.2 Chez la souris

Dans un modèle murin d'asthme induit par inhalation d'ovalbumine, il a été montré une sur-expression de *Muc5b* dans l'épithélium des voies respiratoires et dans les glandes de la sous-muqueuse (Chen et al., 2001b). Il a également été montré la présence de Muc5ac dans des lavages broncho-alvéolaires et des broyats de poumons de souris après traitement à l'ovalbumine alors que Muc5ac n'est pas détectée chez les souris contrôles (Zuhdi Alimam et al., 2000). Alors que les souris

Muc5ac^{-/-} sont protégées contre le phénotype asthmatique (pas d'hyper-réactivité des voies respiratoires à la métacholine suite à un challenge allergique), les souris Muc5b^{-/-} ne sont pas protégées contre le phénotype asthmatique. De plus, un challenge allergique entraîne une inflammation exagérée chez les souris Muc5b^{-/-} alors que l'inflammation ne varie pas chez les souris Muc5ac^{-/-} (Raclawska et al., 2016).

4.3.6 Rhinite allergique

4.3.6.1 Chez l'Homme

La rhinite allergique correspond à une inflammation de la muqueuse nasale et se caractérise par des éternuements, des démangeaisons, une rhinorrhée, des écoulements nasaux et/ou une congestion nasale. La maladie touche 400 millions de personnes dans le monde, avec une plus grande prévalence dans les pays industrialisés (Shirinde et al., 2015). Dans la muqueuse nasale allergique, il a été montré une sur-expression de *MUC5B*, accompagnée d'une expression anormale de *MUC6* (Ali, 2009).

4.3.6.2 Chez la souris

Après une sensibilisation répétée trois fois à sept jours d'intervalle (injection intrapéritonéale de 200 µL d'ovalbumine 0,5 mg/mL et d'hydroxide d'aluminium 20 mg/mL), une rhinite allergique est induite par administration nasale de 20 µL d'ovalbumine (40 mg/mL), une fois par jour, pendant 8 jours. Dans ce modèle de rhinite allergique, il a été montré que l'expression et la production de Muc5b sont augmentées. Il a également été montré que l'IL-33, connue pour être impliquée dans le développement d'une réaction allergique, aggrave l'hyperproduction de Muc5b induite par ce challenge allergique (Lin et al., 2014).

4.3.7 Rhinosinusite chronique

4.3.7.1 Chez l'Homme

La rhinosinusite chronique est une inflammation du nez et des sinus paranasaux, caractérisée par une douleur faciale, une réduction ou une perte de l'odorat, une congestion/obstruction nasale et/ou des écoulements nasaux. En

Europe, elle touche près de 10 % des adultes (Hastan et al., 2011). Il a été montré une sur-expression de *MUC5AC* et *MUC5B* lors de sinusites chroniques, accompagnée d'une augmentation du nombre de cellules MUC5AC-positives et MUC5B-positives due à une hyperplasie des cellules caliciformes et des glandes de la sous-muqueuse (Ali, 2009).

4.3.7.2 Chez la souris

Des modèles murins de sinusites chroniques ont été développés, notamment en administrant trois fois par semaine un extrait d'*Aspergillus fumigatus* par voie nasale, pendant 12 semaines, après une première sensibilisation des souris par injection intrapéritonéale de l'extrait d'*Aspergillus fumigatus* (Lindsay et al., 2006). Des modèles bactériens ont également été développés en couplant une inoculation de *Bacteroides fragilis* à l'obstruction de l'ouverture du sinus maxillaire par du Merocel (Jacob et al., 2001) et en couplant une inoculation de *Streptococcus pneumoniae* à l'obstruction du complexe ostéoméatal (lieu de convergence des sinus maxillaires et ethmoïdiens) par du Merocel (Wang et al., 2008). Un modèle de rhinosinusite chronique allergique a été obtenu par des instillations intranasales répétées d'ovalbumine pendant 12 semaines, après une première sensibilisation effectuée par injection intrapéritonéale d'ovalbumine (Wang et al., 2008). Il a également été montré que la lignée murine transgénique exprimant spécifiquement le TNF α dans l'épithélium olfactif développe un phénotype similaire à la sinusite avec une infiltration de cellules inflammatoires dans l'épithélium olfactif, un amincissement de la couche de cellules réceptrices neuro-sensorielles et une perte progressive de l'odorat (Turner et al., 2010).

Malgré le développement de plusieurs modèles murins de sinusite chronique, l'implication de Muc5b dans cette pathologie n'a pas été étudiée chez la souris.

4.3.8 Polypes nasaux

4.3.8.1 Chez l'Homme

Les polypes nasaux sont des gonflements de la muqueuse, semblables à des tumeurs, se formant principalement dans le complexe ostéoméatal. Au niveau

histologique, les polypes sont caractérisés par un œdème extracellulaire, un infiltrat de cellules inflammatoires (principalement des éosinophiles), et une métaplasie de l'épithélium de surface. La prévalence des polypes nasaux est estimée entre 0,2 et 4 % de la population mondiale, avec une prédominance chez les hommes. Le facteur déclenchant de la formation de polypes est inconnu mais des facteurs héréditaires, des facteurs anatomiques, une allergie locale ou systémique et une inflammation pourraient être impliqués (Sharma et al., 2014). Il a été montré que les gènes de mucines les plus exprimés dans les polypes sont *MUC4*, *MUC5AC* et *MUC8*, suivis par *MUC1*, *MUC3*, *MUC5B* et *MUC7*. *MUC2* et *MUC6* sont faiblement exprimés. Parmi ces mucines, il a été clairement montré une surexpression de *MUC1*, *MUC4*, *MUC5B*, *MUC7* et *MUC8* dans des polypes, par rapport à la muqueuse nasale normale (Ali, 2009).

4.3.8.2 Chez la souris

Un modèle murin de polypes nasaux a récemment été développé par une injection intrapéritonéale d'ovalbumine (25 µg) et d'hydroxide d'aluminium (2 mg) aux jours 0 et 7, puis par instillation intranasale quotidienne d'ovalbumine 6 % entre les jours 14 et 20, et enfin par une instillation intranasale d'ovalbumine 6 % et d'endotoxine B de *Staphylococcus aureus* (10 ng) trois fois par semaine pendant 8 semaines (Kim et al., 2016). L'expression des mucines dans ce modèle n'a pas été étudiée.

4.4 MUC5B et pathologies oculaires

La perte des cellules caliciformes qui produisent et secrètent les mucines gélifiantes est une caractéristique commune à toutes les formes de sécheresse oculaire. Cette diminution de la densité des cellules en calice induit une instabilité du film lacrymal, des lésions de la surface et une perte d'eau par évaporation, et provoque des symptômes dus à un manque de lubrification et à des phénomènes inflammatoires de la surface oculaire.

4.4.1 Le syndrome de l'œil sec

4.4.1.1 Définition

En 2007, le syndrome de l'œil sec, aussi appelé kéraconjonctivite sèche ou sécheresse oculaire, a été redéfini comme étant une « maladie multifactorielle des larmes et de la surface oculaire qui entraîne des symptômes d'inconfort, une perturbation visuelle et une instabilité du film lacrymal avec des lésions potentielles de la surface oculaire. Elle est accompagnée d'une augmentation de l'osmolarité du film lacrymal et d'une inflammation de la surface oculaire ». Une classification étiopathogénique des différents sous-types de sécheresse oculaire a été réalisée (**Figure 30**) (DEWS, 2007b).

La classification étiopathogénique de la sécheresse oculaire prend en compte l'influence de l'environnement sur le risque individuel de développer une sécheresse oculaire et la distinction entre les yeux secs aquo-déficients (ADDE) et les yeux secs par évaporation (EDE) (DEWS, 2007b). Il est à noter que ces catégories ne sont pas exclusives ; une maladie qui débute dans l'un de ces sous-groupes peut aussi impliquer des mécanismes d'autres catégories.

4.4.1.2 Prévalence

La prévalence du syndrome de l'œil sec est de 5 à 30 % des individus âgés de 50 ans et plus (DEWS, 2007c). En France, la prévalence du syndrome de l'œil sec chez les personnes âgées (>73 ans) est de 21,9 %, avec une prévalence plus élevée chez les femmes (27,1 % contre 13,6 % chez les hommes) (Malet et al., 2014). Parmi les patients français atteints du syndrome de l'œil sec, 35 % sont atteints d'une forme légère, 47 % d'une forme moyenne et 18 % d'une forme grave (Clegg et al., 2006).

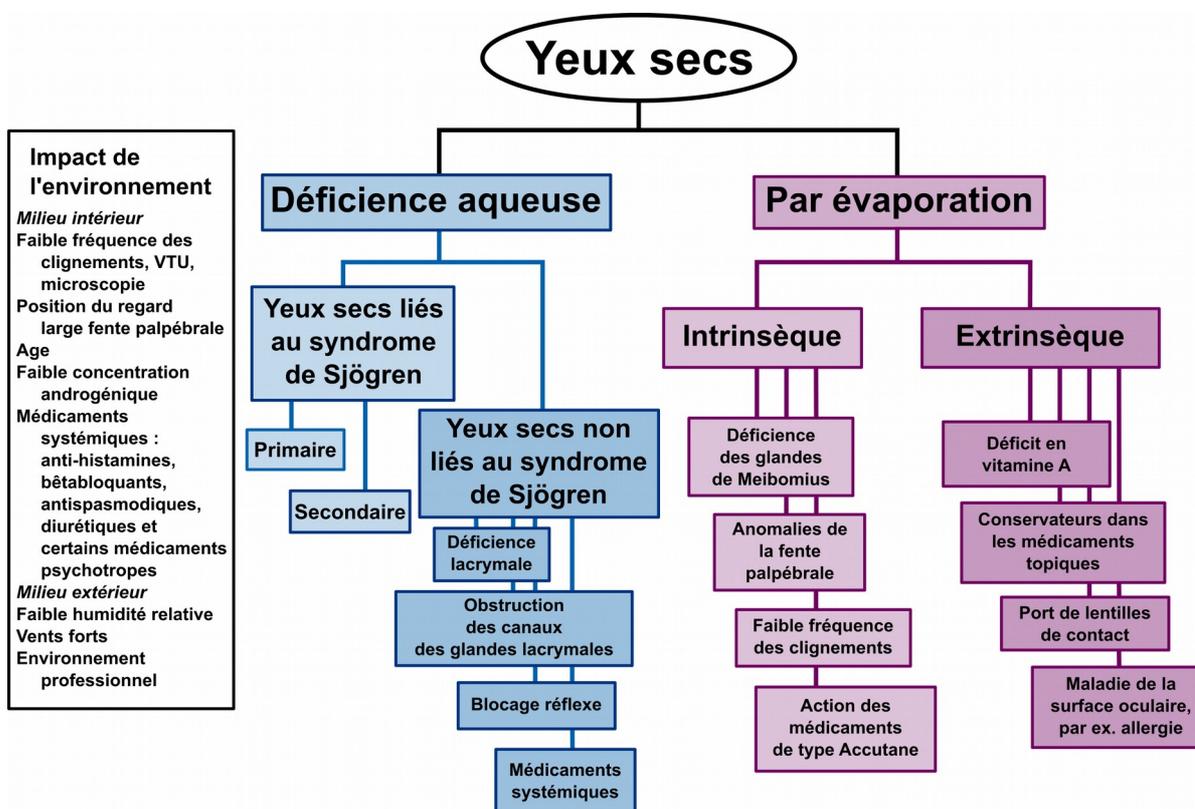


Figure 30 : Classification étiopathogénique de la sécheresse oculaire.

L'encadré de gauche illustre l'influence de l'environnement sur le risque, pour un individu, de développer une sécheresse oculaire. On distingue le milieu intérieur qui regroupe les caractéristiques physiologiques propres à chaque individu et le milieu extérieur qui correspond à l'environnement extérieur et à l'environnement professionnel (diminution de la fréquence des clignements et augmentation de la largeur palpébrale dues à un travail sur écran et à des tâches nécessitant de regarder fréquemment vers le haut).

Les ADDE correspondent aux sécheresses oculaires résultant d'une insuffisance de la sécrétion lacrymale. Parmi les ADDE, on distingue les yeux secs liés au syndrome de Sjögren (maladie auto-immune qui touche les glandes lacrymales et salivaires) et les yeux secs non liés au syndrome de Sjögren.

Les EDE résultent d'une perte d'eau excessive alors que la sécrétion lacrymale est normale (DEWS, 2007b).

4.4.1.3 Facteurs de risque

Parmi les principaux facteurs de risque du syndrome de l'œil sec on trouve : le sexe féminin, l'âge, la thérapie œstrogénique post-ménopause, un régime alimentaire faible en oméga-3, une chirurgie réfractive, une carence en vitamine A, une déficience en androgènes, une radiothérapie, une transplantation de moelle osseuse, l'hépatite C, une maladie du tissu conjonctif et certains traitements oculaires ou systémiques comme les antihistaminiques. D'autres facteurs de risque, comme l'appartenance à certaines ethnies, des traitements antidépresseurs, le diabète de type 2, le SIDA, les environnements à faible humidité et les chimiothérapies pourraient également être impliqués dans la sécheresse oculaire, mais des recherches complémentaires restent à effectuer pour valider leur implication (DEWS, 2007c).

4.4.1.4 Traitements

Comme le syndrome de l'œil sec est une maladie multifactorielle, le traitement de la sécheresse oculaire nécessite une approche multiple. Ces différentes approches sont mises en place suivant la sévérité de la maladie. Parmi ces approches on trouve : l'utilisation fréquente de lubrifiants (aussi appelés larmes artificielles), l'occlusion des points lacrymaux dans certains cas d'ADDE, la stimulation lacrymale par utilisation de sécrétagogues (diquafosol et rébamipide approuvés uniquement en Asie), l'utilisation de substituts lacrymaux biologiques (sérum, salive, auto-transplantation des glandes salivaires sous-maxillaires), l'utilisation d'anti-inflammatoires (Ikervis® approuvé en Europe pour des sécheresses oculaires sévères, Restasis® approuvé aux USA), la consommation d'acides gras polyinsaturés (n-3) et des stratégies environnementales (éviter les médicaments systémiques anticholinergiques, éviter les environnements avec un faible taux d'humidité et un air conditionné, travailler sur des écrans placés sous le niveau des yeux, faire régulièrement des pauses avec les yeux fermés pour les personnes travaillant sur écran ou lisant beaucoup) (DEWS, 2007a; Mantelli et al., 2013; Ridder and Karsolia, 2015).

4.4.2 MUC5B et syndrome de l'œil sec

Des mécanismes communs ont été identifiés dans la pathogenèse de la sécheresse oculaire : une inflammation chronique de la conjonctive, une diminution de la sensibilité de la surface oculaire, une détérioration du film lacrymal (production et stabilité réduites) et des lésions épithéliales associées à une métaplasie des cellules squameuses et une diminution de la densité des cellules caliciformes (DEWS, 2007b, 2007d).

La diminution du nombre de cellules caliciformes, proportionnelle à la sévérité de la maladie, induit une diminution de la production de mucines sécrétées (MUC5AC), mais des anomalies de glycosylation ont également été décrites dans différentes formes de sécheresse oculaire, entraînant une perte d'hydrophilicité des mucines gélifiantes et une diminution de la lubrification. Une diminution de la production de MUC19 dans la conjonctive de patients atteints du syndrome de Sjögren (voir §4.6.1) a également été observée. Concernant les mucines membranaires, il a été montré une diminution de MUC1 qui entraîne une perte de stabilité du film lacrymal et une altération de la O-glycosylation de MUC16 (Mantelli et al., 2013).

Chez l'Homme, les études de l'implication des mucines gélifiantes dans l'œil sec sont centrées sur MUC5AC. La production de MUC5B est considérée chez l'Homme, comme chez la souris, comme mineure. Cependant, l'une des caractéristiques communes de toutes les sécheresses oculaires est une diminution de la densité de cellules caliciformes et donc potentiellement de la production de MUC5B. L'implication de celle-ci est néanmoins très étudiée dans le syndrome de Sjögren mais seulement dans les glandes salivaires où elle est la principale mucine gélifiante (voir §4.6.2).

4.4.3 Chez la souris

4.4.3.1 Modèles murins de la sécheresse oculaire

Le chien et le lapin sont beaucoup utilisés comme modèles animaux du syndrome de l'œil sec, notamment pour les tests toxicologiques. Cependant, la

souris est le modèle privilégié pour étudier la toxicité de composés et les mécanismes en jeu dans cette pathologie grâce à la disponibilité de nombreuses lignées invalidées (KO pour « knock-out ») ou transgéniques et la disponibilité de nombreux anticorps.

4.4.3.1.1 Modèles murins d'ADDE

Différents modèles d'ADDE ont été mis en place chez la souris, avec notamment :

- des modèles chirurgicaux par excision des glandes lacrymales extraorbitales (Stevenson et al., 2014) et/ou la cautérisation du canal lacrymal (Flores et al., 2016) ;

- des modèles physiques en plaçant les souris dans un environnement contrôlé desséchant (humidité, température et débit d'air) (Barabino et al., 2005) ou en soumettant les souris à une dose thérapeutique de radiation (Rocha et al., 2013). Le modèle d'induction d'une sécheresse oculaire par environnement desséchant est également parfois associé à une application transdermique de scopolamine (Dursun et al., 2002) ;

- des modèles chimiques avec l'application topique de chlorure de benzalkonium (BAK) (Lin et al., 2011), l'injection dans la glande lacrymale extraorbitale de toxine botulique B (BTX-B) (Suwan-Apichon et al., 2006) ou A (BTX-A) (Kim et al., 2013), l'injection dans les glandes lacrymales extraorbitales d'IL-1 recombinante humaine (Zoukhri et al., 2007) et l'injection de concanavaleine A intraorbitalement (Lee et al., 2015b) ou dans les glandes lacrymales intra- et extraorbitales (Lee et al., 2015a) ;

- des modèles génétiquement modifiés avec les lignées NRTN^{-/-} (Song et al., 2003), Klf4CN (Swamynathan et al., 2007), Tet-mev-1 (Uchino et al., 2012), Sod1^{-/-} (Kojima et al., 2012), Spdef^{-/-} (Marko et al., 2013), Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-} double-KO (Inaba et al., 2014) et NHE8^{-/-} (Xu et al., 2015). Une sécheresse oculaire est également décrite chez les souris de fond génétique NOD (souris diabétiques non-obèses) (Takahashi et al., 1997).

Les modèles murins spécifiques pour l'étude du syndrome de Sjögren sont décrits dans la partie 4.6.

4.4.3.1.2 Modèles murins d'EDE

Les modèles murins d'étude de l'EDE sont essentiellement des souris génétiquement modifiées qui présentent principalement une absence ou une malformation des glandes de Meibomius. On trouve les lignées ACAT-1^{-/-} (Yagyu et al., 2000), SCD1^{-/-} (Miyazaki et al., 2001), TRAF6^{-/-} (Naito et al., 2002), K14-Noggin (Plikus et al., 2004), Smad4CKO (Huang et al., 2009), K14-CreER^{tam};C/EBP α ^{ff};C/EBP β ^{ff} (House et al., 2010), Barx2^{-/-} (Tsau et al., 2011), Klf5CN (Kenchegowda et al., 2011), Fatp4^{-/-} (Lin et al., 2013), et les lignées transgéniques APOC1 (Jong et al., 1998) et Tabby-EDA (Cui et al. 2005).

Des modèles chirurgicaux et chimiques d'EDE avaient été mis en place comme la cautérisation des orifices des glandes de Meibomius, l'application topique d'épinéphrine et l'administration systémique d'isotrétinoïne chez le lapin ou chez le singe (Wang et al., 2016) mais n'ont, à notre connaissance, pas été adaptés pour une utilisation chez la souris.

4.4.3.2 Induction chimique d'œil sec au chlorure de benzalkonium

Pour notre étude, nous avons besoin d'un modèle simple, rapide à mettre en œuvre, et ne nécessitant pas de matériel particulier pour induire une sécheresse oculaire. Nous avons choisi le modèle d'induction de sécheresse oculaire par application topique de BAK.

Le BAK est le principal conservateur utilisé dans les solutions ophtalmiques, à des concentrations allant de 0,004 à 0,025 %. Son implication dans le développement d'une sécheresse oculaire a été mise en évidence chez les patients utilisant des anti-glaucomeux avec conservateurs. En effet, 30 à 50 % des patients traités avec des anti-glaucomeux développent des symptômes oculaires dont un inconfort à l'instillation du produit, une sensation de piqûre, de brûlure ou de présence d'un corps étranger, une sécheresse de l'œil, des larmoiements et une démangeaison des paupières. Il reste néanmoins le conservateur le plus utilisé, car il

est connu pour être faiblement allergisant et avoir une forte activité antimicrobienne (Baudouin et al., 2010).

Le BAK est un mélange de chlorure d'alkylbenzyltriméthylammonium dont la formule générale est $C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl$, où R représente la chaîne aliphatique dont la longueur varie de C8 à C18. Il appartient à la famille des ammoniums quaternaires, qui ont des propriétés détergentes leurs conférant des activités bactéricides et anti-fongiques. Ces propriétés détergentes induisent une instabilité de la couche lipidique du film lacrymal, favorisant une évaporation excessive de la couche aqueuse. De plus, le BAK induit directement des altérations des muqueuses de l'œil en stimulant l'apoptose des cellules en calice, voir en détruisant directement la couche de mucus du film lacrymal (Baudouin et al., 2010).

L'induction d'un syndrome de l'œil sec par application topique de BAK dans des modèles animaux a d'abord été décrite chez le lapin, chez qui une sécheresse oculaire est induite par l'application topique biquotidienne de BAK 0,1 % pendant 14 jours (Xiong et al., 2008). Il a été montré que ce modèle est stable dans le temps. Après une induction de 5 semaines (BAK 0,1 %, deux fois par jour), des signes de sécheresse oculaire sont toujours visibles trois semaines après l'arrêt du traitement (Li et al., 2012). Chez la souris, une sécheresse oculaire est obtenue par applications biquotidiennes de BAK 0,2 % pendant sept jours (Lin et al., 2011).

Les avantages de ce modèle sont une mise en place rapide ne nécessitant pas de matériel particulier, un faible traumatisme pour l'animal (applications sous anesthésie courte), la possibilité de ne traiter qu'un œil et donc d'avoir un contrôle apparié, la stabilité du modèle après son induction permettant d'étudier l'effet de traitements contre l'œil sec.

4.4.3.3 Muc5b et syndrome de l'œil sec chez la souris

Les souris *Spdef*^{-/-} ont un phénotype de sécheresse oculaire moyenne avec une diminution de l'expression de *Muc5ac* et *Muc5b* (Marko et al., 2013). Cependant, il a été montré que l'inactivation de *Muc5ac* ou de *Muc5b* n'est pas suffisante pour observer des signes de sécheresse oculaire (Marko et al., 2014), malgré des signes

de modification de la surface oculaire observés chez quelques souris *Muc5ac*^{-/-} (11 % des souris étudiées) (Floyd et al., 2012). L'absence de *Muc5ac* est compensée par *Muc5b*, ce qui expliquerait le peu de symptômes oculaires observés chez les souris *Muc5ac*^{-/-} (Marko et al., 2014).

Par contre, dans un modèle d'œil sec par évaporation (souris sans glandes de Meibomius), il a été montré une augmentation de l'expression de *Muc5ac* et *Muc5b* suggérant que la réaction des cellules en calice serait différente suivant que la sécheresse oculaire est due à une déficience aqueuse ou à une évaporation excessive (Wang et al., 2016).

4.5 MUC5B et pathologies otologiques

Parmi les affections touchant l'oreille moyenne, on trouve la perforation du tympan, l'otite moyenne aiguë, l'otite moyenne séromuqueuse et l'otite moyenne chronique. Seules les otites moyennes impliquent les mucines dans leur pathogénie.

L'otite moyenne, quel que soit son type, est caractérisée par une hyperplasie agressive de la muqueuse de l'oreille moyenne (augmentation du nombre de cellules ciliées et de cellules caliciformes) qui transforme l'épithélium simple en un épithélium pseudo-stratifié avec un stroma qui s'élargit et une néovascularisation. Lorsque l'otite est résolue, la muqueuse retrouve rapidement son aspect normal.

4.5.1 L'otite moyenne

4.5.1.1 L'otite moyenne aiguë

L'otite moyenne aiguë est due à une infection aiguë causée par la pénétration de bactéries (généralement *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* ou *Streptococcus pneumoniae*) dans l'oreille moyenne via la trompe d'Eustache ou le tympan si celui-ci est perforé. Elle se caractérise par la présence d'un exsudat purulent et d'une surdité de transmission (Brunner et al., 2006).

4.5.1.2 L'otite moyenne séromuqueuse

L'otite moyenne séromuqueuse, ou avec épanchement, se caractérise par la présence de liquide dans l'oreille moyenne depuis plus de 3 mois sans infection

déTECTABLE et est la première cause de surdité chez les enfants dans les pays développés. Ces effusions sont principalement composées d'eau, de cellules, de débris cellulaires, d'électrolytes, de mucines, de protéines, de lipides, d'ADN, de sous-produits bactériens, d'immunoglobulines, de lysozyme, d'éléments du complément, de leukotri nes et de cytokines (TNF , IL-1  et IL-8) (Kubba et al., 2000).

On distingue deux types d'effusions : les effusions séreuses et les effusions visqueuses. Les effusions visqueuses sont plus riches en mucines, bactéries, endotoxines bactériennes et facteurs inflammatoires que les effusions séreuses. Les deux types d'effusions peuvent être retrouvés chez le même patient, chacune dans une oreille, ou dans la même oreille en cas de récidive. L'otite moyenne à effusion visqueuse serait principalement due à un stimulus inflammatoire, entraînant l'infiltration de cellules plasmatiques et de lymphocytes, et induisant la m t plasia de l'épithélium de l'oreille moyenne en un épithélium de type sécréteur avec une prolifération des cellules caliciformes et des glandes à mucus. L'otite moyenne à effusion séreuse serait, quant à elle, principalement due à un dysfonctionnement ou à une obstruction de la trompe d'Eustache (Kubba et al., 2000).

4.5.1.3 L'otite moyenne chronique

L'otite moyenne chronique correspond à des poussées répétées d'otites moyennes aiguës qui vont provoquer des lésions irréversibles des tissus (destruction des osselets et atteinte de la masto ide) et une perforation permanente du tympan conduisant à une perte d'audition plus ou moins grave (Brunner et al., 2006). Environ 10 % des otites moyennes aiguës dérivent en otites moyennes chroniques. Les otites moyennes chroniques sont dues à une hyperproduction ou à une production anormale de mucines dans l'oreille moyenne, empêchant ainsi le bon fonctionnement du transport mucociliaire. L'accumulation de fluide dans l'oreille moyenne favoriserait alors les infections à répétition (Lin et al., 2001).

4.5.2 MUC5B et otite moyenne

Dans les effusions d'otite moyenne, il a été montré une prévalence de

MUC5B, que l'otite soit chronique (Preciado et al., 2010) ou non (Elsheikh and Mahfouz, 2006). Dans le cas d'otites moyennes chroniques, il a été montré une surproduction de MUC5B dans l'oreille moyenne, accompagnée d'une hyperplasie des cellules caliciformes. Cette hyperproduction de MUC5B s'accompagne d'une production de la mucine membranaire MUC4, qui n'est pas exprimée par l'oreille moyenne en conditions normales (Lin et al., 2003, 2001). MUC5AC est également parfois détectée, en plus de MUC5B, dans certaines effusions d'otite moyenne chronique (Preciado et al., 2010).

En plus des mucines, les effusions d'otite séromuqueuse contiennent des cytokines dont le TNF α , l'IL-1 β et l'IL-8 (Kubba et al., 2000). Des études *in vitro* ont montré sur des cellules HMEEC-1 que le TNF α et l'IL-1 β stimulent la production d'IL-8 et que cette dernière stimule la sécrétion de MUC5AC et de MUC5B. De plus, cette stimulation de la sécrétion des mucines gélifiantes par l'IL-8 est persistante dans le temps et pourrait être un facteur d'évolution vers une forme chronique de l'otite (Smirnova et al., 2002).

4.5.3 Chez la souris

4.5.3.1 Modèles murins d'otite moyenne

Les modèles animaux privilégiés pour l'étude de l'otite moyenne sont le chinchilla, le rat et la gerbille. Jusqu'au début des années 2000, la souris était très peu utilisée, principalement à cause du très faible volume de l'oreille moyenne de la souris adulte (5-6 μ L) comparé à celles des autres espèces. Néanmoins, la diversité des réactifs disponibles et la possibilité de créer des modèles génétiquement modifiés font que la souris est de plus en plus considérée.

Chez la souris, l'otite moyenne est induite par inoculation directe de bactéries inactivées ou vivantes dans la cavité tympanique (avec ou sans obstruction de la trompe d'Eustache), par inoculations intranasales répétées, par inoculation intranasale avec infection virale conjointe ou par inoculation intranasale accompagnée d'un barotraumatisme (augmentation de la pression de l'air ambiant) (Ryan et al., 2006; Sabirov and Metzger, 2008). Ces modèles ne permettent d'étudier

que les otites induites par *H. influenzae* ou *S. pneumoniae*. Contrairement au rat, la souris n'est pas sensible aux infections par *M. catarrhalis* (Sabirov and Metzger, 2008).

Il a été montré le développement d'otites moyennes spontanées chez les souris avec une mutation sur l'un des gènes suivants : *Eya4*, *Tlr4*, *p73*, *MyD88*, *Fas*, *E2f4*, *Plg*, *Fbxo11* et *Evi1* (Rye et al., 2011). Il a aussi été montré le développement spontané d'otites moyennes chez les souris *Rpl38^{-/-}* (Noben-Trauth and Latoche, 2011), *Lmna^{Dhe/+}* (Zhang et al., 2012), *Oxgr1^{-/-}* (Kerschner et al., 2013), *Mcp1^{tm1a/tm1a}* (Chen et al., 2013), *Muc5b^{-/-}* (Roy et al., 2014), *Splunc1^{-/-}* (Bartlett et al., 2015) et dans un modèle murin du syndrome de CHARGE obtenu par mutation spontanée du gène *Chd7* (Tian et al., 2012).

4.5.3.2 *Muc5b* et otite moyenne

Dans un modèle murin du syndrome de CHARGE obtenu par mutation spontanée du gène *Chd7*, il a été montré que ces souris développent spontanément des otites avec une sur-expression de *Muc5b* et *Muc5ac* comparées aux souris de type sauvage (Tian et al., 2012). Une tendance à l'augmentation de l'expression de *Muc5b*, ainsi que de *Muc19* mais pas de *Muc5ac*, est également observée dans les effusions d'otites moyennes spontanées chez les souris *Oxgr1^{-/-}* (Kerschner et al., 2013).

In vitro, il a été montré que des bactéries pathogènes (*H. influenzae*) et non pathogènes (*Staphylococcus epidermidis*) participent au développement de l'otite moyenne en induisant une augmentation de l'expression de *Muc5ac* et de *Muc5b* dans des cellules murines immortalisées d'épithélium d'oreille moyenne (Val et al., 2015a, 2015b). *H. influenzae* active différemment les mucines ; *Muc5ac* est exprimé plus précocement que *Muc5b* qui va plutôt avoir une réponse chronique suite à une stimulation bactérienne (Val et al., 2015a). L'induction de l'expression des mucines *Muc5b* et *Muc5ac* se ferait, au moins en partie, via les voies de signalisation impliquant NFκB et TLR2 (Han et al., 2009; Preciado et al., 2008).

4.6 MUC5B et pathologies salivaires

Les principales causes d'une sécheresse buccale sont le syndrome de Sjögren, la destruction des glandes salivaires suite à un traitement par radiations et certains médicaments. Quelle que soit la cause de la sécheresse buccale, une diminution de la quantité de salive sécrétée est observée, sans changement de la concentration en MUC5B dans la salive non stimulée, car sa sécrétion est diminuée (Almståhl et al., 2001).

4.6.1 Le syndrome de Sjögren

Le syndrome de Sjögren est une maladie exocrine auto-immune, induisant une altération de la sécrétion de la salive et des larmes et aboutissant à une sécheresse grave de la bouche et des yeux. Il peut être organe spécifique ou avoir une atteinte systémique et toucher les systèmes musculo-squelettique, pulmonaire, gastro-intestinal, hématologique, vasculaire, dermatologique, rénal et nerveux. Il est dit primaire quand il apparaît seul, ou secondaire lorsqu'il est associé à une autre maladie auto-immune (Anaya and Talal, 1999).

La prévalence du syndrome de Sjögren est de 60 cas pour 100 000 habitants. Il touche principalement les femmes avec un ratio hommes:femmes de 1:10 (Ferro et al., 2016). Le diagnostic du syndrome de Sjögren est difficile et généralement très tardif par rapport aux premiers symptômes qui sont relativement légers. La complexité des symptômes et la chronicité de la maladie conduisent à une diminution de la qualité de vie des patients (Anaya and Talal, 1999).

Des facteurs génétiques et non-génétiques sont impliqués dans la susceptibilité et dans le développement de la maladie. Il a été montré une forte corrélation entre le locus HLA-DRB1*0803 et la susceptibilité de la population chinoise à être atteinte d'un syndrome de Sjögren (Huang et al., 2015). Il a également été rapporté des altérations de la méthylation de l'ADN des lymphocytes B de patients. La sur-activité de l'interféron serait associée à des phénotypes graves de la maladie, caractérisés par une salivation défectueuse, une sécheresse oculaire, un score focus (nombre d'infiltrats de mononucléaires

contenant au moins 50 cellules inflammatoires dans une section de glande de 4 mm²) augmenté, une leucopénie, des anticorps SSA, un titre élevé d'anticorps antinucléaires et une hypergammaglobulinémie (Ferro et al., 2016).

4.6.2 MUC5B dans les sécheresses buccales

La concentration en mucines (MUC5B et MUC7) est généralement considérée comme similaire ou augmentée chez les patients atteints du syndrome de Sjögren (Alliende et al., 2008; Chaudhury et al., 2015; Saari et al., 1997). Par contre, des modifications de la structure des mucines ont été observées. Des modifications de glycosylations de MUC5B et de MUC7 ont été rapportées, entraînant une diminution de l'élasticité du mucus (Chaudhury et al., 2015). Il a également été noté une diminution de la sulfatation de MUC5B dans les acini muqueux des glandes salivaires labiales des patients (Alliende et al., 2008). Ces modifications de structure des mucines, notamment de MUC5B, seraient à l'origine de la perte des propriétés de lubrification et d'adhésion/rétention de la salive dans les cas de sécheresse buccale.

Une diminution de la concentration en MUC5B est observée spécifiquement dans la partie antérieure de la langue, zone particulièrement riche en MUC5B en condition normale (Pramanik et al., 2010).

4.6.3 Chez la souris

Différents modèles murins du syndrome de Sjögren primaire et secondaire ont été développés (Lavoie et al., 2011) mais l'implication des mucines dans ces modèles n'a pas été étudiée.

4.7 MUC5B et pathologies biliaires

Les pathologies biliaires touchent, soit les voies biliaires, soit la fabrication de la bile. Parmi elles, on trouve la rétention biliaire, des tumeurs et la lithiase biliaire. Une hypersécrétion des mucines gélifiantes participe à la pathogénie de la lithiase biliaire.

4.7.1 La lithiase biliaire

Il est connu qu'une hypersécrétion de mucines gélifiantes participe à la pathogénie de la lithiase biliaire, qui correspond à la formation de calculs (calculs de cholestérol dans 85 % des cas) dans les voies et la vésicule biliaires. Aux USA, la lithiase biliaire est la principale maladie digestive, la plus coûteuse, et touche au moins 20 millions d'américains. La prévalence de cette maladie augmente avec le nombre d'obèses dans la population. La formation de calculs biliaires est principalement due à l'hypersécrétion de cholestérol hépatique dans la bile, mais parfois aussi à une hyposécrétion de sels biliaires et/ou de phospholipides. Les autres anomalies de la vésicule biliaire qui participent à la formation des calculs sont l'hypomotilité de la vésicule biliaire, un processus inflammatoire, une hypersécrétion de mucines gélifiantes et une accélération des phases de transition (Wang et al., 2009).

4.7.2 Implication de MUC5B dans la lithiase biliaire

Une sur-expression de MUC2, MUC3, MUC5AC, MUC5B et MUC6 dans des calculs à l'intérieur des voies biliaires intrahépatiques a été montrée (Sasaki et al., 1998; Shoda et al., 1999). Cependant, il est supposé que l'expression fortement augmentée de MUC2 et MUC5AC pourrait être à l'origine de la formation de ces calculs, sans implication de MUC5B qui est déjà fortement produite en condition normale (Sasaki et al., 1998).

4.7.3 Modèles murins de la lithiase biliaire

Le modèle le plus utilisé pour induire la formation de calculs biliaires chez la souris est l'utilisation d'un régime lithogénique contenant au moins 1 % de cholestérol et 0,5 % d'acide cholique (Lee, 1981). Il a également été montré une formation spontanée de calculs biliaires chez les souris nb/nb (Trotman et al., 1980).

Malgré une sur-expression de MUC5B observée dans des calculs biliaires, l'implication de Muc5b murine dans la lithiase biliaire n'a jamais été étudiée. Les recherches sont uniquement focalisées sur les rôles de Muc5ac et Muc4.

4.8 MUC5B et pathologies du tractus génital féminin

4.8.1 Vaginoses

La flore vaginale normale est constituée de bactéries aérobies et anaérobies, avec une prédominance des lactobacilles (plus de 95 % des bactéries présentes) qui participent à la défense contre les infections en maintenant le pH acide et une quantité suffisante de peroxyde d'hydrogène dans le vagin. La vaginose bactérienne est un syndrome polymicrobien qui résulte en une diminution de la concentration en lactobacilles et une augmentation de bactéries pathogènes, principalement anaérobies (Yudin et al., 2008).

Chez des patientes atteintes de vaginoses bactériennes, il a été montré une plus grande fréquence de bactéries produisant des enzymes de dégradation des mucines comme des sialidases, l' α -fucosidase, des galactosidases, la N-acétylglucosaminidase et des aminopeptidases. Parmi les bactéries produisant ces enzymes, on trouve des *Prevotella*, des *Bacteroides* et *Gardnerella vaginalis* (Briselden et al., 1992; Cauci et al., 1998; Howe et al., 1999; McGregor et al., 1994; Olmsted et al., 2003). De plus, il a été montré une plus faible viscosité des sécrétions vaginales de femmes ayant des vaginoses bactériennes par rapport à celles de femmes ayant une flore normale avec une prédominance de lactobacilles (Olmsted et al., 2003). Il est connu que les vaginoses bactériennes augmentent le risque d'accouchements prématurés, de fausses couches tardives et d'infections maternelles dans le post-partum. Par contre, aucun lien n'a été montré entre vaginose bactérienne et infection néonatale ou mortalité périnatale (Menard and Bretelle, 2012).

4.8.2 Accouchement prématuré

Chez la femme, l'accouchement prématuré, ou avant 37 semaines de grossesse, est fréquemment lié à l'invasion bactérienne de la cavité utérine, normalement stérile, par des bactéries venant du vagin colonisé. Cette infection s'accompagne d'une inflammation du liquide amniotique et du mucus cervical.

L'attention s'est donc portée sur le cervix, qui relie l'utérus au vagin, comme

porte d'entrée des bactéries dans la cavité utérine. Il a été montré que le risque d'accouchements prématurés est augmenté chez les femmes ayant un cervix court (Iams et al., 1996). De plus, chez des femmes à haut risque d'accouchement prématuré (admisses en maternité pour une suspicion de début de travail entre la 20^{ème} et la 34^{ème} semaine de grossesse), il a été montré que le mucus de leur bouchon muqueux est plus translucide, plus extensible et plus perméable que celui de femmes à faible risque d'accouchement prématuré, et que ses propriétés rhéologiques et viscoélastiques se rapprochent de celles du mucus ovulatoire (**Figure 31**) (Critchfield et al., 2013).

4.8.3 Infertilité féminine

En conditions normales, le mucus cervical a, à la fois, un rôle facilitateur de progression des spermatozoïdes vers l'ovule en période ovulatoire et un rôle de filtre en immobilisant les spermatozoïdes anormaux. Cependant, il a été mis en évidence que le mucus cervical peut être une cause d'infertilité, en raison d'une mauvaise quantité et/ou qualité de mucus. On parle alors de mucus hostile. Ce mucus cervical anormal va induire une perte de mobilité ou une agglutination des spermatozoïdes, voir leur totale immobilisation. Un déficit en acide sialique, la présence d'anticorps contre l'acide sialique, la présence d'anticorps contre des cellules désialylées, la présence d'anticorps contre des bactéries ayant une réaction croisée avec les spermatozoïdes ou un changement de pH dû à une modification de la flore en lactobacilles seraient des causes possibles d'un mucus cervical hostile (Daunter and Khoo, 1984).

4.8.4 Implication de MUC5B dans les pathologies du tractus génital féminin

Malgré le rôle important des mucines, et notamment de MUC5B, dans les changements rhéologiques du mucus cervical au cours du cycle, sa possible implication dans des pathologies du tractus reproducteur féminin n'a pas encore été étudiée.

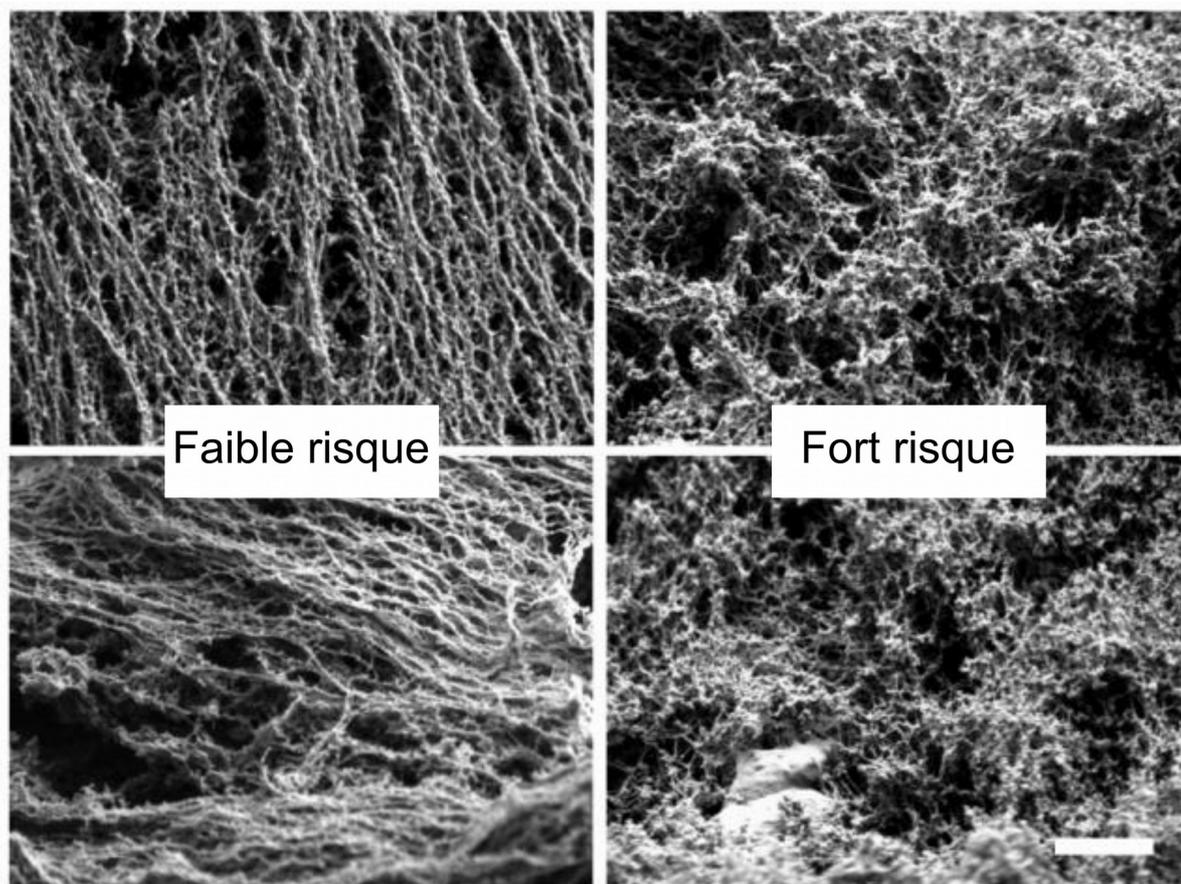


Figure 31 : Vue en microscopie électronique de mucus cervical à haut et faible risque d'accouchement prématuré.

Adapté de (Critchfield et al., 2013).

4.8.5 Chez la souris

L'expression normale de Muc5b dans le tractus reproducteur murin est peu étudiée et son niveau d'expression en fonction du cycle œstral n'est pas connue. La possible implication de Muc5b dans des pathologies du tractus reproducteur reste inconnue chez la souris.

4.9 Conclusion

Alors que de nombreux modèles murins ont été développés pour étudier les pathologies dans lesquelles MUC5B est impliquée ou potentiellement impliquée, peu d'intérêt a été porté à l'étude des mucines gélifiantes jusqu'à présent dans ces modèles. Ceci est en partie dû à la difficulté à étudier ces macromolécules et au manque d'outils moléculaires.

Le développement de lignées murines génétiquement modifiées sur les gènes codant les mucines gélifiantes, dont Muc5b, doit permettre d'étudier plus facilement leur rôle dans la physiologie et les situations pathologiques.

5 Modèles murins d'étude de MUC5B

De par leur grande taille et leur forte O-glycosylation, les mucines sont particulièrement difficiles à étudier au niveau protéique. Dans le cas de la mucine murine Muc5b, il n'existait pas, au moins jusqu'à récemment, d'anticorps commercial de référence permettant un dosage et une visualisation précise de la protéine dans les tissus de souris. Dans certaines études, la mucine murine Muc5b est marquée en utilisant un anticorps dirigé contre le domaine D4 de la mucine humaine MUC5B (Marko et al., 2014). Cependant, la séquence contre laquelle est dirigé cet anticorps ne partage que 47 % de similarité avec son orthologue murin. Pour pallier ce manque d'anticorps de référence, le laboratoire a développé un anticorps anti-Muc5b dirigé contre une courte séquence peptidique retrouvée dans plusieurs domaines CYS de la mucine murine (Valque et al., 2011).

Une autre méthode pour mettre en évidence le rôle d'une protéine est l'utilisation de lignées de souris génétiquement modifiées pour cette protéine. Pour étudier le rôle physiologique de Muc5b, une lignée invalidée pour le gène *Muc5b* et une lignée sur-exprimant *Muc5b* ont été créées (Roy et al., 2014).

5.1 Lignée murine invalidée pour le gène Muc5b

Pour étudier le rôle de Muc5b dans la clairance mucociliaire des voies respiratoires, une souris déficiente pour *Muc5b* a été développée par excision de l'exon 1 (Roy et al., 2014).

Cette lignée est viable, mais il a été observé une diminution de la survie des souris et un retard de croissance. Alors que des cellules ciliées fonctionnelles sont bien présentes, les souris *Muc5b*^{-/-} ont une clairance mucociliaire diminuée. La majorité des souris *Muc5b*^{-/-} ont des difficultés respiratoires et une hypoxie dues à l'obstruction des voies respiratoires supérieures (présence de fragments de poils englués dans du mucus dans la partie postérieure du nasopharynx). Dans les voies respiratoires inférieures, il a été observé la présence de matériel inhalé et d'un infiltrat inflammatoire avec notamment une accumulation de macrophages apoptotiques, une capacité de phagocytose altérée et une diminution de la

production d'IL-23 (cytokine anti-inflammatoire). Chez les souris *Muc5b*^{-/-} moribondes, la charge bactérienne est très augmentée dans le poumon (principalement *Streptococcus acidominimus* et *Staphylococcus aureus*) et dans la rate (présence de *S. aureus*). Cette bactériémie serait la cause de la mortalité des souris *Muc5b*^{-/-}, car l'utilisation d'antibiotiques permet d'améliorer la survie des souris, sans modifier leurs capacités respiratoires (Roy et al., 2014). Il a également été montré que les souris *Muc5b*^{-/-} ne sont pas protégées contre le phénotype asthmatique ; un challenge allergique entraîne une inflammation exagérée (Raclawska et al., 2016).

Dans l'oreille moyenne, il a été montré que des souris *Muc5b*^{-/-} peuvent développer spontanément des otites moyennes avec effusion (fragments de poils englués dans du mucus, bactéries et inflammation) (Roy et al., 2014).

Dans l'œil, il a été montré que l'inactivation de *Muc5b* n'est pas suffisante pour observer des signes de sécheresse oculaire et que l'absence de *Muc5b* n'est pas compensée par une augmentation de la production de *Muc5ac* (Marko et al., 2014).

5.2 Lignée sur-exprimant *Muc5b* dans le poumon

Pour étudier l'implication de *Muc5b* dans les maladies respiratoires obstructives, une lignée sur-exprimant *Muc5b* spécifiquement dans le poumon (*Scgb1a1-Muc5b*) a été développée (Roy et al., 2014).

Les souris de la lignée *Scgb1a1-Muc5b* ne développent pas de phénotype particulier (pas de mortalité, pas de retard de croissance, pas d'altération de la clairance mucociliaire) et répondent plus efficacement face à une infection à *S. aureus* en augmentant la production d'IL-23 (cytokine anti-inflammatoire), l'activation des macrophages et l'élimination de la bactérie (Roy et al., 2014).

STRATÉGIE DE L'ÉTUDE

La mucine MUC5B, l'une des cinq mucines gélifiantes, participe aux propriétés rhéologiques du gel de mucus et est sécrétée dans les voies respiratoires, les glandes salivaires, l'oreille moyenne, la vésicule biliaire, le tractus reproducteur féminin et l'œil. Le large profil d'expression de la mucine et les nombreuses associations qui existent entre la production des mucines gélifiantes et les pathologies qui touchent les muqueuses sécrétoires sont autant d'arguments justifiant d'étudier les mucines. La très grande similarité en termes de structure de l'apomucine humaine et murine *Muc5b*, ainsi que des profils d'expression similaires, démontrent l'intérêt du modèle murin pour étudier la mucine dans ces pathologies.

Mon travail de thèse s'organise autour deux axes :

1. Développement d'un modèle préclinique d'étude de *Muc5b*

Nous avons développé un modèle murin pour lequel le produit du gène *Muc5b* a été couplé avec une protéine fluorescente, la GFP (pour « Green Fluorescent Protein »), afin de suivre la localisation/production/sécrétion de la mucine *in vivo* chez la souris quel que soit son âge. Le but de ce travail, en plus d'étudier le profil d'expression normale de *Muc5b* chez la souris, est d'établir la preuve de concept que ce modèle murin est un outil préclinique d'étude de l'efficacité de traitements ciblant spécifiquement la production de MUC5B et la différenciation des cellules caliciformes. Ce modèle murin a été construit de manière à également pouvoir disposer de lignées transgéniques déficientes pour le gène *Muc5b*, en croisant les souris *Muc5b*-GFP avec des souris transgéniques pour la recombinaison *Cre*, afin d'étudier le rôle de la mucine *Muc5b*.

2. Régulation nutritionnelle de *Muc5b* dans la mucoviscidose

Nous avons étudié l'effet d'une supplémentation en acides gras polyinsaturés à longues chaînes (AGPI LC) (n-3) sur le phénotype respiratoire de souris *Cftr* Δ F508 avant et après induction d'une inflammation pulmonaire aiguë. Le but de ce travail

est de montrer que les AGPI LC (n-3) permettent de diminuer la sur-expression de Muc5b et d'améliorer l'histologie pulmonaire dans la mucoviscidose.

RÉSULTATS

1 Caractérisation de la lignée murine Muc5b-GFP

1.1 Introduction

De par leur haut poids moléculaire et leur forte O-glycosylation, les mucines sont relativement difficiles à étudier à l'état protéique. Nous avons créé, par recombinaison homologe, une souris dont le produit du gène *Muc5b* est fusionné à une molécule fluorescente (GFP pour « Green fluorescent protein »). La GFP couplée à la mucine Muc5b permet une visualisation des cellules à mucus productrices de Muc5b, notamment par immunohistochimie (IHC) sur tissus fixés, par stéréomicroscopie à fluorescence sur tissus frais et par endomicroscopie confocale fibrée à fluorescence (Cellvizio, Mauna Kea Technologies) sur souris anesthésiées.

Les buts de cette étude étaient :

- de caractériser le profil d'expression protéique de la mucine Muc5b chez la souris, grâce à la lignée Muc5b-GFP ;
- de montrer, grâce à la souris Muc5b-GFP, que Muc5b est un biomarqueur permettant de suivre *in vivo* la densité des cellules à mucus dans l'œil, dans des modèles pathologiques et sous traitements pharmacologiques.

Les résultats de la caractérisation de la lignée murine Muc5b-GFP ont permis la rédaction de deux articles scientifiques qui ont été soumis pour publication dans des journaux à comité de lecture. L'article intitulé « Preclinical mouse model to monitor live conjunctival goblet cell density under pharmacological treatments » est présenté en **Annexe 1**. L'article intitulé « In vivo imaging of the Muc5b gel-forming mucin » est présenté en **Annexe 2**. Les résultats de ces deux articles sont présentés en français ci-dessous. Les matériels et méthodes et les discussions sont dans les **Annexes 1 et 2**.

1.2 Construction de la souris *Muc5b*-GFP

La stratégie de construction de la souris *Muc5b*-GFP knock-in (KI) a été conçue en collaboration avec la société genOway (Lyon, France). L'unique codon stop du gène *Muc5b* a été remplacé par une séquence nucléique synthétique codant un peptide Gly-Ser-Ile-Ala-Thr suivi de la séquence codant la eGFP monomérique. Cette séquence, dans le cadre de *Muc5b*, est localisée dans le dernier exon (exon 49) du gène. De plus, des sites loxP ont été insérés de part et d'autre d'une région génomique de 2,2 kb, comprenant les deux derniers exons 48 et 49, afin de créer une lignée KO. Une cassette de sélection *Neo*, flanquée de part et d'autre par deux séquences FRT, a été insérée en aval du dernier exon de *Muc5b* (**Figure 32a**). Les brins courts et longs des séquences homologues ont été obtenus par PCR à partir d'ADN extrait de cellules embryonnaires 129Sv/Pas en utilisant la Taq polymérase « Accuprime Taq DNA Polymerase High Fidelity » (Invitrogen). Les produits de PCR ont été sous-clonés dans un vecteur pCR4-TOPO (Invitrogène) par TA-cloning. Les séquences d'ADN génomique des cellules 129Sv/Pas amplifiées par PCR ont dans un premier temps été séquencées et alignées les unes par rapport aux autres pour identifier des mutations putatives introduites par les différentes étapes d'amplification par PCR.

La plus courte séquence homologue, contenant la séquence en aval de l'exon 49, a une longueur de 2197 pb et a été amplifiée en utilisant les amorces suivantes : 5'-GCACTGCTCAAACACCAAGAGGCTG-3' (sens) et 5'-GGAGGTCAGAGGACAACCTTTGGAGTCA-3' (anti-sens). La plus longue séquence a été amplifiée en deux étapes. Un fragment de 3135 paires de bases (pb) contenant les exons 38 à 47 ainsi que les séquences introniques voisines a été amplifié en utilisant les amorces 5'-CCCGCTTCCTTGGTTCTTCTGAACC-3' (sens) et 5'-GCTTTTGGTGGGAACTGGATGGAGC-3' (anti-sens) puis cloné pour générer la partie distale de la séquence homologue longue du vecteur de ciblage. Un fragment de 2184 pb contenant les exons 48 et 49 ainsi que les régions introniques voisines a été amplifié en utilisant les amorces 5'-AATACAAGTTTCTCCACGGGATGGC-3' (sens) et 5'-AAAGCACCTTCTCCACGTGTCTGC-3' (anti-sens) puis cloné pour

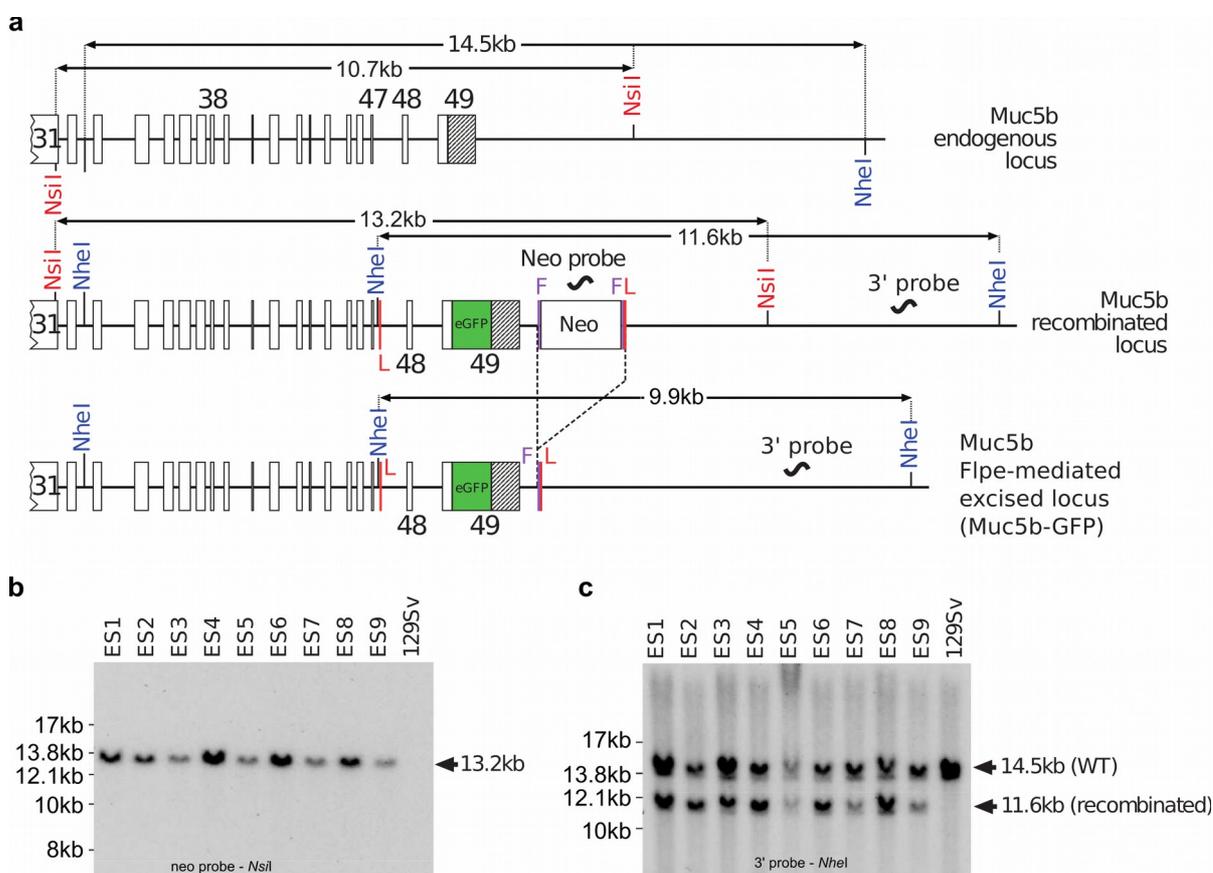


Figure 32 : Stratégie génétique d'obtention des clones ES.

(a) Carte des loci de Muc5b endogène, recombiné et Muc5b KI après excision par la Flpe de la cassette de sélection positive à la néomycine. Les sites FRT (F, lignes verticales violettes) et loxP (L, lignes verticales rouges) sont indiqués. Les sites loxP ne sont pas utilisés dans cette étude. Les sites de restriction de *NsiI* et *NheI* utilisés pour les Southern blot sont également indiqués. Le site de restriction *NheI* dans l'exon 47 n'existe pas dans l'allèle de type sauvage. La région unique non traduite (UTR), faisant partie de l'exon 49, est indiquée en hachuré.

(b) Analyse par Southern blot de la recombinaison homologue dans neuf clones ES. Les ADN génomiques des clones ES sont comparés à des ADN de type sauvage (cellules ES 1295vPas). Des événements de recombinaison homologues corrects sont indiqués par une bande de 13,2 kb obtenue par la sonde *Neo* sur des ADN digérés par *NsiI* alors qu'aucune bande n'est visible chez les contrôles de type sauvage comme attendu.

(c) Une bande de 11,6 kb (allèle recombinaison) et une bande de 14,5 kb (allèle de type sauvage, WT) sont obtenues grâce à la sonde externe 3' sur les ADN génomiques digérés par *NheI*.

générer la partie proximale de la séquence homologue longue. Les séquences 129Sv/Pas isolées sont alignées avec les séquences C57BL/6 disponibles dans les bases de données publiques et montrent qu'il n'y a pas de polymorphisme entre les deux fonds génétiques C57BL/6 et 129Sv/Pas.

Une construction complète contenant la séquence monomérique synthétique optimisée de la GFP, la cassette *Neo* anti-sens par rapport à *Muc5b* et les sites loxP a été générée. La qualité du vecteur de ciblage obtenu a été vérifiée par séquençage des exons, la jonction entre les séquences homologues et la cassette de sélection, la jonction entre les séquences homologues, le squelette du plasmide et la cassette rapportrice. L'électroporation dans les cellules souches embryonnaires (ES) 129Sv/Pas a été réalisée selon le protocole de genOway (10^8 cellules souches embryonnaires en présence de 100 μ g de 13,6 kb de plasmide linéarisé par *PmeI*, 260 Volts, 500 μ F). La sélection positive a débuté 48h après l'électroporation, par addition de 200 μ g/mL de G418 (150 μ g/mL de produit actif ; Life technologies, Inc). Au total, 262 clones résistants ont été isolés et amplifiés en plaques 96 puits. L'ensemble des plaques contenant les clones ES amplifiés sur gélatine ont été génotypés par PCR et Southern blot. Les clones isolés ont été criblés par PCR en utilisant les amorces 5'-GTGAGACGTGCTACTTCCATTTGTCACG-3' (sens) et 5'-GTTGTAAGTTCAGGCAAAGGATCAAGACG-3' (anti-sens, cassette *Neo*) pour vérifier la recombinaison homologue à l'extrémité 3' du locus de *Muc5b*. Trente clones positifs possédaient un produit d'amplification à la taille attendue de 3051 pb. Les clones recombinants identifiés par PCR ont ensuite été vérifiés par Southern blot, sur l'ADN des clones ES digéré par *NsiI*, en utilisant une sonde interne 5' localisée dans la cassette de sélection *Neo* du vecteur de ciblage (**Figure 32b**). Les événements de la recombinaison homologue de l'extrémité 3' du vecteur ont été vérifiés par Southern blot en digérant l'ADN par *NheI* et en hybridant une sonde externe en 3' localisée en aval de la séquence homologue du vecteur de ciblage (**Figure 32c**).

Trois clones recombinants positifs ont été injectés dans des blastocystes C57BL/6J qui ont ensuite été réimplantés dans des souris femelles pseudo-

gestantes OF1. Les mâles chimères obtenus ont été croisés avec des souris femelles C57BL/6 Flpe afin d'obtenir des souris knock-in hétérozygotes dont la cassette *Neo* a été excisée (*Muc5b*^{gfp/+}). Le génotype des souris fondatrices de la lignée a été vérifié par Southern blot en utilisant la sonde externe 3' et en digérant l'ADN génomique par *NheI* (**Figure 33a**). En routine, les génotypes des souris sont déterminés par PCR en utilisant les amorces 5'-GTCAGGCATCTCATGCTCACAAAAGC-3' (sens) et 5'-AGGATGTAGGGTCCTAGCACCAATGTAGC-3' (anti-sens) (**Figure 33b**).

Les souris *Muc5b*-GFP sont viables et fertiles à l'état homozygote et hétérozygote, et n'ont pas de phénotype particulier.

1.3 Profil d'expression de *Muc5b*

Pour obtenir le maximum d'information sur le profil de production de *Muc5b*, nous avons effectué des marquages immunohistochimiques sur des tissus adultes fixés en utilisant un anticorps commercial dirigé contre la GFP et un anticorps « maison » spécifiquement dirigé contre un peptide court trouvé dans trois domaines CYS de *Muc5b* (Valque et al., 2011) (**Figure 34a**).

Les deux anticorps montrent que *Muc5b* est produite par les cellules épithéliales de la trompe d'Eustache, de la bulle tympanique, de la trachée, des cornets de la cavité nasale, de la vésicule biliaire, de la bronche (**Figure 34b**) et du cervix (voir ci-dessous). Ces données valident notre souris transgénique comme rapporteur de *Muc5b* dans les tissus et confirment la spécificité de notre anticorps anti-*Muc5b*.

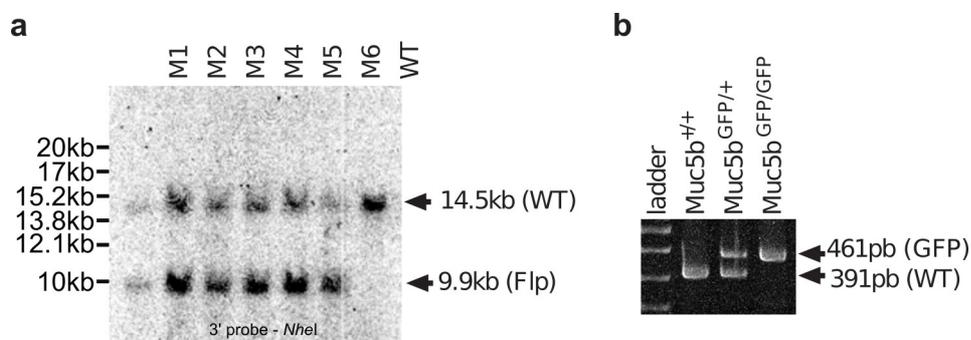
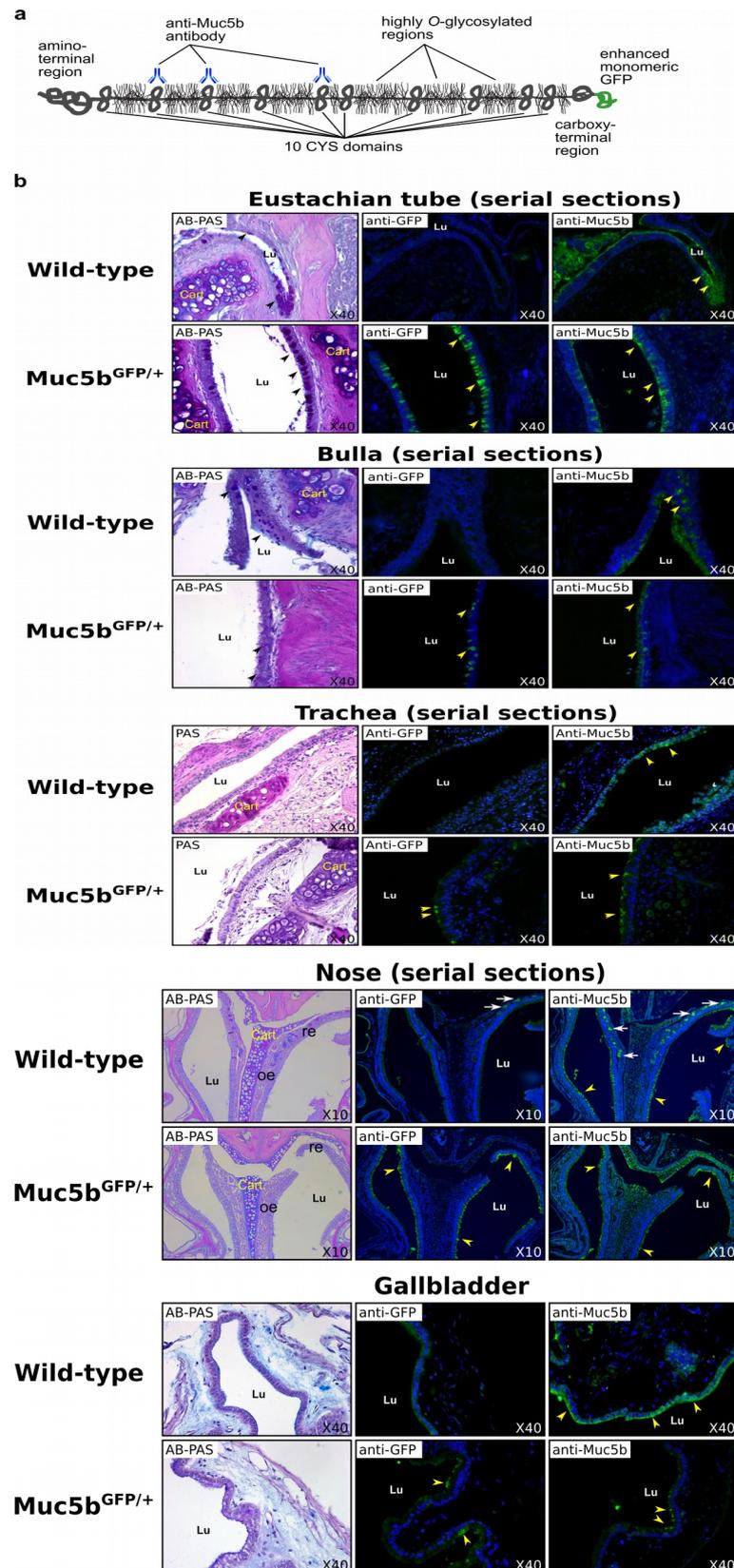


Figure 33 : Génération de la souris Muc5b-GFP.

(a) Analyse par Southern blot de six souris KI hétérozygotes après excision Flpe (M1 à 6). L'ADN génomique des souris testées est comparé à l'ADN d'une souris de type sauvage (WT). L'ADN digéré par *NheI* a été transféré sur une membrane en nylon et hybridé par la sonde externe 3', montrant une bande de 14,5 kb pour l'allèle de type sauvage et une bande de 9,9 kb pour l'allèle KI après excision de la cassette de sélection (Flp) en accord avec la carte de restriction de la **Figure 32a**.
 (b) Exemple de génotypage sur ADN extrait de biopsie de queue par PCR.



.../...

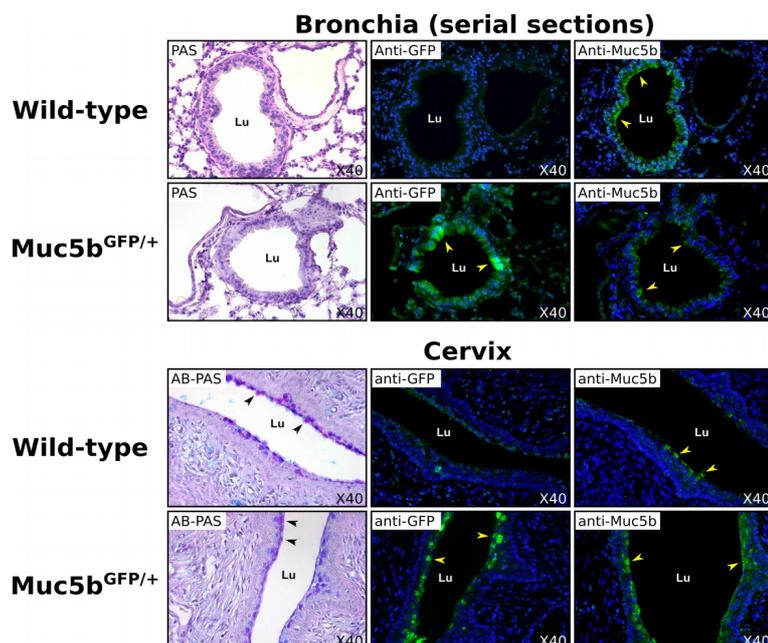


Figure 34 : Analyse par immunofluorescence de muqueuses produisant Muc5b.

(a) Représentation schématique de Muc5b couplé à la GFP. Muc5b forme des homopolymères grâce à ses régions amino- et carboxy-terminales. Ces deux régions encadrent la région centrale qui porte les chaînes O-glycosylées. La région centrale contient aussi dix copies du domaine CYS. L'anticorps spécifique anti-Muc5b est dirigé contre un court peptide trouvé dans les domaines CYS #2, 3 et 5 (Valque et al., 2011).

(b) Les tissus ont été inclus en paraffine et des images représentatives sont montrées. Des colorations de coupes histologiques à l'acide périodique–Schiff (PAS) ou au bleu alcian (AB)–PAS sont montrées, permettant la visualisation des cellules caliciformes. Les anticorps anti-Muc5b (vert) et anti-GFP (vert) ont le même profil d'expression dans tous les tissus étudiés (trompe d'Eustache, bulle tympanique, trachée, nez, vésicule biliaire, bronche, cervix) avec un signal plus intense avec l'anticorps anti-GFP. Aucun marquage de la GFP n'est observé chez les souris de type sauvage (wild-type). Les têtes de flèche noires indiquent les cellules caliciformes, les têtes de flèches jaunes indiquent Muc5b et les flèches blanches indiquent les glandes productrices de Muc5b. Les noyaux (bleu) sont contre-colorés au Hoechst 33528. Lu, lumière ; Cart, cartilage ; re, épithélium respiratoire ; oe, épithélium olfactif.

Dans l'œil, le nombre de cellules caliciformes conjonctivales (CCC) GFP⁺ représente près de 50 % du nombre de CCC total et le nombre de CCC Muc5ac⁺ représente 91,1 % des CCC totales (**Figure 35**). La co-localisation de Muc5ac et Muc5b dans les CCC par immunofluorescence montre que certaines CCC produisent uniquement Muc5ac, d'autres produisent uniquement Muc5b et enfin d'autres produisent les deux mucines gélifiantes. Le coefficient de corrélation de Spearman (r_s) entre les cellules AB-PAS et le nombre de cellules GFP⁺ montre une forte corrélation ($r_s=0,91$, bi-directionnel, $P=0,003$) soulignant le lien direct entre la densité de CCC totales et la densité de cellules Muc5b⁺.

Nous avons ensuite visualisé l'activité de fluorescence par stéréomicroscopie à épifluorescence sur des tissus excisés ayant une cavité épithéliale produisant Muc5b (IHC) et facilement accessibles pour ensuite pouvoir effectuer une visualisation endomicroscopique sur souris vivante (**Figure 36a**). En comparaison avec l'IHC, un intense signal est observé dans la trachée, l'oreille moyenne, le cervix, la cavité nasale (**Figure 36b**) et la conjonctive (**Figure 37a**), alors qu'aucune activité de la GFP n'est détectée chez les souris de type sauvage.

Enfin, nous avons étudié l'activité de la GFP par endomicroscopie fibrée confocale à fluorescence sur souris anesthésiées. Des images illustratives extraites des films enregistrés sont présentées dans les **Figures 36c et 37b**. Dans la trachée, l'activité de la GFP est principalement visible sous forme de longs filaments entremêlés. Dans la région cervicale et dans la cavité nasale, l'activité de la GFP est visualisée soit sous forme de points fluorescents, soit sous forme de longs filaments entremêlés comme dans la trachée. Dans l'œil, l'activité de la GFP est visualisée sous forme de points fluorescents. À cause d'une forte auto-fluorescence dans l'oreille, nous n'avons pas enregistré de films montrant une activité de la GFP suffisamment spécifique dans l'oreille moyenne. L'auto-fluorescence des poils et possiblement de débris celluloseux est également parfois visible chez les souris de type sauvage et les souris transgéniques. Globalement, ces données montrent que la GFP est facilement détectable par endomicroscopie fibrée confocale à fluorescence dans de nombreux tissus chez la souris anesthésiée.

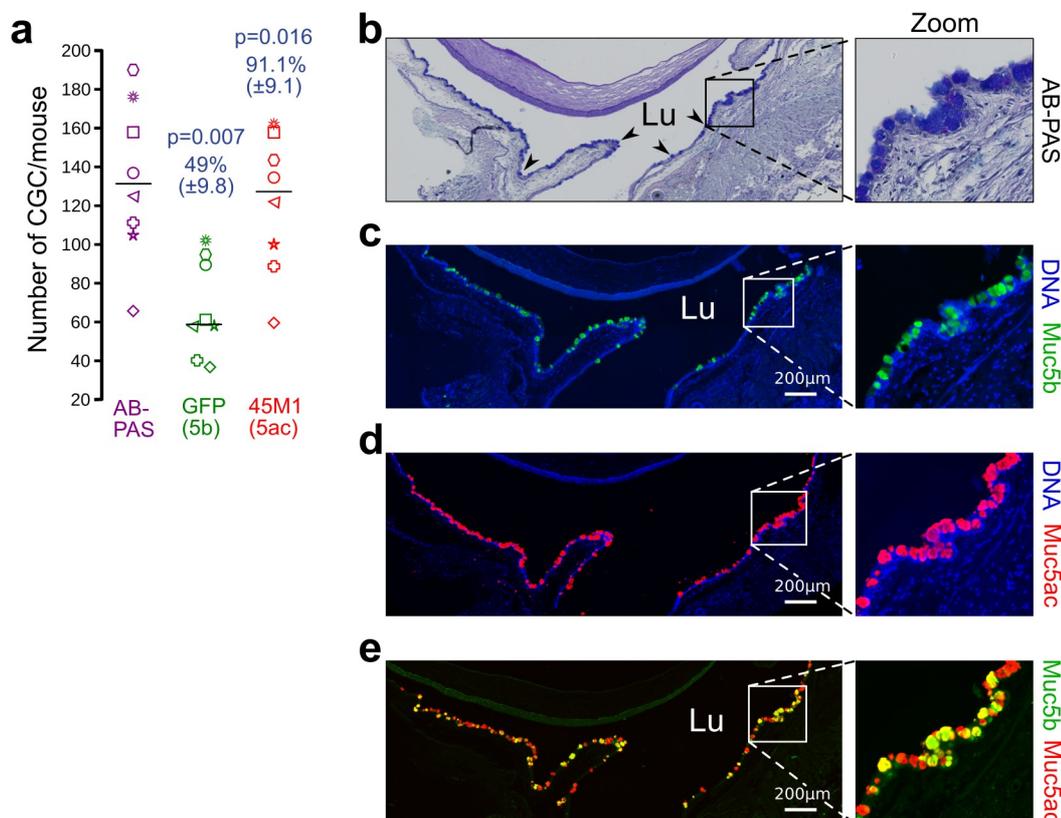


Figure 35 : Différentes sous-populations de cellules caliciformes conjonctivales.

(a) Les cellules caliciformes conjonctivales (CCC/CGC) totales, de CCC GFP⁺ (Muc5b) et 45M1⁺ (Muc5ac) sont comptées sur des coupes sériées d'œil de souris non traitées, une colorée à l'AB-PAS et les deux autres marquées par des anticorps anti-GFP et anti-Muc5ac (45M1). La moyenne des CCC Muc5b⁺ et Muc5ac⁺ représentent respectivement 49±9,8 % et 91,1±9,1 % des CCC totales (n=8 souris transgéniques, test de permutation bi-directionnel, $P=0,007$ pour les CCC Muc5b⁺ et $P=0,016$ pour les CCC Muc5ac⁺). Chaque symbole représente une souris.

(b-e) Coupes sériées histologiques (AB-PAS) et immunohistochimiques marquées par les anticorps anti-GFP (Muc5b, vert) et anti-Muc5ac (rouge) représentatives de conjonctives de souris Muc5b^{GFP/+} montrant les CCC GFP⁺ et Muc5ac⁺. Les têtes de flèche indiquent plusieurs cellules caliciformes de la conjonctive. Lu, lumière. Barre d'échelle, 200 µm.

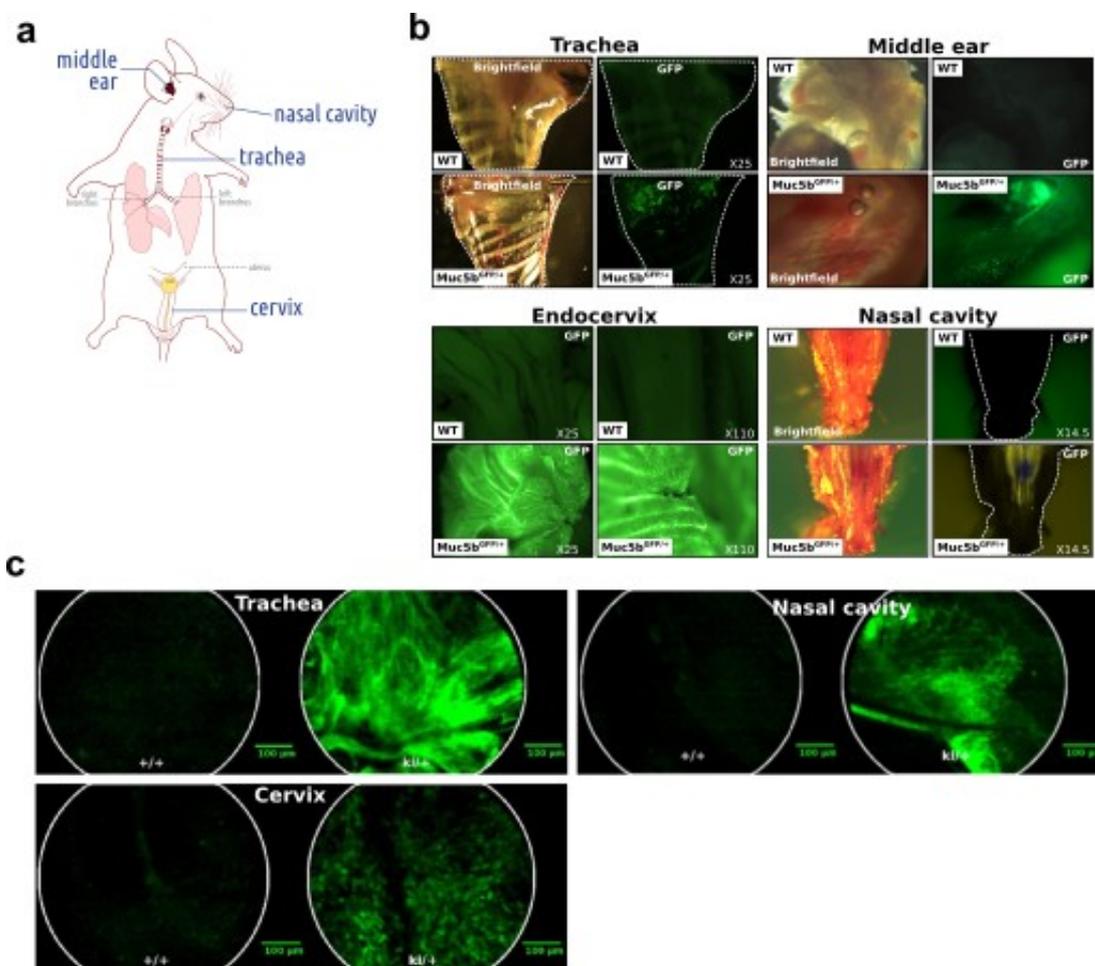


Figure 36 : Stéréomicroscopie et endomicroscopie à fluorescence.

(a) Représentation schématique des tissus facilement accessibles et qui ont été étudiés par endomicroscopie fibrée confocale à fluorescence.

(b) Exemples d'images représentatives obtenues par stéréomicroscopie sur tissus frais excisés de souris de type sauvage (WT) et transgéniques (Muc5b^{GFP/+}) en lumière blanche et sous excitation à 488 nm.

(c) Images extraites de films représentatifs d'endomicroscopies fibrées confocales à fluorescence.

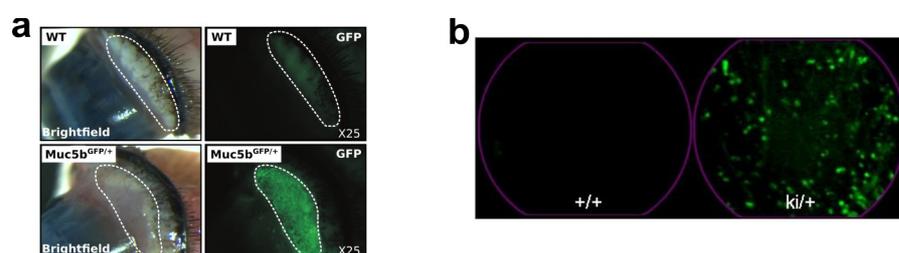


Figure 37 : Stéréomicroscopie et endomicroscopie à fluorescence dans la conjonctive.

(a) Exemples d'images représentatives obtenues par stéréomicroscopie sur conjonctives fraîches excisées de souris de type sauvage (WT) et transgéniques ($Muc5b^{GFP/+}$) en lumière blanche et sous excitation à 488 nm.

(b) Images extraites de films représentatifs d'endomicroscopies fibrées confocales à fluorescence chez une souris de type sauvage (+/+) et une souris transgénique (ki/+).

1.4 Régulation hormonale de la production de Muc5b-GFP au cours du cycle œstral

La production de Muc5b a été étudiée par IHC sur des coupes de tissus cervicaux de souris de type sauvage et de souris Muc5b-GFP en utilisant les anticorps anti-Muc5b et anti-GFP (**Figures 38a et 38b**). Aucune production de la GFP n'est détectée chez les souris de type sauvage et les deux anticorps reconnaissent du matériel à l'intérieur ou à la surface des cellules caliciformes des souris transgéniques. Ceci confirme la spécificité de l'anticorps anti-Muc5b et montre que Muc5b est produite dans le cervix murin.

Nous avons ensuite suivi la production de Muc5b par endomicroscopie fibrée confocale à fluorescence dans le vagin de souris anesthésiées, au cours des quatre phases du cycle œstral (**Figures 38c et 38d**). Nous notons une quasi absence de fluorescence en phase de met-œstrus, la présence d'un mucus fluorescent abondant en phase de pro-œstrus et un niveau d'activité de fluorescence intermédiaire en phases d'œstrus et de dis-œstrus. Trois observateurs indépendants ont scoré l'intensité de fluorescence de la GFP des différents films. Les coefficients de corrélation Cohen's kappa et les intervalles de confiance à 95 % sont respectivement de 0,69 [0,49 ; 0,90], 0,80 [0,62 ; 0,98] et 0,80 [0,61 ; 0,98] ($P < 0,0001$ pour toutes les comparaisons). Les scores montrent une relation parfaite entre les phases de pro- et met-œstrus, avec un pic de production de Muc5b en pro-œstrus (**Figure 38e**). Nous avons poursuivi notre étude par endomicroscopie fibrée confocale à fluorescence chez les souris Muc5b-GFP gestantes et avons observé la présence abondante d'un mucus épais fluorescent (**Figure 38f**). Ces données suggèrent que Muc5b est régulée hormonalement et montrent que l'endomicroscopie fibrée confocale à fluorescence est une méthode facile pour suivre le mucus cervical au cours du cycle œstral et pendant la gestation. Nos données suggèrent également que notre souris Muc5b-GFP est un bon modèle préclinique pour l'étude du mucus et des cellules caliciformes dans le vagin.

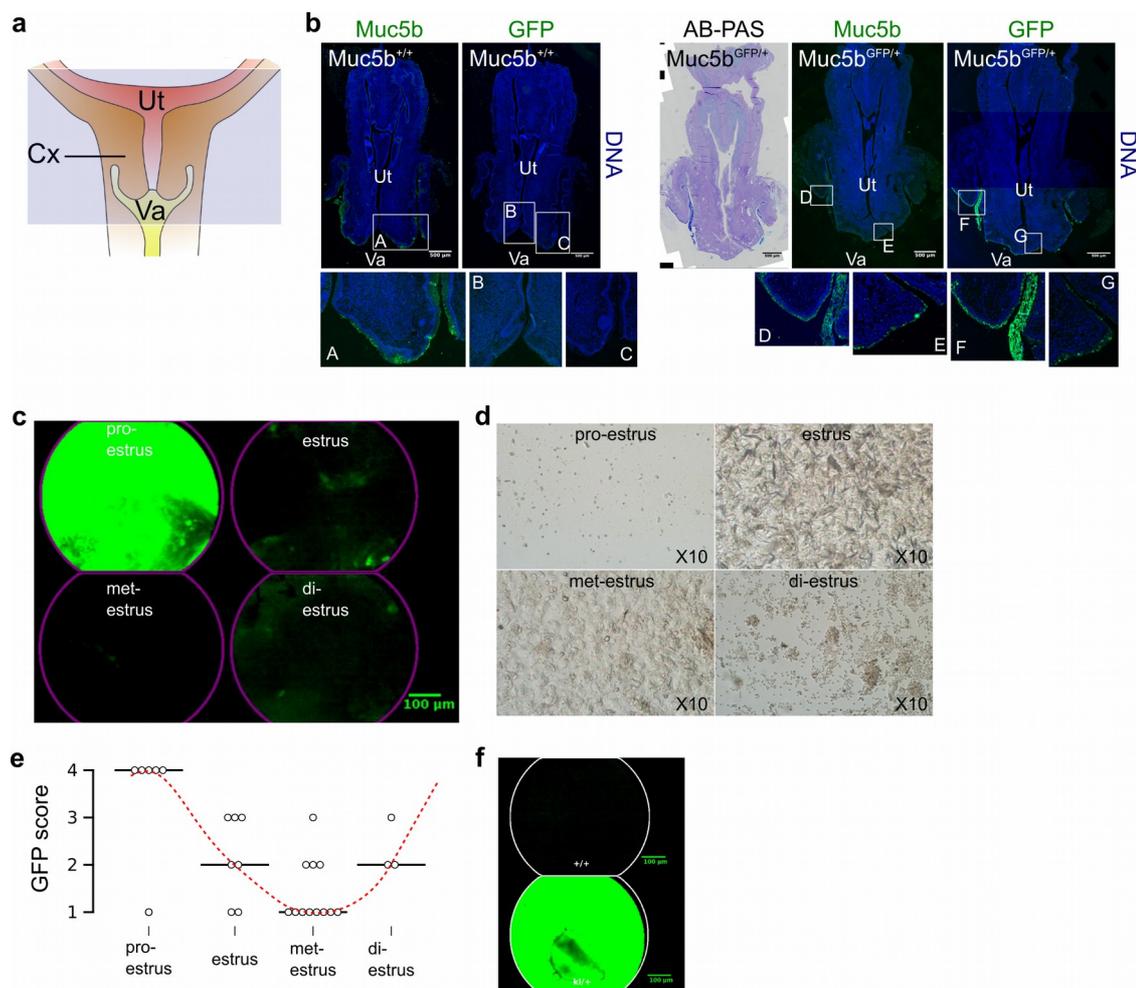


Figure 38 : Lien entre activité de la fluorescence de la GFP et phase du cycle œstral.

(a) Représentation schématique du cervix (Cx) de la souris. L'utérus (Ut) murin est composé de deux cornes. Va, vagin. Le rectangle bleu indique l'aire observée par microscopie en immunofluorescence. (b) Coupes sériées en immunofluorescence de cervix de souris de type sauvage ($Muc5b^{+/+}$) et transgénique ($Muc5b^{GFP/+}$) marqués avec les anticorps anti-Muc5b et anti-GFP. Barre d'échelle, 500 μ m. (c) Activité de la GFP enregistrée par endomicroscopie fibrée confocale à fluorescence. Chaque image est extraite d'un film représentatif de chaque phase du cycle œstral. Barre d'échelle, 100 μ m. (d) La phase du cycle œstral de 28 souris transgéniques a été déterminée par analyse classique des sécrétions vaginales comme illustré. (e) L'intensité de GFP a été évaluée de 1 (quasi absence) à 4 (quantité importante de mucus fluorescent) par trois observateurs indépendants, montrant une concordance parfaite entre la production de mucus fluorescent et la phase du cycle œstral (test Jonckheere-Terpstra, bi-directionnel, $P=0,015$). Les médianes sont représentées. N=6 souris en pro-œstrus, 7 souris en œstrus, 12 souris en met-œstrus et 3 souris en dis-œstrus. (f) Images illustratrices extraites de films d'endomicroscopies fibrées confocales à fluorescence dans le vagin de souris gestantes de type sauvage (+/+) et transgénique (ki/+).

1.5 Suivi *in vivo* de la densité de cellules calciformes conjonctivales au cours de traitements pharmacologiques

Pour étudier *in vivo* la réponse de la souris Muc5b-GFP à l'induction d'une sécheresse oculaire, nous avons fait des applications topiques de chlorure de benzalkonium (BAK) deux fois par jour pendant 10 jours. Les souris sont sacrifiées pour analyses 4 jours après la dernière application de BAK. Les CCC AB-PAS, GFP⁺ et Muc5ac⁺ sont comptées sur une coupe de l'œil gauche traité au PBS et sur une coupe de l'œil droit traité au BAK pour 10 souris. Le ratio du nombre de CCC GFP⁺/AB-PAS est de 0,30 pour les yeux traités au PBS et de 0,33 pour les yeux traités au BAK. Le ratio du nombre de CCC Muc5ac⁺/AB-PAS est de 0,80 pour les yeux traités au PBS et de 0,73 pour les yeux traités au BAK. Le traitement au BAK induit une diminution de 48 %, 46 % et 52 % des CCC AB-PAS, GFP⁺ et Muc5ac⁺ (**Figures 39a et 39b**). L'analyse par endomicroscopie fibrée confocale à fluorescence de la densité des CCC GFP⁺ chez 12 souris montre une diminution de -21,1 % ($\pm 26,9$) de la densité des CCC GFP⁺, comparée à la densité des cellules dans l'œil apparié traité au PBS (**Figures 39c et 39d**). Ces données montrent que la diminution de la densité de CCC, un paramètre clé de la sécheresse oculaire, peut facilement être suivie et quantifiée sur souris Muc5b-GFP vivantes. De plus, une fenêtre de 4 jours après la dernière application de BAK peut être utilisée pour tester des traitements dans un modèle d'induction de sécheresse oculaire.

Pour voir si la diminution de la densité de CCC est accompagnée d'une augmentation compensatrice de l'expression des mucines, nous avons mesuré les taux d'expression de *Muc5b* et *Muc5ac* dans les conjonctives de souris ayant reçu du BAK dans un œil, deux fois par jour, pendant 10 jours suivis de 4 jours sans traitement comparé à l'œil contrôle ayant reçu du PBS. Curieusement, nous n'observons pas de différence pour *Muc5b* alors que l'expression de *Muc5ac* augmente significativement de 2,2 fois (P non significatif pour *Muc5b* et $P=0,02$ pour *Muc5ac*, **Figure 39e**). Ces données suggèrent que la diminution de CCC induite par le traitement au BAK induit une régulation compensatrice des deux mucines, qui est plus importante pour *Muc5ac*.

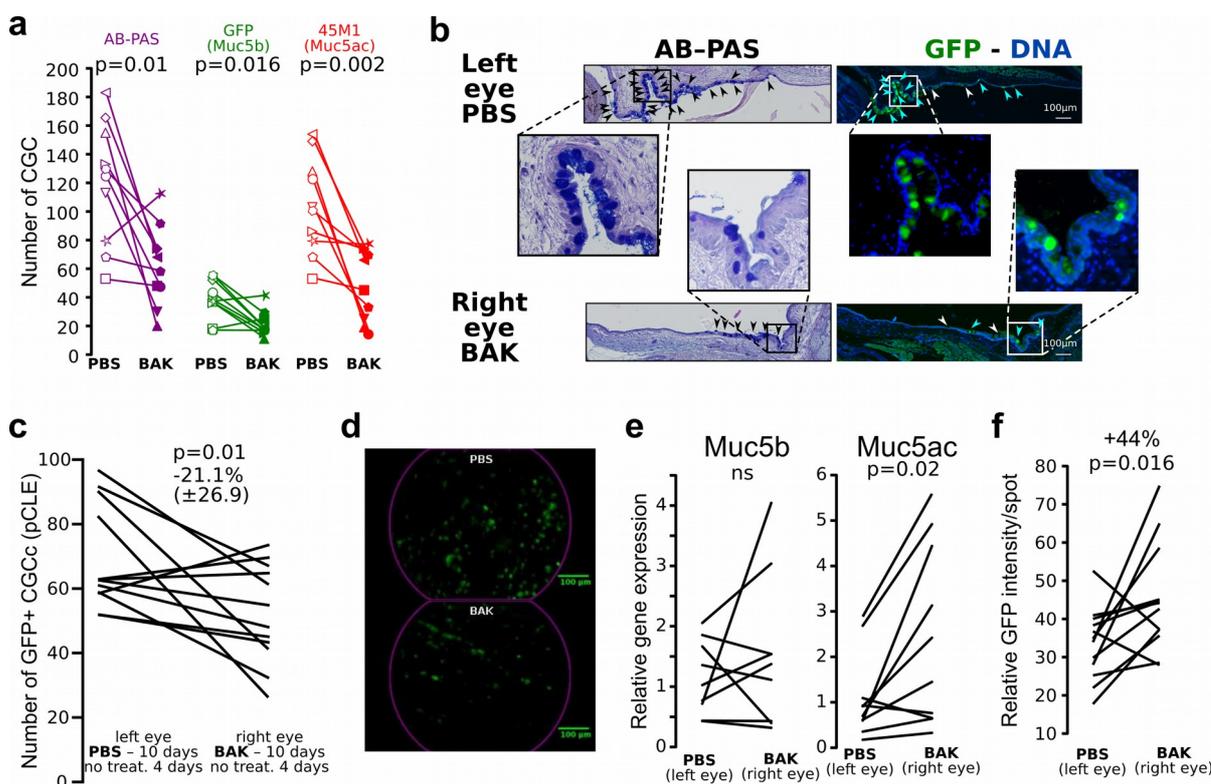


Figure 39 : L'activité de la GFP est diminuée dans un modèle induisant une sécheresse oculaire.

(a) Le nombre de CCC déterminé sur coupes histologiques (coloration AB-PAS) et les nombres de CCC GFP⁺ (Muc5b) et Muc5ac⁺ déterminés par marquages immunohistochimiques (anticorps anti-GFP et anti-Muc5ac) diminuent ($n=10$ souris, 1 coupe/souris, un symbole/souris) après 10 jours d'applications biquotidiennes de BAK (symboles pleins) dans un œil (PBS dans l'autre, symboles vides) suivis de 4 jours sans traitement. (b) Coupes histologiques et immunohistochimiques. Les coupes sériées AB-PAS et immunohistochimiques de l'œil gauche ayant reçu du PBS et de l'œil droit apparié ayant reçu du BAK montrent une diminution du nombre de CCC produisant Muc5b (flèches bleues) et de cellules ne produisant pas Muc5b (flèches blanches). Les flèches noires indiquent les cellules caliciformes. Signal vert, anticorps anti-GFP. Les noyaux (bleu) sont contre-colorés au Hoechst 33258. Barre d'échelle, 200 μm . (c) Le nombre de CCC GFP⁺ déterminé par endomicroscopie fibrée confocale à fluorescence diminue significativement après 10 jours d'applications topiques de BAK dans un œil (PBS dans l'autre) suivis de 4 jours sans traitement ($n=12$, test de permutation, $P=0,01$). (d) Images extraites de films d'endomicroscopies fibrées confocales à fluorescence après 10 jours d'applications de PBS comparées à 10 jours d'applications topiques de BAK suivis de 4 jours sans traitement. Barre d'échelle, 100 μm . (e) Niveaux d'expression des deux mucines gélifiantes *Muc5b* et *Muc5ac* déterminés par RT-qPCR (Taqman). Le changement d'expression de *Muc5b* est non significatif (ns) alors que *Muc5ac* est significativement sur-exprimé après 10 jours d'applications topiques de BAK ($n=10$ ARN extraits/traitement, test de permutation, $P=0,02$). (f) Densité de fluorescence par CCC GFP⁺ déterminée grâce au logiciel FIJI montrant une sur-production de Muc5b/CCC après 10 jours de traitement au BAK ($n=12$ souris, test de permutation, $P=0,016$).

Pour confirmer que la diminution de la densité de CCC GFP⁺ est accompagnée d'une augmentation compensatrice de la production de la protéine Muc5b, la densité intégrée de fluorescence de chaque point fluorescent a été déterminée. En accord avec un effet compensatoire, le traitement au BAK induit une augmentation de +44 % de la fluorescence par CCC ($P=0,016$, **Figure 39f**). Toutes ces données montrent un effet compensatoire des deux mucines gélifiantes après induction de la diminution de la densité des CCC.

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'IL13 recombinante (IL13r) stimule la différenciation des CCC dans un modèle de sécheresse oculaire. Pour cela, nous avons induit une sécheresse oculaire par application de BAK, deux fois par jour, pendant 10 jours puis effectué des applications topiques d'IL13r, deux fois par jour, pendant 4 jours. La diminution de -18,3 % ($\pm 25,6$) de la densité des CCC GFP⁺ induite par le traitement au BAK sans IL13R est corrigée par l'application topique d'IL13r (augmentation de 28,6 %), comme montré par l'augmentation relative de 10,9 % ($\pm 35,2$) de la densité de CCC GFP⁺ (**Figure 40**). Ceci montre que l'IL13r corrige la diminution de la densité de CCC induite par la sécheresse oculaire et montre que la souris Muc5b-GFP est un bon modèle préclinique.

1.6 L'IL-13 stimule l'activité de fluorescence dans des explants de poumons embryonnaires

Nous avons ensuite choisi de tester si notre souris Muc5b-GFP peut être utile pour réaliser des tests pharmacologiques sur des explants. Nous avons choisi le poumon embryonnaire qui est stérile et qui est connu pour exprimer précocement Muc5b au cours du développement. Dans un premier temps, l'expression de Muc5b dans le poumon embryonnaire a été étudiée par IHC en utilisant les anticorps anti-Muc5b et anti-GFP. Les marquages immunohistochimiques obtenus avec les deux anticorps montrent que la production de Muc5b débute dès le jour embryonnaire (E) 12,5 (**Figure 41a**).

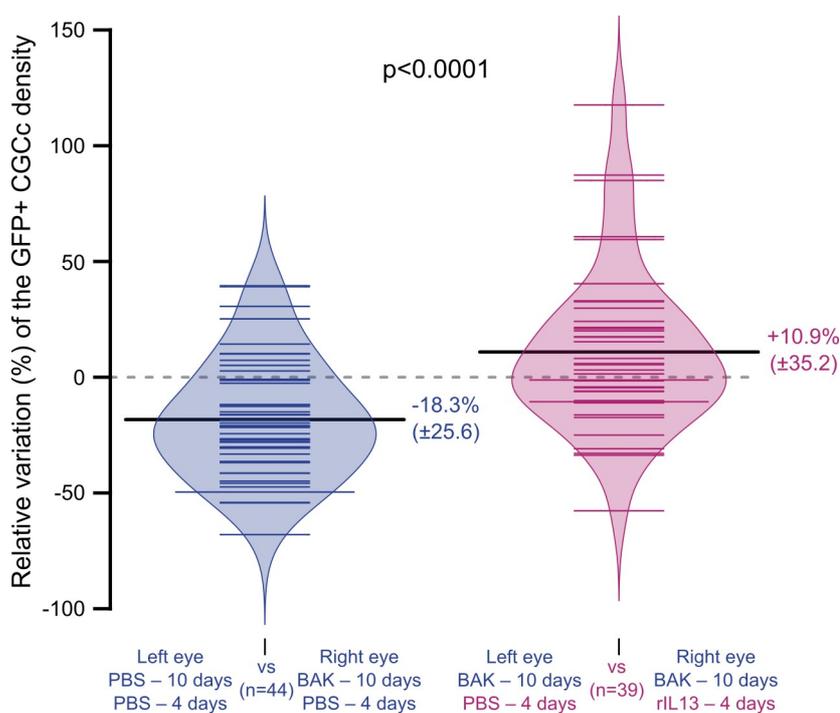


Figure 40 : La perte de cellules caliciformes conjonctivales est restaurée par l'IL13.

Le beanplot montre que l'application topique biquotidienne d'IL13r dans un modèle chimiquement induit de sécheresse oculaire restaure significativement ($P < 0,0001$, test de Wilcoxon-Mann-Whitney unilatéral) la densité des CCC GFP⁺ (n=44 souris contrôles (bleu) ; n=39 souris traitées avec l'IL13r (violet)). Les souris du groupe contrôle ont reçu du BAK deux fois par jour pendant 10 jours dans un œil suivis de 4 jours de PBS dans les deux yeux. Les souris du groupe rIL13 ont reçu du BAK dans les deux yeux deux fois par jour pendant 10 jours puis de l'IL13r dans un œil pendant 4 jours (PBS dans l'autre). Le pourcentage de CCC GFP⁺ dans l'œil traité par rapport à l'œil non traité a été déterminé pour chaque souris à partir de films d'endomicroscopies fibrées confocales à fluorescence. La médiane de chaque groupe est représentée par une barre noire horizontale.

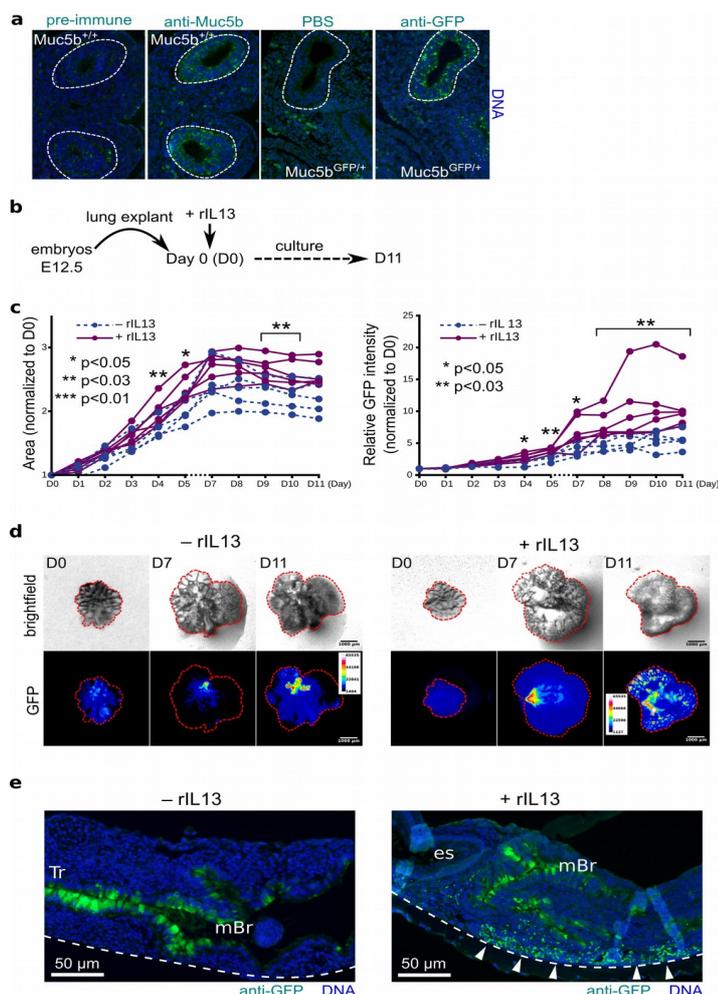


Figure 41 : L'IL-13 stimule l'activité de fluorescence de la GFP dans le poumon embryonnaire.

(a) Par immunofluorescence, le marquage par les anticorps anti-Muc5b et anti-GFP (vert) est identique dans le bourgeon pulmonaire (ligne pointillée) d'un embryon âgé de 12,5 jours. Grossissement X200. Les noyaux (bleu) sont contre-colorés au Hoechst 33258. (b) Représentation schématique du protocole. (c) Aire relative du poumon embryonnaire et intensité de fluorescence relative de 10 explants de 10 frères-sœurs. Cinq sont stimulés par l'IL-13r (+rIL13) et cinq servent de contrôles négatifs (-rIL13). Les données ont été analysées en effectuant un test bi-directionnel Wilcoxon-Mann-Whitney pour comparer les deux groupes. (d) Morphologie pulmonaire et activité de fluorescence de la GFP représentatives de deux explants en culture aux jours D0, D7 et D11 sans (-rIL13) ou avec (+rIL13) l'IL13r en lumière blanche et en images pseudo-colorées (16 couleurs). A partir du jour D4, les poumons stimulés par l'IL13r apparaissent plus gros et plus fluorescents que les poumons contrôles. Barre d'échelle, 1 mm. (e) Coupes représentatives d'explants de poumons embryonnaires après 8 jours de culture sans (-rIL13) ou avec (+rIL13) l'IL13r. Les tissus ont été incubés avec l'anticorps anti-GFP. Les noyaux (bleu) sont contre-colorés au Hoechst 33258. La ligne pointillée représente le filtre de culture. Les têtes de flèche (blanches) montrent la production de Muc5b dans les petites bronches après stimulation avec l'IL13. Tr, trachée ; mBr, bronche principale ; es, œsophage. Barre d'échelle, 50 μm.

Nous avons ensuite testé si l'IL13r stimule la production de Muc5b dans des poumons embryonnaires en culture. Pour cela, nous avons disséqué des poumons entiers d'embryons murins de 12,5 jours que nous avons ensuite mis en culture sur filtres. Vingt-quatre heures après, l'IL13r a été ajoutée (jour D0) et la surface du poumon et l'intensité de la GFP ont été enregistrées quotidiennement (**Figure 41b**). Comparés aux contrôles, les poumons stimulés par l'IL13 ont une plus forte activité de fluorescence à partir du jour D4 (**Figures 41c et 41d**). Les marquages avec l'anticorps anti-GFP montrent une forte production de Muc5b dans la trachée et les bronches principales (**Figure 41e**) et une production de Muc5b dans les bronches distales des explants stimulés par l'IL13 (**Figures 41d et 41e**).

1.7 Bilan

Les buts de cette étude étaient de caractériser le profil d'expression protéique de la mucine Muc5b chez la souris, grâce à la lignée Muc5b-GFP et de montrer que la souris Muc5b-GFP peut être utilisée comme modèle préclinique.

Nous visualisons la production de Muc5b dans l'oreille moyenne (bulle tympanique et trompe d'Eustache), la cavité nasale, la trachée, la vésicule biliaire et le tractus génital femelle (vagin et cervix).

Dans la cavité nasale, nous observons, par stéréomicroscopie à fluorescence, une absence de Muc5b dans le vestibule nasal mais une forte densité de cellules productrices de Muc5b dans les cornets (nasaux, ethmoïdaux et maxillaires).

Dans le tractus génital femelle murin, nous montrons une variation de la production de Muc5b en fonction du cycle œstral, avec un pic de production en pro-œstrus et une forte diminution de la production de Muc5b en met-œstrus. Nous avons également montré, chez des souris à différents stades de gestation, que la cavité vaginale contient une grande quantité de mucus fluorescent. Ceci suggère que la mucine Muc5b est régulée par les hormones ovariennes.

Dans l'œil, par IHC, nous montrons qu'entre 30 et 50 % des cellules à mucus de la conjonctive murine produisent Muc5b. La densité des cellules Muc5b-positives

est corrélée à la totalité des cellules caliciformes. Une majorité des cellules Muc5b-positives produisent aussi Muc5ac. Par endomicroscopie confocale fibrée à fluorescence, sur souris anesthésiée, nous vérifions que la densité de cellules à mucus produisant Muc5b est similaire entre les deux yeux d'une souris.

Nous montrons ensuite que, grâce à la GFP, nous pouvons suivre *in vivo* la diminution de la densité des cellules à mucus conjonctivales suite à l'induction d'une sécheresse oculaire par application topique de chlorure de benzalkonium 0,2 %, deux fois par jour, pendant 10 jours. Cette diminution de la densité des cellules à mucus GFP-positives est vérifiée par IHC et est similaire à la diminution de la densité des cellules à mucus totales et des cellules à mucus Muc5ac-positives. Enfin, nous montrons que la souris Muc5b-GFP permet de visualiser la restauration de la densité des cellules à mucus conjonctivales grâce à l'application topique d'interleukine-13, après induction d'une sécheresse oculaire.

Par IHC, nous montrons une production précoce de Muc5b dans le poumon, dès le stade embryonnaire E12,5. Sur des explants de poumons entiers embryonnaires, nous montrons que l'interleukine-13 recombinante stimule la production de Muc5b et la croissance du poumon embryonnaire en culture.

2 Lignées murines invalidées pour *Muc5b*

Lors de la construction de la souris transgénique *Muc5b*-GFP, des sites *LoxP* ont été introduits de part et d'autre des deux derniers exons de *Muc5b* afin d'obtenir, par croisement avec des souris transgéniques pour la recombinaise *Cre*, des lignées murines pour lesquelles le gène *Muc5b* est invalidé. Ces lignées murines transgéniques déficientes pour *Muc5b*, soit dans tous les tissus où il est exprimé, soit dans un tissu spécifique, vont nous permettre d'étudier le rôle de *Muc5b* en situations normale et pathologique.

2.1 Obtention de la lignée murine invalidée pour *Muc5b* dans tous les tissus

La lignée *Muc5b*KO a été obtenue par croisement avec une lignée exprimant la recombinaise *Cre* précocement dans tous les tissus. Après plusieurs croisements en fond génétique C57BL/6, les souris *Muc5b*KO, sans le transgène *Cre*, sont viables et fertiles. L'absence de la protéine *Muc5b* a été vérifiée par endomicroscopie confocale fibrée à fluorescence, stéréomicroscopie à fluorescence, immunohistochimie et RT-qPCR (uniquement dans le poumon).

À l'âge adulte, quel que soit le sexe, les souris *Muc5b*KO ont une masse corporelle plus faible que les souris *Muc5b*-GFP (**Figure 42**). Les souris *Muc5b*KO ont un phénotype respiratoire marqué (**Figure 43**). Près de 50 % des souris âgées de 60 jours ou plus ont une détresse respiratoire, avec des « claquements de dents », des vocalises, une déformation des cartilages de la trachée, une sténose de la trachée, un tirage intercostal et une respiration saccadée. Chez la plupart de ces souris, la détresse respiratoire est associée à une colonne vertébrale voûtée ou à une protrusion de la partie distale du sternum ou de la xiphoïde. Chez près de 50 % des souris *Muc5b*KO adultes (à partir de J60), nous observons la présence d'air dans les intestins. En histologie, aucun signe d'obstruction bronchique, ni d'inflammation alvéolaire ou péribronchique n'ont été observés, contrairement à ce qui a été décrit pour la lignée *Muc5b*^{-/-} (Roy et al., 2014). Par contre, nous observons un fort épaissement des parois des bronches et des vaisseaux sanguins (**Figure 43E**).

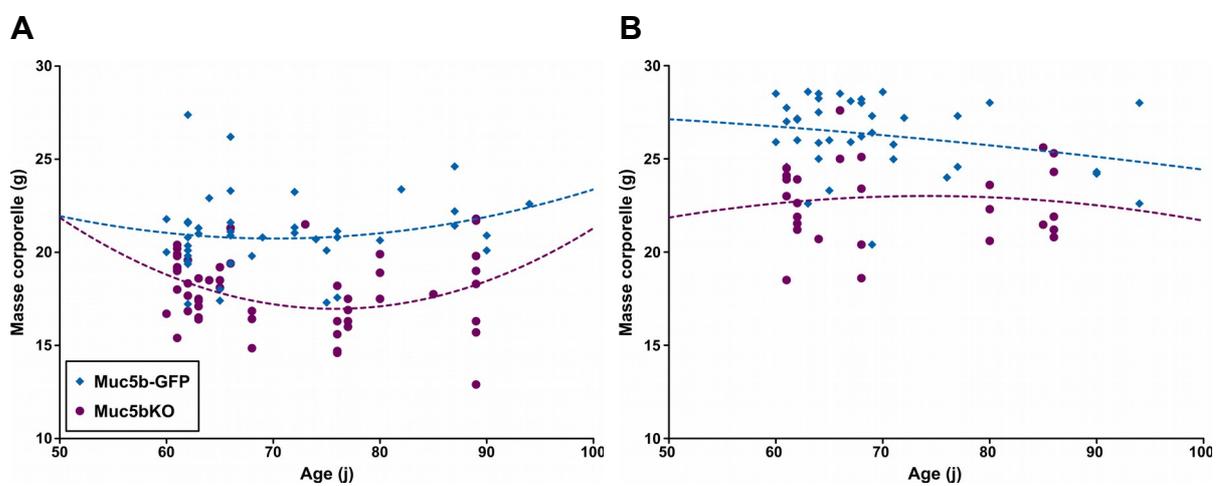


Figure 42 : Masse corporelle des souris Muc5b-GFP et Muc5bKO.

(A) Souris femelles et (B) souris mâles, âgées entre 60 et 100 jours (j). Test Wilcoxon-Mann-Whitney, bi-directionnel, stratifié selon l'âge : $P < 0,0001$.

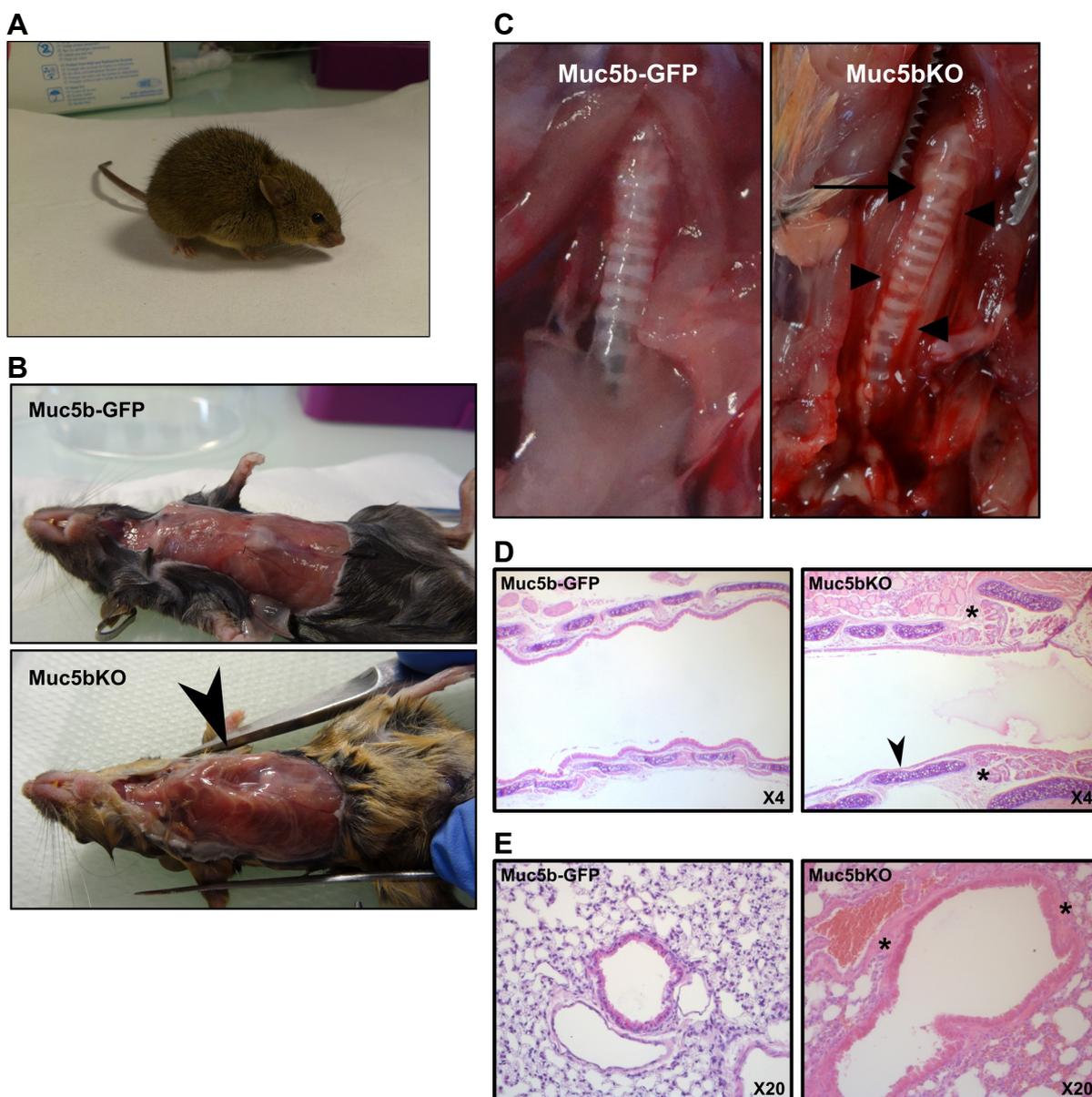


Figure 43 : Phénotype d'une souris Muc5bKO âgée de 100 j.

(A) Souris Muc5bKO voûtée. (B) Cage thoracique déformée avec enfoncement du sternum chez une souris Muc5bKO. (C) Anomalies de la trachée avec sténose de la trachée en dessous du pharynx (flèche) et cartilages tordus (têtes de flèche) chez une souris Muc5bKO. (D) Anomalies histologiques de la trachée avec sténose (astérisque) et amincissement de l'épithélium trachéal (tête de flèche) chez une souris Muc5bKO. (E) Anomalies histologiques avec épaissement de la paroi des bronches et des vaisseaux sanguins (astérisques) chez une souris Muc5bKO.

La fonction respiratoire a été mesurée grâce à l'appareil Flexivent (Squirrel, Montréal, Canada) piloté par le logiciel Scireq Flexiware. Ce travail a fait l'objet d'une collaboration avec le Dr. Catherine Duez (Inserm U1019 / CNRS UMR 8204 / Institut Pasteur de Lille / Université de Lille). Au niveau basal, les souris Muc5bKO ont une compliance statique (Cst) significativement plus faible (Cst=0,041 ± 0,002 ; $P < 0,05$) que les souris Muc5b-GFP (Cst=0,063 ± 0,006) (**Figure 44**). Ces résultats ont été confirmés par la mesure de la compliance par le « Snapshot ». Ainsi, au niveau basal, les souris Muc5bKO ont une compliance pulmonaire totale (Crs=0,026 ± 0,0007) significativement plus basse (-26 %) que les souris Muc5b-GFP (Crs=0,035 ± 0,0002 ; $P < 0,05$) (**Figure 44**). A l'inverse, l'élastance totale (Ers=1/Crs) des souris Muc5bKO (Ers=38,1) est significativement plus élevée (+32,4 %) que celle des souris Muc5b-GFP (Ers=28,8 ; $P < 0,05$). Ceci traduit une plus grande rigidité du tissu pulmonaire des souris Muc5bKO, comparées aux souris Muc5b-GFP.

2.2 Obtention de la lignée murine spécifiquement invalidée pour Muc5b dans le poumon

Le phénotype pulmonaire étant très marqué chez les souris Muc5bKO, nous avons également développé une souris pour laquelle le gène *Muc5b* est spécifiquement invalidé dans le poumon. Ceci doit permettre de mieux comprendre le phénotype pulmonaire de la souris Muc5bKO sans invalidation trachéale. La lignée Muc5b^{lung ko/ko} est obtenue par croisement des souris Muc5b-GFP avec des souris CCSPiCre (Li et al., 2008). Chez ces souris, la recombinaison *Cre* est exprimée spécifiquement dans les cellules Club, sous le contrôle du promoteur CCSP. Les souris Muc5b^{lung ko/ko} sont viables et fertiles. L'absence d'expression de *Muc5b* dans le poumon a été vérifiée par RT-qPCR. Contrairement aux souris Muc5bKO, les souris Muc5b^{lung ko/ko} ne présentent pas de phénotype particulier et n'ont pas une capacité respiratoire diminuée par rapport aux souris Muc5b-GFP (**Figure 44**).

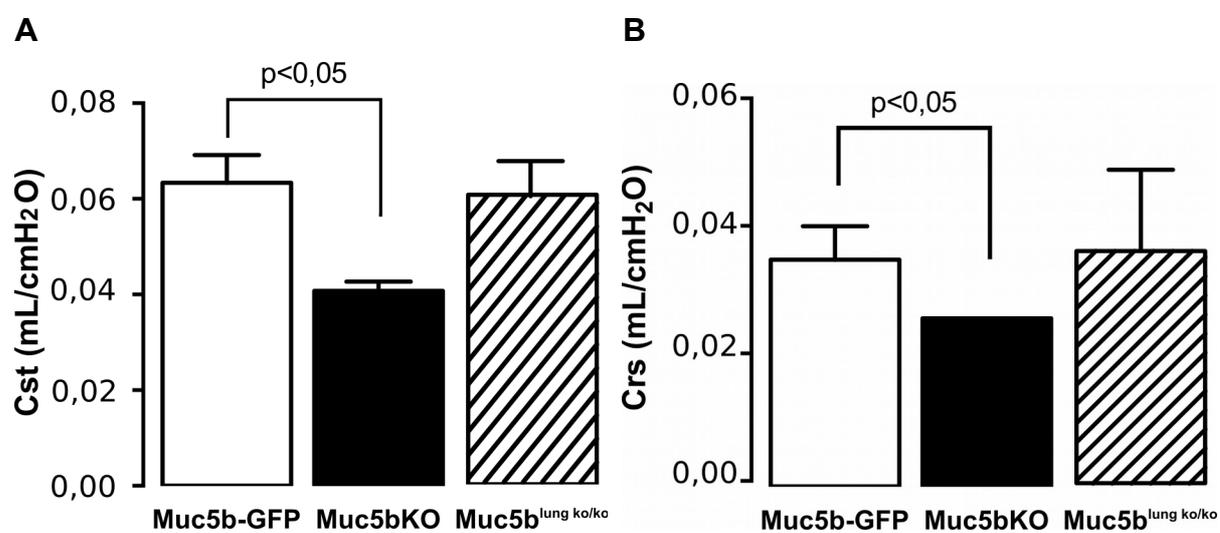


Figure 44 : Compliance pulmonaire des souris Muc5b-GFP, Muc5bKO et Muc5b^{lung ko/ko}.

(A) Compliance statique (Cst) et **(B)** compliance pulmonaire totale (Crs).

2.3 Poursuite des travaux

La caractérisation des lignées murines invalidées pour Muc5b dans tous les tissus (Muc5bKO) ou spécifiquement dans le poumon (Muc5b^{lung ko/ko}) est encore en cours.

Nous allons comparer la flore pulmonaire des lavages broncho-alvéolaires des souris Muc5bKO et des souris Muc5b^{lung ko/ko} avec celle des souris Muc5b-GFP. Cette partie de l'étude est réalisée en collaboration avec le Pr. Laurence Delhaes (Faculté de médecine CHRU de Bordeaux – Inserm U1045) avec qui nous avons obtenu un contrat avec l'association Vaincre La Mucoviscidose. Nous devons également compléter l'étude de la fonction respiratoire de chaque lignée en augmentant le nombre de souris de chaque génotype, en collaboration avec le Dr. Catherine Duez (Inserm U1019 / CNRS UMR 8204, Institut Pasteur de Lille / Université de Lille).

Nous avons aussi débuté la caractérisation anatomique des différentes lignées (Muc5b-GFP, Muc5bKO et Muc5b^{lung ko/ko}) en fonction de l'âge et du sexe, afin d'étudier le rôle de Muc5b dans la mise en place d'un phénotype respiratoire et de déterminer à partir de quel âge des anomalies, notamment de la trachée et du sternum, sont observables par histologie et morphométrie.

3 Effets d'une supplémentation à long terme en AGPI LC (n-3) sur le poumon de souris *Cftr*ΔF508

3.1 Introduction

Le statut pro-inflammatoire des patients mucoviscidosiques favorise la colonisation du poumon par des bactéries opportunistes et pathogènes. La présence d'un mucus anormalement visqueux dans les voies respiratoires favorise également cette colonisation bactérienne.

Des travaux antérieurs du laboratoire ont montré la formation de bouchons muqueux avec une prévalence de Muc5b après une infection expérimentale à *P. aeruginosa* chez les souris *Cftr*^{-/-} (Valque et al., 2011). Le laboratoire a également montré qu'un régime enrichi en AGPI LC (n-3) diminue la sur-expression des mucines respiratoires et augmente la survie de souris de type sauvage infectées expérimentalement par *P. aeruginosa* en améliorant la clairance bactérienne et la réponse inflammatoire.

Le but initial de cette étude était de montrer les effets positifs d'une supplémentation à long terme en AGPI LC (n-3) sur la sur-expression des mucines gélifiantes pulmonaires et plus généralement sur le poumon de souris *Cftr*ΔF508.

Pour cela, des souris *Cftr*ΔF508/+ ont reçu soit un régime contrôle, soit un régime isocalorique et isolipidique enrichi en AGPI LC (n-3) pendant 5 semaines avant la mise à mâle et pendant la gestation et la lactation. Après le sevrage, la descendance a conservé le même régime que celui de leur mère, jusqu'à l'âge adulte. Les effets des AGPI LC (n-3) sur le poumon ont été évalués chez les homozygotes *Cftr*ΔF508 et leurs frères-sœurs de type sauvage après induction d'une inflammation pulmonaire aiguë par inhalation de LPS de *P. aeruginosa*.

Les résultats de cette étude, présentés en français ci dessous, ont permis la rédaction d'un article scientifique qui a été soumis pour publication dans un journal à comité de lecture. L'article intitulé « Long-term dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids show benefits to the lungs of *Cftr*ΔF508 mice » est présenté en **Annexe 3**. La

partie matériels et méthodes et la discussion sont dans l'**Annexe 3**.

3.2 Incorporation tissulaire précoce des AGPI LC (n-3)

L'incorporation des AGPI LC (n-3) a été dosée dans le lait (contenu stomacal), dans les poumons et le foie de souriceaux Cfr Δ F508 (entre les jours post-nataux PN1 et PN3) et dans les poumons et le foie de souris Cfr Δ F508 adultes (PN60). Le ratio (DHA+EPA)/AA est 5,8 fois plus élevé dans le lait contenu dans l'estomac de souriceaux et 6,1 fois plus élevé dans les poumons de souris adultes comparées à des souris nourries avec un régime contrôle. La composition en AGPI LC (n-3) des tissus étudiés chez les souriceaux (foie et poumons) et les souris adultes (foie) est bien représentative des régimes alimentaires (**Figure 45**). Ceci montre que le fait de nourrir des souris gestantes avec un régime enrichi en AGPI LP (n-3) participe à enrichir les membranes cellulaires en AGPI LC (n-3) chez les souriceaux.

3.3 Les souris Cfr Δ F508 ont un retard de croissance qui est corrigé chez les mâles grâce aux AGPI LC (n-3)

Au sevrage (PN21), les souris Cfr Δ F508 mâles et femelles nourries avec un régime contrôle ont un retard de croissance comparées aux souris de type sauvage (respectivement -29 %, $P=0,020$ pour les mâles et -19 %, $P=0,008$ pour les femelles, **Figure 46A**). Le retard de croissance n'est pas observé chez les souris nourries avec le régime enrichi en AGPI LC (n-3). A l'âge adulte (PN60), le retard de croissance persiste chez les souris Cfr Δ F508 nourries avec le régime contrôle comparées aux souris de type sauvage, bien que moins important qu'au sevrage (respectivement -11 %, $P=0,014$ pour les mâles et -10 %, $P=0,045$ pour les femelles, **Figure 46B**). Le régime enrichi en AGPI LC (n-3) est associé à une augmentation de la masse corporelle des souris Cfr Δ F508 (respectivement +16,3 %, $P=0,004$ pour les mâles et +16,6 %, $P=0,001$ pour les femelles), qui devient similaire à la masse corporelle des souris mâles de type sauvage ($P=NS$) alors que la masse corporelle des souris femelles reste plus basse ($P=0,033$). L'ensemble de ces données montre que les AGPI LC (n-3) réduisent significativement le retard de croissance des souris Cfr Δ F508 mâles.

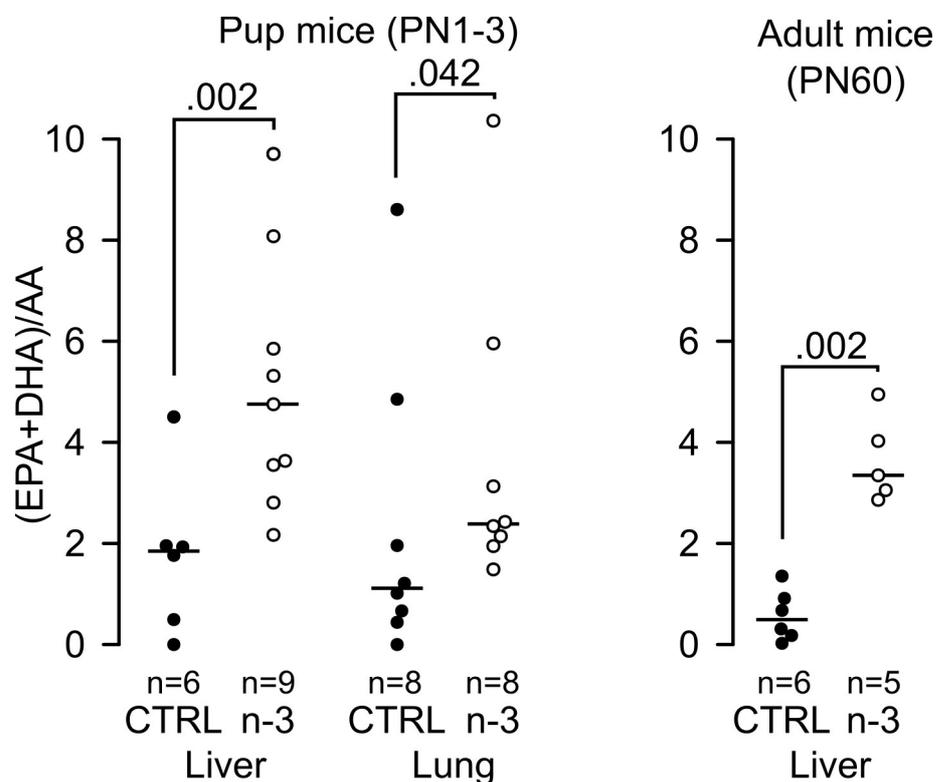


Figure 45 : La consommation précoce d'AGPI LC (n-3) améliore l'incorporation des acides gras dans les tissus des souris *Cftr* Δ F508.

L'incorporation des AGPI LC (n-3) a été quantifiée dans les foies et les poumons de souriceaux entre les jours post-nataux (PN) 1 et 3 et dans les foies de souris adultes à PN60 (5-9 souris/groupe). CTRL, régime contrôle ; n-3, régime enrichi en AGPI LC (n-3) ; WT, souris de type sauvage ; Δ F508, souris *Cftr* Δ F508.

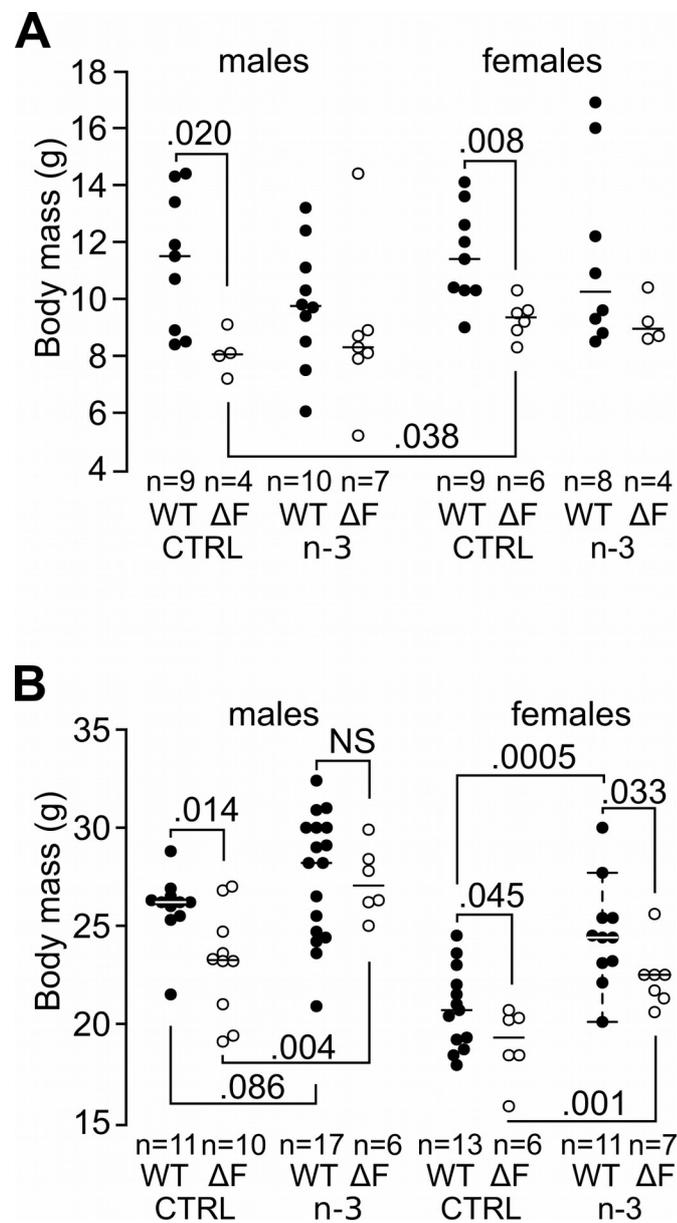


Figure 46 : La consommation précoce d'AGPI LC (n-3) corrige le retard de croissance des souris mâles *Cftr* Δ F508.

Masse corporelle des souris *Cftr* Δ F508 (Δ F) et de leurs frères-sœurs de type sauvage (WT) au sevrage (A) et à l'âge adulte (B) (4-10 souriceaux et 6-17 souris adultes/groupe). NS, non significatif ; CTRL, régime contrôle ; n-3, régime enrichi en AGPI LC (n-3).

3.4 Les AGPI LC (n-3) réduisent les lésions pulmonaires à l'état basal et après inhalation de LPS

Les lésions pulmonaires ont été évaluées chez les souris adultes par deux expérimentateurs à l'aveugle du génotype, du régime et du traitement grâce à un score histologique « maison » (**Tableau 1**). En conditions basales, les souris Cftr Δ F508 nourries avec le régime contrôle ou le régime enrichi en AGPI LC (n-3) ont respectivement un score histologique total 10 fois et 3 fois plus élevé que les souris de type sauvage ($P < 0,010$; **Figure 47** et **Tableau 2**). Les zones pulmonaires lésées ($P = 0,0002$), les alvéoles collabées ($P = 0,0004$), l'hyperplasie des cellules épithéliales bronchiques ($P = 0,010$) et l'infiltration de cellules inflammatoires ($P = 0,007$) participent principalement à cette différence. L'augmentation de l'hyperplasie des cellules épithéliales bronchiques observée chez les souris Cftr Δ F508 nourries avec le régime contrôle n'est pas retrouvée chez les souris Cftr Δ F508 nourries avec le régime enrichi en AGPI LC (n-3).

Une inflammation pulmonaire aiguë a été induite par inhalation de LPS de *P. aeruginosa*. Concernant les souris de type sauvage, l'inflammation pulmonaire aiguë induite par inhalation de LPS augmente le score histologique de $0,31 \pm 0,21$ à $1,49 \pm 0,32$ lorsque les souris sont nourries avec le régime contrôle ($P = 0,004$, **Figure 47**). Les scores des souris de type sauvage nourries avec le régime enrichi en AGPI LC (n-3), ayant inhalé du PBS ou du LPS, ne sont pas significativement différents. Les souris Cftr Δ F508, nourries avec les deux régimes, ont un score histologique plus élevé lorsqu'elles ont inhalées du LPS ($P < 0,001$) comparées aux souris ayant inhalé du PBS. Quelque soit le régime, l'augmentation du score est plus élevée pour les souris Cftr Δ F508 ($P < 0,0001$) et l'augmentation est essentiellement due à une augmentation de la hyperplasie des cellules épithéliales bronchiques ($P = 0,001$ pour les souris nourries avec le régime contrôle et $P = 0,008$ pour les souris nourries avec le régime enrichi en AGPI LC (n-3)), l'augmentation de la métaplasie des cellules Club ($P < 0,0001$ pour les souris nourries avec le régime contrôle et $P = 0,0001$ pour les souris nourries avec le régime enrichi en AGPI LC (n-3)) et l'augmentation de l'infiltration de cellules inflammatoires ($P = 0,035$ pour les souris

Tableau 1 : Score histologique des lésions pulmonaires.

Points	0	1	2	3	4
% of injured lung	0–20%	20–40%	40–60%	60–80%	80–100%
% of collapsed or irregular alveoli	0–20%	20–40%	40–60%	60–80%	80–100%
Hyperplasia of bronchial epithelial cells	None	Mild	Severe	Severe with important thickening	–
Metaplasia of Club cells	None	Mild	Severe	–	–
Plugs of mucus	Absence	Presence	–	–	–
Infiltration of inflammatory cells	Absence	Presence	–	–	–
Perivascular and peribronchial infiltration of inflammatory cells	None	< 5 layers	> 5 layers	–	–

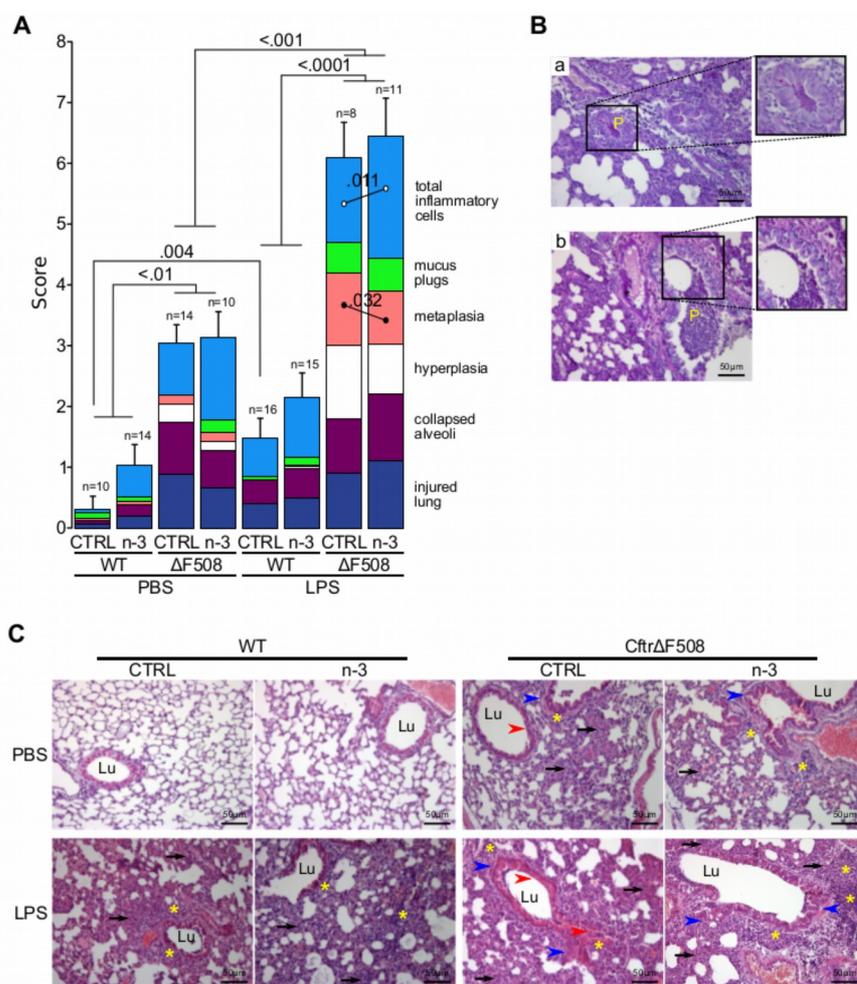


Figure 47 : Score histologique des lésions histologiques pulmonaires.

(A) Le score histologique total est la somme des scores de chaque critère (zones pulmonaires lésées, alvéoles collabées, hyperplasie et métaplasie des cellules épithéliales bronchiques, bouchons de mucus définis comme la présence de matériel muqueux dans les bronches et cellules inflammatoires totales). Le critère « cellules inflammatoires totales » a été établi en scorant d'une part l'infiltration de cellules inflammatoires dans le poumon, et d'autre part en scorant l'infiltration pérbronchique et périvasculaire spécifique de cellules inflammatoires. Le score histologique total est représenté comme médiane±SEM. Plus le score est élevé, plus le poumon est lésé (8-16 souris/groupe, 3-14 coupes histologiques scorées/souris). CTRL, régime contrôle ; n-3, régime enrichi en AGPI LC (n-3) ; WT, souris de type sauvage ; ΔF508, souris CfrΔF508. (B) Coupes histologiques représentatives de poumon de souris CfrΔF508 nourries avec un régime contrôle (a) ou enrichi en AGPI LC (n-3) (b) après induction d'une inflammation pulmonaire par inhalation de LPS ayant des bouchons de mucus (P, zoom) avec des cellules inflammatoires. Barre d'échelle, 50 μm. (C) Coupes histologiques représentatives de poumon de souris 24h après l'inhalation de LPS (contrôle, PBS). Les flèches noires indiquent les alvéoles collabées, les astérisques indiquent l'infiltration de cellules inflammatoires, les têtes de flèche rouges indiquent la métaplasie, les têtes de flèche bleues indiquent l'hyperplasie. Lu, lumière de la bronche. Barre d'échelle, 50 μm.

Tableau 2 : Effets du LPS sur le score histologique suivant le génotype des souris et le régime alimentaire.

Genotype Diet	Wild-type			(n-3) LC-PUFA			Control			CftrΔF508 (n-3) LC-PUFA		
	PBS	LPS	x(p) ^a	PBS	LPS	x(p)	PBS	LPS	x(p)	PBS	LPS	x(p)
Total score	0.31±0.21	1.49±0.32	4.8(***)	1.04±0.34	2.14±0.41	2.1(*)	3.04±0.31	6.09±0.59	2.0(***)	3.14±0.42	6.45±0.62	2.1(***)
Injured lung	0.06±0.06	0.39±0.12	6.5(*)	0.19±0.08	0.49±0.14	NS	0.88±0.18	0.90±0.09	NS	0.66±0.18	1.10±0.16	NS
Collapsed alveoli	0.06±0.06	0.39±0.12	6.5(**)	0.19±0.08	0.48±0.13	2.5(*)	0.86±0.18	0.90±0.09	NS	0.63±0.18	1.10±0.16	1.8(*)
Hyperplasia	0.00±0.00	0.00±0.00	NS	0.00±0.00	0.04±0.03	NS	0.29±0.09	1.20±0.22	4.2(**)	0.14±0.10	0.83±0.21	6.1(**)
Metaplasia	0.04±0.04	0.00±0.00	NS	0.06±0.06	0.02±0.02	NS	0.16±0.07	1.20±0.17	7.6(***)	0.15±0.10	0.87±0.13	5.8(***)
Mucous plugs	0.10±0.10	0.06±0.06	NS	0.07±0.07	0.13±0.09	NS	0.00±0.00	0.50±0.19	(**)	0.20±0.13	0.55±0.16	NS
Inflammatory cells	0.05±0.04	0.64±0.09	12.8(***)	0.52±0.19	0.98±0.20	1.9(*)	0.85±0.20	1.39±0.28	1.6(*)	1.37±0.14	2.01±0.22	1.5(**)

^a: fold (*P* value); * *p*<0.05; ** *p*<0.01; *** *p*<0.001.

(n-3) LC-PUFA: (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids; PBS: phosphate-buffered saline; LPS: *P. aeruginosa* lipopolysaccharide; NS: not significant.

nourries avec le régime contrôle et $P=0,004$ pour les souris nourries avec le régime enrichi en AGPI LC (n-3), **Tableau 2**). L'inhalation de LPS augmente la fréquence de présence de bouchons de mucus dans les bronches de souris Cfr Δ F508 nourries avec le régime contrôle ($P=0,0096$, **Tableau 2**). Le régime enrichi en AGPI LC (n-3) est associé à une diminution de la métaplasie des cellules Club chez les souris Cfr Δ F508 ($P=0,032$, **Figure 47**) mais aussi à une augmentation de l'infiltration des cellules inflammatoires ($P=0,011$). Ces données montrent que les AGPI LC (n-3) améliorent plusieurs paramètres histologiques des poumons de souris de type sauvage et Cfr Δ F508.

3.5 Les AGPI LC (n-3) modulent l'inflammation pulmonaire

Les taux de KC, une chimiokine (CXCL1) attirant les neutrophiles, et les deux cytokines pro-inflammatoires TNF α et IFN γ ont été dosées par ELISA dans les homogénats de poumons de souris adultes (**Figure 48**). Sans stimulation inflammatoire, les taux de cytokines sont relativement faibles. Nous ne notons qu'une augmentation modérée de la concentration en IFN γ chez les souris de type sauvage nourries avec le régime enrichi en AGPI LC (n-3) ($P=0,011$, **Figure 48C**).

L'inhalation de LPS induit une forte augmentation des trois cytokines en 24h ($P<0,001$, **Figure 48**). Les AGPI LC (n-3) induisent des concentrations plus élevées en KC et IFN γ chez les souris Cfr Δ F508 comparées aux souris Cfr Δ F508 nourries avec le régime contrôle ($P=0,006$ pour les souris Cfr Δ F508 nourries avec le régime enrichi en AGPI LC (n-3) et $P=0,014$ pour les souris Cfr Δ F508 nourries avec le régime contrôle).

Nous avons ensuite étudié les effets des AGPI LC (n-3) sur l'expression de deux gènes de marqueurs de la résolution de l'inflammation, *PPAR α* et *PPAR γ* , dans les poumons. Les taux de transcrits des deux gènes sont similaires avant et après induction d'une inflammation pulmonaire. Nous avons cependant noté une tendance à l'augmentation de l'expression de *PPAR α* chez les souris Cfr Δ F508 nourries avec le régime contrôle ($P=0,054$). Les taux d'ARNm de *PPAR α* , mais pas de *PPAR γ* , sont significativement plus élevés dans les groupes de souris de type sauvage avec ou sans inhalation de LPS comparées aux souris Cfr Δ F508 ($P=0,006$ pour les souris de

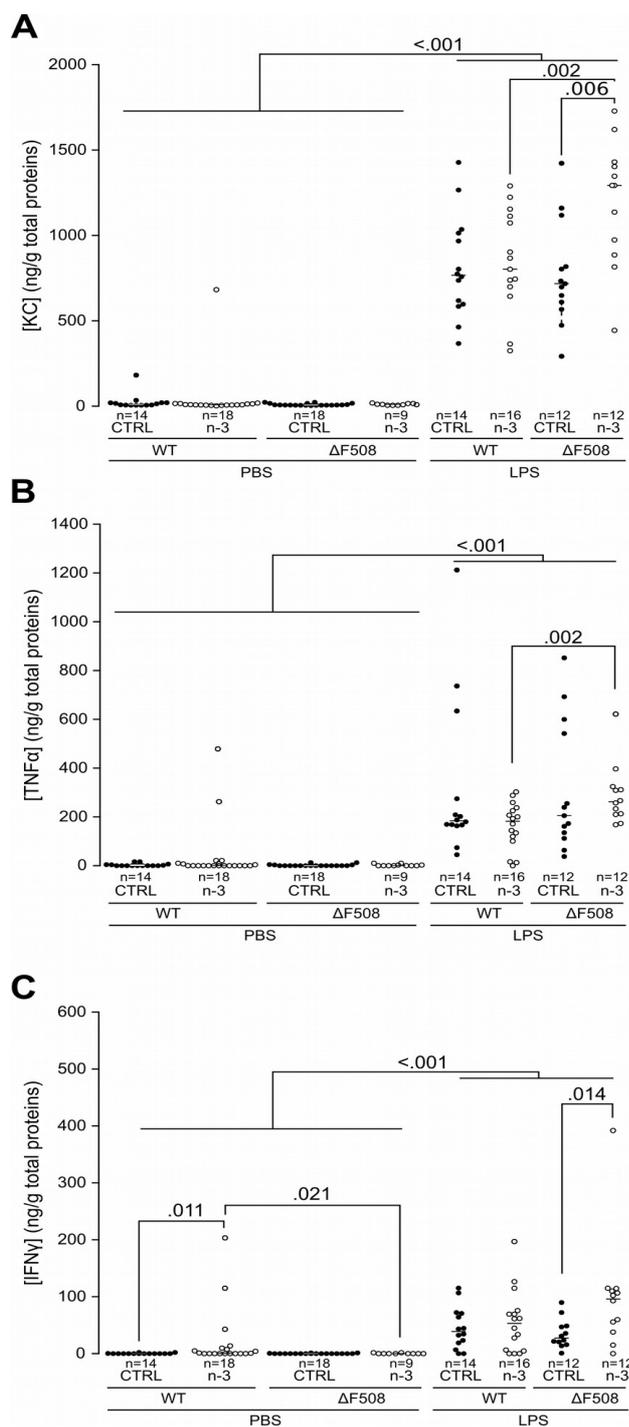


Figure 48 : Dosage par ELISA des cytokines pro-inflammatoires dans les homogénats de poumon.

(A) KC, (B) TNF α et (C) IFN γ . Les taux de cytokines pro-inflammatoires des souris de type sauvage (WT) et Cftr Δ F508 (Δ F508) ont été normalisés à la concentration en protéines totales (9-18 souris/groupe). CTRL, régime contrôle ; n-3, régime enrichi en AGPI LC (n-3).

type sauvage ayant inhalé du PBS et $P=0,015$ pour les souris de type sauvage ayant inhalé du LPS, **Figure 49A**). Les AGPI LC (n-3) sont associés à une diminution significative de l'expression de *PPAR γ* chez les souris de type sauvage ($P=0,002$) mais pas chez les souris *Cftr Δ F508* (**Figure 49B**). Ces données montrent que les AGPI LC (n-3) modulent précocement la réponse inflammatoire dans les poumons après inhalation de LPS, chez les souris de type sauvage et les souris *Cftr Δ F508*.

3.6 Les AGPI LC (n-3) ne régulent pas l'expression des mucines gélifiantes des souris *Cftr Δ F508*

Pour compléter cette étude, l'expression de *Muc5b* et de *Muc5ac* a été mesurée par RT-qPCR (Taqman) dans les poumons, comme décrit précédemment (Tetaert et al., 2007). En conditions basales, l'expression des mucines gélifiantes (*Muc5b* et *Muc5ac*) est plus faible dans les poumons de souris *Cftr Δ F508* que dans les poumons de souris de type sauvage (**Figure 50**). Chez les souris *Cftr Δ F508*, l'inhalation de LPS induit une augmentation de l'expression de *Muc5ac*, mais pas de *Muc5b*, quel que soit le régime. Les AGPI LC (n-3) n'ont pas d'effet sur le niveau d'expression des deux mucines gélifiantes étudiées dans les poumons de souris *Cftr Δ F508*, avant ou après induction d'une inflammation pulmonaire.

Chez les souris de type sauvage, les AGPI LC (n-3) tendent à diminuer l'expression de *Muc5b*, après induction d'une inflammation pulmonaire par inhalation de LPS. Ce résultat est en accord avec les résultats précédents du laboratoire où il avait été montré une diminution significative de l'expression de *Muc5b* chez des souris de type sauvage grâce à une supplémentation en AGPI LC (n-3) après infection pulmonaire à *P. aeruginosa* (Tetaert et al., 2007).

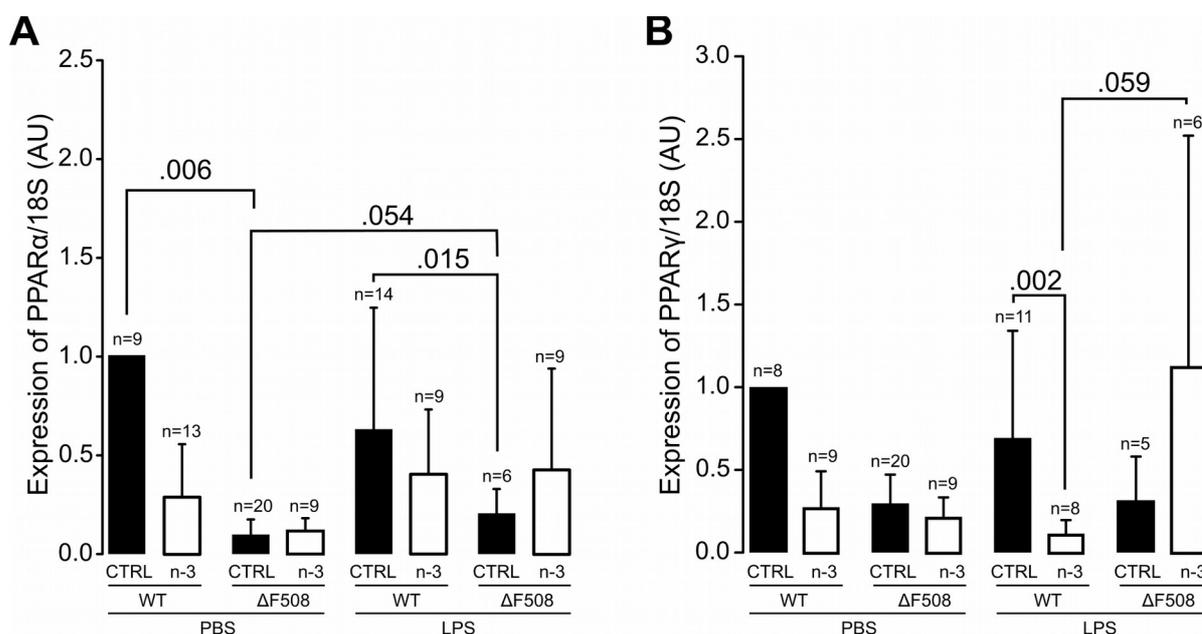


Figure 49 : Expression des PPAR mesurée par RT-qPCR dans les ARNm extraits de poumon.

(A) *PPARα* et (B) *PPARγ*. Les transcrits sont normalisés au 18S. Les données sont représentées comme médiane±SEM (5-20 souris/groupe). CTRL, régime contrôle ; n-3, régime enrichi en AGPI LC (n-3) ; WT, souris de type sauvage ; ΔF508, souris CfrΔF508.

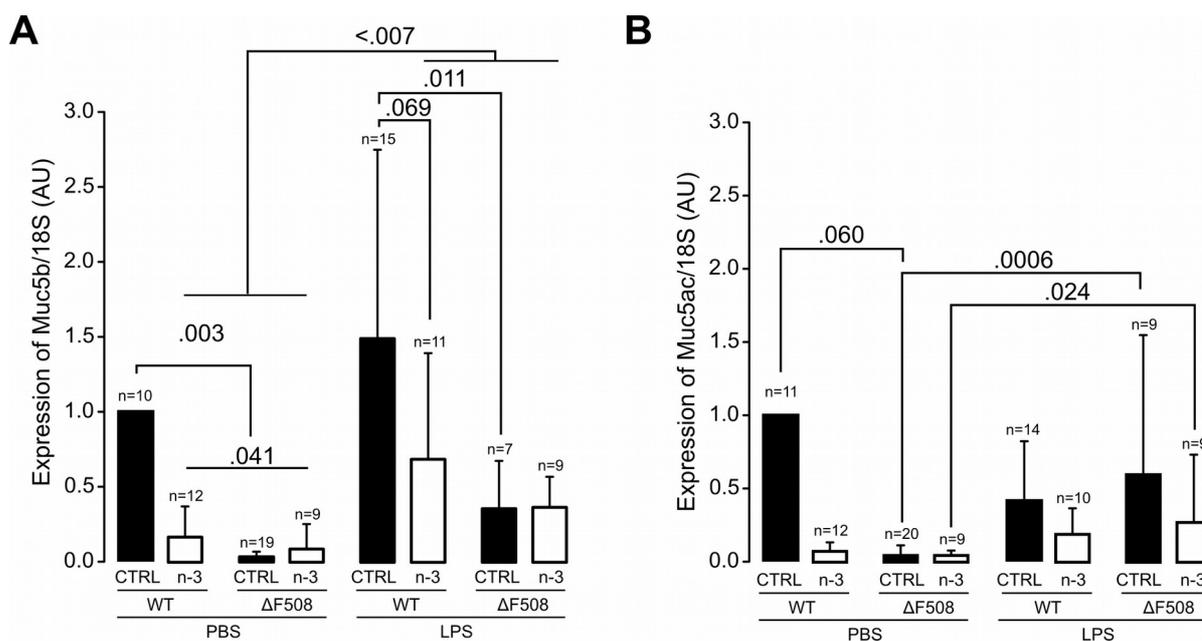


Figure 50 : Expression des mucines gélifiantes mesurée par RT-qPCR dans les ARNm extraits de poumon.

(A) *Muc5b* et (B) *Muc5ac*. Les transcrits sont normalisés par rapport au *18S*. Les données sont représentées par médiane \pm erreur standard (le nombre de souris n est indiqué pour chaque groupe). CTRL : régime contrôle ; n-3 : régime enrichi en AGPI LC (n-3) ; WT : souris de type sauvage ; $\Delta F508$: souris homozygotes *Cftr* $\Delta F508$.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

1 Profil d'expression protéique de Muc5b murine

La mucine Muc5b, comme les autres mucines gélifiantes, reste difficile à étudier, à cause de son haut poids moléculaire et de sa forte O-glycosylation. Nous avons donc créé, par recombinaison homologe, une souris Muc5b-GFP pour laquelle la protéine Muc5b est couplée à la protéine fluorescente GFP. Le choix s'est porté sur la GFP car ce fluorochrome est excitable à 488 nm et peut donc être utilisé sur l'endomicroscope confocal à fluorescence du laboratoire. De plus, il existe de nombreux anticorps monoclonaux et polyclonaux commerciaux anti-GFP connus pour être très fiables. Enfin, la GFP permettra la visualisation de Muc5b sur souris anesthésiées, sur tissus frais et sur tissus fixés. Notre étude doit encore être complétée par des explorations biochimiques afin de montrer que le tag GFP ne modifie pas la bonne dimérisation de la mucine. Ceci sera réalisé par Western-blot en milieu dénaturant et non dénaturant.

La souris Muc5b-GFP a permis de montrer la production de la mucine Muc5b dans la conjonctive de l'œil, l'oreille moyenne (cavité tympanique et trompe d'Eustache), la cavité nasale, les voies respiratoires (trachée et bronches), la vésicule biliaire et le tractus reproducteur femelle (vagin et cervix). Nous n'avons pas noté de différence d'intensité de fluorescence de la GFP, par endomicroscopie confocale à fluorescence, entre les souris hétérozygotes et homozygotes. Dans l'œil, nous avons mis en évidence que la proportion de cellules caliciformes conjonctivales produisant Muc5b est beaucoup plus importante (30 à 50 % des cellules caliciformes conjonctivales totales) que ce qui était préalablement publié. Dans le tractus reproducteur femelle, nous avons montré une variation de la production de Muc5b en fonction du cycle œstral, avec un pic de production en phase de pro-œstrus et une forte diminution en met-œstrus. Les profils d'expression de la mucine chez l'Homme et le rongeur sont donc parfaitement superposables, validant l'intérêt du modèle

murin pour l'étude de Muc5b dans la physiopathologie humaine.

La GFP permet également de suivre la production de Muc5b et la densité de cellules produisant Muc5b dans des modèles murins pathologiques. Sur souris anesthésiées, nous avons montré une diminution de la densité de cellules calciformes conjonctivales produisant Muc5b dans un modèle d'œil sec, qui est restaurée par l'application topique d'interleukine 13. Nous avons donc montré que Muc5b est un biomarqueur de la densité des cellules calciformes conjonctivales. Notre souris Muc5b-GFP rapporteur pourrait être utilisée pour déterminer *in vivo* les mécanismes de perte des cellules calciformes en cas de sécheresse oculaire. Cette lignée transgénique pourrait aussi être un modèle préclinique pour tester des traitements dans le syndrome de l'œil sec.

Il a été suggéré que Muc5b pourrait être un biomarqueur d'évaluation de la toxicité de microbicides dans le tractus génital féminin. En effet, des applications répétées de nonoxynol-9 8 % ou de BAK 2 % induisent une diminution de la quantité de Muc5b dans les sécrétions vaginales de souris et de lapines, alors que des applications répétées de Tenofovir 1 % (microbicide non toxique) n'ont pas d'effet sur la concentration en Muc5b (Fields et al., 2014). Cette étude présente néanmoins un biais ; la phase du cycle œstral dans laquelle sont les souris en fin d'expérimentation n'est pas précisée. Or, nous avons montré une forte variation de la production de Muc5b en fonction du cycle œstral. Il serait intéressant de reproduire cette étude avec nos souris Muc5b-GFP. La possibilité de visualiser facilement la production de Muc5b *in vivo* dans la cavité vaginale permettrait d'évaluer la toxicité des différentes molécules quelle que soit la phase du cycle et de valider ou non l'utilisation de Muc5b comme biomarqueur d'évaluation de la toxicité des microbicides.

La totale ou quasi absence de fluorescence dans l'oreille moyenne des souris Muc5b-GFP étudiées par endomicroscopie confocale à fluorescence suggère que nos souris ne développent pas d'otite spontanément. La souris Muc5b-GFP pourrait cependant nous permettre de facilement suivre la production de Muc5b lors d'otite moyenne, soit par croisement des souris Muc5b-GFP avec des souris transgéniques développant spontanément des otites (Bartlett et al., 2015; Chen et al., 2013;

Kerschner et al., 2013; Noben-Trauth and Latoche, 2011; Roy et al., 2014; Rye et al., 2011; Tian et al., 2012; Zhang et al., 2012), soit par induction d'une infection ou d'une inflammation dans l'oreille moyenne (Ryan et al., 2006; Sabirov and Metzger, 2008).

Lors de ces travaux, nous avons également montré qu'il était possible de suivre la production de Muc5b dans des explants en culture, notamment de poumons entiers embryonnaires (stériles). L'utilisation d'explants permet de tester *ex vivo* l'efficacité de traitements ciblant la production de Muc5b, dans un tissu spécifique. Il serait également possible de créer des lignées cellulaires immortalisées afin d'étudier *in vitro* les mécanismes de régulation de l'expression de Muc5b, dans chaque type cellulaire producteur de la mucine. Nos connaissances sur les mécanismes de régulation des mucines gélifiantes restent limitées. Ainsi, notre modèle de souris transgénique permettrait d'étudier la régulation de la production de Muc5b *in vitro* et *in vivo*.

Le dosage des mucines, par ELISA ou Western-blot, est relativement difficile. C'est pourquoi la majorité des études n'évaluent que l'expression par RT-qPCR des mucines. Cependant, les informations sur la production de la protéine restent limitées. La GFP est ici un outil intéressant, car elle peut être dosée par mesure de la fluorescence directe ou par ELISA.

Quel que soit le tissu considéré, la production de Muc5b est quasiment toujours accompagnée de celle de Muc5ac. Le développement d'une lignée murine pour coupler la mucine Muc5ac avec un marqueur autre que la GFP, comme le marqueur mCherry, serait complémentaire afin de distinguer les fonctions des deux mucines.

2 Rôle de Muc5b

2.1 En situation normale

Pour étudier le rôle de Muc5b, lors de la construction de la souris Muc5b-GFP, des sites *LoxP* ont été introduits de part et d'autre des deux derniers exons de *Muc5b* afin d'obtenir des lignées murines pour lesquelles le gène *Muc5b* est invalidé,

soit dans tous les tissus où il est exprimé, soit dans un tissu spécifique. Nous disposons ainsi d'une lignée murine pour laquelle le gène *Muc5b* est invalidé dans tous les tissus (*Muc5b*KO) et d'une lignée où il est invalidé spécifiquement dans le poumon (*Muc5b*^{lung ko/ko}).

Alors que les souris *Muc5b*^{lung ko/ko} n'ont pas de phénotype particulier, les souris *Muc5b*KO ont un phénotype pulmonaire marqué. Cette différence de phénotype pulmonaire entre les deux lignées murines invalidées pour *Muc5b* pourrait s'expliquer par une clairance mucociliaire trachéale moins efficace chez les souris *Muc5b*KO que chez les souris *Muc5b*^{lung ko/ko}. En effet, chez les souris *Muc5b*^{lung ko/ko}, la production de *Muc5b* dans les glandes de la sous-muqueuse trachéale est normale, alors que chez les souris *Muc5b*KO, *Muc5b* n'est pas produite dans la trachée. Or, grâce à un autre modèle de souris déficiente pour le gène *Muc5b*, il a été montré que *Muc5b* est indispensable à la clairance mucociliaire (Roy et al., 2014). Il est donc possible que les poussières émises par la litière des cages participent au développement du phénotype pulmonaire observé chez les souris *Muc5b*KO. Il serait donc intéressant de tester différentes litières (cellulose, rafle de maïs...) en remplacement de la litière habituelle (copeaux de peuplier).

Une autre explication de cette différence de phénotype pulmonaire pourrait être l'implication de *Muc5b* dans le développement embryonnaire, et plus particulièrement dans le développement du tissu pulmonaire. Chez les souris *Muc5b*^{lung ko/ko}, l'action de la recombinaison *Cre* ne débute qu'au premier jour post-natal. Nous avons par ailleurs montré que la production de *Muc5b* commence dès le 12^{ème} jour du développement embryonnaire. Ceci suggère donc un rôle important de *Muc5b* dans le développement embryonnaire du tissu respiratoire. L'implication de *Muc5b* dans le développement embryonnaire nécessite une étude comparative d'embryons de souris *Muc5b*-GFP et *Muc5b*KO, à différents stades. Cette étude est en cours au laboratoire.

2.2 En situation pathologique

2.2.1 Muc5b dans le cancer du sein

Le laboratoire a précédemment montré que Muc5b est détectée dans toutes les tumeurs prélevées chez des souris MMTV-Hras, une lignée transgénique murine qui développe spontanément des tumeurs mammaires (Valque et al., 2011). En croisant les souris MMTV-Hras avec des souris Muc5b-GFP, il serait peut-être possible de voir la dissémination métastatique, à proximité des tumeurs mammaires, par microscopie intravitale, grâce à la GFP.

Il serait également intéressant de croiser les souris MMTV-Hras avec les souris Muc5bKO afin de voir si Muc5b est impliquée dans le développement des tumeurs mammaires. Nous nous attendons à ce que les souris MMTV-Hras;Muc5bKO ne développent pas, ou moins, de tumeurs mammaires.

2.2.2 Muc5b dans la lithiase biliaire

Dans la lithiase biliaire humaine, il a été supposé que, malgré une sur-expression de MUC5B, seules MUC2 et MUC5AC seraient impliquées dans le développement de calculs biliaires (Sasaki et al., 1998). Notre souris Muc5bKO permettrait de confirmer, ou infirmer, la non-participation de Muc5b au développement de calculs biliaires chez la souris. En effet, si Muc5b n'est pas impliquée dans la formation de calculs biliaires, nous nous attendons à ce que des souris Muc5bKO, soumises à un régime lithogénique contenant au moins 1 % de cholestérol et 0,5 % d'acide cholique, développent autant de calculs biliaires que des souris contrôles Muc5b-GFP.

2.2.3 Muc5b dans la régulation de la flore vaginale

Comme chez la femme, Muc5b est fortement produite dans le tractus génital femelle murin. Il serait intéressant de comparer les flores vaginales de souris Muc5b-GFP et Muc5bKO afin de déterminer le rôle de Muc5b dans le maintien d'une flore bactérienne normale.

Il serait également intéressant d'induire une vaginite chez des souris

Muc5b-GFP et Muc5bKO gestantes afin de montrer le rôle de Muc5b dans le maintien du bouchon muqueux au cours de la gestation. Nous nous attendons à ce que les souris Muc5bKO développent des infections intra-utérines, voir des mises-bas prématurées, comparées aux souris Muc5b-GFP gestantes, après induction d'une vaginite.

2.2.4 Muc5b et pathologies pulmonaires

2.2.4.1 Muc5b dans la fibrose pulmonaire idiopathique

Alors qu'il a été montré une sur-expression de MUC5B chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), aucun argument expérimental ne montre la relation entre MUC5B et la survenue d'une fibrose pulmonaire idiopathique (Burch, 2011). Grâce à nos lignées murines invalidées pour *Muc5b*, nous pouvons étudier l'implication de Muc5b dans la survenue de la fibrose pulmonaire, dans un modèle par inhalation de bléomycine. Si la survenue de la FPI est dépendante de Muc5b, alors nous nous attendons à ce que les souris déficientes en Muc5b ne développent pas, ou moins vite, une fibrose pulmonaire que les souris Muc5b-GFP, suite à l'inhalation de bléomycine. Ce modèle est néanmoins relativement long à mettre en place. En effet, le développement d'une fibrose dépend de nombreux facteurs expérimentaux (fond génétique des souris, âge, sexe, voies d'administration, dose...) (Walters and Kleeberger, 2008) et le protocole est relativement long (étude 1 à 6 mois après l'instillation de bléomycine).

2.2.4.2 Muc5b et maladies pulmonaires obstructives

Il serait intéressant de croiser des souris transgéniques sur-exprimant le canal β ENaC spécifiquement dans le poumon (souris β ENaC-Tg) avec les souris Muc5b-GFP et Muc5bKO afin de déterminer le rôle de mucines dans le développement de maladies pulmonaires obstructives, comme la BC ou la BPCO. La souris Muc5b-GFP permettrait de valider la présence de Muc5b dans les bouchons de mucus obstruant les voies respiratoires. Si Muc5b est bien impliquée dans le développement de bouchons de mucus, alors les souris β ENaC-Tg;Muc5bKO devraient être moins susceptibles à développer une maladie pulmonaire obstructive que les souris double-transgéniques β ENaC-Tg;Muc5b-GFP.

2.2.4.3 *Muc5b* et mucoviscidose

Afin de montrer le rôle de *Muc5b* dans le développement du phénotype respiratoire observé dans la mucoviscidose, le laboratoire a décidé d'étudier les souris *Cftr* Δ F508 croisées avec les lignées *Muc5b*-GFP et *Muc5b*KO. Ces croisements sont en cours. Notre hypothèse est que les souris *Cftr* Δ F508;*Muc5b*KO développent moins de bouchons bronchiques que les souris contrôles *Cftr* Δ F508;*Muc5b*-GFP suite à une infection pulmonaire à *P. aeruginosa*.

3 AGPI (n-3) et mucoviscidose

Le laboratoire étudie, depuis plusieurs années, les effets d'une supplémentation en acides gras polyinsaturés à longues chaînes (n-3) dans la mucoviscidose. Ici, nous avons montré qu'une supplémentation à long terme en AGPI LC (n-3) diminue l'hyperplasie basale des cellules épithéliales bronchiques de souris *Cftr* Δ F508, et diminue la métaplasie des cellules Club, module la réponse inflammatoire et limite les lésions pulmonaires des souris *Cftr* Δ F508 après induction d'une inflammation pulmonaire aiguë.

Dans cette étude, nous avons utilisé le modèle murin *Cftr* Δ F508, au lieu des souris *Cftr*^{-/-} utilisées dans les études précédentes du laboratoire. Le modèle *Cftr* Δ F508 est plus proche de la réalité, puisque la mutation Δ F508 est retrouvée chez près de 70 % des patients. Cependant, le modèle murin *Cftr* Δ F508 est généralement admis comme un mauvais modèle murin de la mucoviscidose, car les souris *Cftr* Δ F508 ne développent pas de phénotype pulmonaire. Nous avons cependant observé, qu'à l'âge adulte, les souris *Cftr* Δ F508 ont des lésions histologiques avec des alvéoles collabées, une hyperplasie des cellules épithéliales bronchiques et une infiltration péribronchique et périvasculaire de cellules inflammatoires. L'équipe de Teresinha Leal (Louvain, Belgique) avait également montré une inflammation pulmonaire spontanée chez les souris *Cftr* Δ F508 (Legssyer et al., 2006).

La principale limite de notre étude est la non séparation des sexes. En effet, le laboratoire avait précédemment montré que les souris mâles et femelles ne répondent pas de la même manière à une infection pulmonaire à *P. aeruginosa*, suite

à une supplémentation en AGPI LC (n-3) (Tiesset et al., 2011). De plus, il est connu que les hommes atteints de mucoviscidose ont des anomalies du métabolisme des AGPI plus marquées que chez les patientes femmes (Coste et al., 2008). La difficulté à obtenir des femelles homozygotes Cftr Δ F508 et la mortalité dans la lignée sont des facteurs limitants.

Concernant l'expression des mucines pulmonaires (*Muc5ac* et *Muc5b*), nous n'avons vu aucun effet des AGPI LC (n-3) sur leur expression basale ou après induction d'une inflammation pulmonaire. De plus, l'induction d'une inflammation pulmonaire aiguë induit une augmentation de l'expression de *Muc5ac*, mais pas de *Muc5b*, chez les souris Cftr Δ F508. Il est possible que l'induction d'une inflammation pulmonaire aiguë par inhalation de LPS induise une moindre réponse au niveau de l'expression des mucines pulmonaires que lors d'une infection pulmonaire à *P. aeruginosa*.

CONCLUSION

Notre modèle murin transgénique *Muc5b*-GFP a permis de montrer que le profil de production de la mucine *Muc5b* chez la souris est identique au profil d'expression déterminé chez l'Homme. L'excellente conservation de l'apomucine entre les deux espèces et les profils d'expression similaires confortent le modèle murin comme un excellent organisme pour étudier la régulation de la production de la mucine en situations normale et pathologique. Les mesures d'expression/production des mucines sont souvent critiquables par les techniques utilisées, non adaptées aux macromolécules. Le rapporteur GFP devrait permettre des dosages plus réalistes et reproductibles d'un laboratoire à l'autre.

En situation normale, la GFP permettra, entre autres, de préciser la production de la mucine dans le temps (embryogenèse) et de manière cellule-spécifique. Elle permettra aussi de pouvoir mesurer la production de la mucine par une approche de type ELISA. Cela sera d'autant plus facile que nous disposons maintenant aussi d'une lignée invalidée tous-tissus pour *Muc5b* pour la valeur nulle de fluorescence de référence.

Cette lignée transgénique « rapporteur », unique dans le domaine des mucines, doit permettre une meilleure compréhension des mécanismes de régulation d'expression de la mucine et de la différenciation des cellules caliciformes. Ceci est rendu possible par la méthode choisie de construction du gène rapporteur. En effet, contrairement à la transgénèse classique avec insertion aléatoire du transgène, la recombinaison homologue a l'immense avantage de permettre l'étude de l'expression du gène sous le contrôle de son promoteur endogène et, de manière plus générale, sous l'influence de la totalité de l'environnement génétique du gène. Ces études de régulation pourront être effectuées sur souris entière, sur explants, ou encore sur cellules *Muc5b*-GFP positives après immortalisation.

La souris *Muc5b*-GFP pourra aussi être informative dans les nombreux modèles murins de pathologies, qu'ils soient génétiques ou expérimentaux, et ceci

dans divers tissus où la production de la mucine est anormale (chapitre introductif) : otites, syndrome de l'œil sec, BPCO, mucoviscidose, FPI, cancer mammaire, lithiase biliaire, vaginoses, etc. Le modèle semble d'autant plus intéressant qu'il permet la visualisation de la densité des cellules caliciformes GFP-positives *in vivo* sur souris anesthésiées, réduisant ainsi le nombre de souris requises par expérimentation, afin de mieux répondre aux exigences en éthique animale.

Enfin, la lignée Muc5b-GFP devrait également s'avérer comme un outil pré-clinique informatif pour tester des traitements et molécules dans les pathologies associées à une dérégulation de MUC5B ou à des anomalies de la densité des cellules à mucus, comme le suggèrent nos résultats obtenus sur le modèle de syndrome de l'œil sec.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Al-Turkmani, M.R., Freedman, S.D., Laposata, M., 2007. Fatty acid alterations and n-3 fatty acid supplementation in cystic fibrosis. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 77, 309–18.
- Ali, M., Pearson, J.P., 2007. Upper airway mucin gene expression: a review. *Laryngoscope* 117, 932–8.
- Ali, M.E.-S., 2009. Nasosinus mucin expression in normal and inflammatory conditions. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 9, 10–5.
- Alliende, C., Kwon, Y.J., Brito, M., Molina, C., Aguilera, S., Pérez, P., Leyton, L., Quest, A.F.G., Mandel, U., Veerman, E., Espinosa, M., Clausen, H., Leyton, C., Romo, R., González, M.-J., 2008. Reduced sulfation of muc5b is linked to xerostomia in patients with Sjögren syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 1480–7.
- Almståhl, A., Wikström, M., Groenink, J., 2001. Lactoferrin, amylase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in hyposalivation of different origins. *Oral Microbiol. Immunol.* 16, 345–52.
- Ambort, D., van der Post, S., Johansson, M.E. V, Mackenzie, J., Thomsson, E., Kregel, U., Hansson, G.C., 2011. Function of the CysD domain of the gel-forming MUC2 mucin. *Biochem. J.* 436, 61–70.
- Anaya, J.M., Talal, N., 1999. Sjögren's syndrome comes of age. *Semin. Arthritis Rheum.* 28, 355–9.
- Andersch-Björkman, Y., Thomsson, K.A., Holmén Larsson, J.M., Ekerhovd, E., Hansson, G.C., 2007. Large scale identification of proteins, mucins, and their O-glycosylation in the endocervical mucus during the menstrual cycle. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 708–16.
- Arul, G.S., Moorghen, M., Myerscough, N., Alderson, D.A., Spicer, R.D., Corfield, A.P., 2000. Mucin gene expression in Barrett's oesophagus: an in situ hybridisation and immunohistochemical study. *Gut* 47, 753–61.
- Audie, J.P., Janin, A., Porchet, N., Copin, M.C., Gosselin, B., Aubert, J.P., 1993. Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 1479–85.

Audie, J.P., Tetaert, D., Pigny, P., Buisine, M.P., Janin, A., Aubert, J.P., Porchet, N., Boersma, A., 1995. Mucin gene expression in the human endocervix. *Hum. Reprod.* 10, 98–102.

B

Bansil, R., Turner, B.S., 2006. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11, 164–70.

Barabino, S., Shen, L., Chen, L., Rashid, S., Rolando, M., Dana, M.R., 2005. The controlled-environment chamber: a new mouse model of dry eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 2766–71.

Bartlett, J.A., Meyerholz, D.K., Wohlford-Lenane, C.L., Naumann, P.W., Salzman, N.H., McCray, P.B., 2015. Increased susceptibility to otitis media in a Splunc1-deficient mouse model. *Dis. Model. Mech.* 8, 501–8.

Baudouin, C., Labbé, A., Liang, H., Pauly, A., Brignole-Baudouin, F., 2010. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog. Retin. Eye Res.* 29, 312–34.

Bell, S.L., Khatri, I.A., Xu, G., Forstner, J.F., 1998. Evidence that a peptide corresponding to the rat Muc2 C-terminus undergoes disulphide-mediated dimerization. *Eur. J. Biochem.* 253, 123–31.

Bell, S.L., Xu, G., Forstner, J.F., 2001. Role of the cystine-knot motif at the C-terminus of rat mucin protein Muc2 in dimer formation and secretion. *Biochem. J.* 357, 203–9.

Berois, N., Varangot, M., Sónora, C., Zarantonelli, L., Pressa, C., Laviña, R., Rodríguez, J.L., Delgado, F., Porchet, N., Aubert, J.-P., Osinaga, E., 2003. Detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells using an RT-PCR assay of MUC5B mRNA. *Int. J. cancer* 103, 550–5.

Borie, R., Crestani, B., Dieude, P., Nunes, H., Allanore, Y., Kannengiesser, C., Airo, P., Matucci-Cerinic, M., Wallaert, B., Israel-Biet, D., Cadranet, J., Cottin, V., Gazal, S., Peljto, A.L., Varga, J., Schwartz, D.A., Valeyre, D., Grandchamp, B., 2013. The MUC5B variant is associated with idiopathic pulmonary fibrosis but not with systemic sclerosis interstitial lung disease in the European Caucasian population. *PLoS One* 8, e70621.

- Briselden, A.M., Moncla, B.J., Stevens, C.E., Hillier, S.L., 1992. Sialidases (neuraminidases) in bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated microflora. *J. Clin. Microbiol.* 30, 663–6.
- Brunelli, R., Papi, M., Arcovito, G., Bompiani, A., Castagnola, M., Parasassi, T., Sampaolese, B., Vincenzoni, F., De Spirito, M., 2007. Globular structure of human ovulatory cervical mucus. *FASEB J.* 21, 3872–6.
- Brunner, L.S., Smeltzer, S.C., Suddarth, D.S., Bare, B., 2006. Soins infirmiers en médecine et en chirurgie, De Boeck S. ed.
- Buchanan, P.J., Ernst, R.K., Elborn, J.S., Schock, B., 2009. Role of CFTR, *Pseudomonas aeruginosa* and Toll-like receptors in cystic fibrosis lung inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 863–7.
- Buettner, F.F.R., Ashikov, A., Tiemann, B., Lehle, L., Bakker, H., 2013. *C. elegans* DPY-19 is a C-mannosyltransferase glycosylating thrombospondin repeats. *Mol. Cell* 50, 295–302.
- Buisine, M.P., Devisme, L., Copin, M.C., Durand-Réville, M., Gosselin, B., Aubert, J.P., Porchet, N., 1999. Developmental mucin gene expression in the human respiratory tract. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20, 209–18.
- Buisine, M.P., Devisme, L., Degand, P., Dieu, M.C., Gosselin, B., Copin, M.C., Aubert, J.P., Porchet, N., 2000a. Developmental mucin gene expression in the gastroduodenal tract and accessory digestive glands. II. Duodenum and liver, gallbladder, and pancreas. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 1667–76.
- Buisine, M.P., Devisme, L., Maunoury, V., Deschodt, E., Gosselin, B., Copin, M.C., Aubert, J.P., Porchet, N., 2000b. Developmental mucin gene expression in the gastroduodenal tract and accessory digestive glands. I. Stomach. A relationship to gastric carcinoma. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 1657–66.
- Burch, L.H., 2011. MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 365, 178–9.

C

- Caramori, G., Casolari, P., Di Gregorio, C., Saetta, M., Baraldo, S., Boschetto, P., Ito, K., Fabbri, L.M., Barnes, P.J., Adcock, I.M., Cavallero, G., Chung, K.F., Papi, A., 2009. MUC5AC expression is increased in bronchial submucosal glands of stable COPD patients. *Histopathology* 55, 321–31.

- Caramori, G., Di Gregorio, C., Carlstedt, I., Casolari, P., Guzzinati, I., Adcock, I.M., Barnes, P.J., Ciaccia, A., Cavallesco, G., Chung, K.F., Papi, A., 2004. Mucin expression in peripheral airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Histopathology* 45, 477–84.
- Cauci, S., Driussi, S., Monte, R., Lanzafame, P., Pitzus, E., Quadrifoglio, F., 1998. Immunoglobulin A response against *Gardnerella vaginalis* hemolysin and sialidase activity in bacterial vaginosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 178, 511–5.
- Chaudhury, N.M.A., Shirlaw, P., Pramanik, R., Carpenter, G.H., Proctor, G.B., 2015. Changes in Saliva Rheological Properties and Mucin Glycosylation in Dry Mouth. *J. Dent. Res.* 94, 1660–7.
- Chen, J., Ingham, N., Clare, S., Raisen, C., Vancollie, V.E., Ismail, O., McIntyre, R.E., Tsang, S.H., Mahajan, V.B., Dougan, G., Adams, D.J., White, J.K., Steel, K.P., 2013. Mchp1-deficient mice reveal a role for MCPH1 in otitis media. *PLoS One* 8, e58156.
- Chen, Y., Zhao, Y.H., Di, Y.P., Wu, R., 2001a. Characterization of human mucin 5B gene expression in airway epithelium and the genomic clone of the amino-terminal and 5'-flanking region. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 542–53.
- Chen, Y., Zhao, Y.H., Kalaslavadi, T.B., Hamati, E., Nehrke, K., Le, A.D., Ann, D.K., Wu, R., 2004. Genome-wide search and identification of a novel gel-forming mucin MUC19/Muc19 in glandular tissues. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30, 155–65.
- Chen, Y., Zhao, Y.H., Wu, R., 2001b. In silico cloning of mouse Muc5b gene and upregulation of its expression in mouse asthma model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 1059–66.
- Chillappagari, S., Preuss, J., Licht, S., Müller, C., Mahavadi, P., Sarode, G., Vogelmeier, C., Guenther, A., Nahrlich, L., Rubin, B.K., Henke, M.O., 2015. Altered protease and antiprotease balance during a COPD exacerbation contributes to mucus obstruction. *Respir. Res.* 16, 85.
- Clegg, J.P., Guest, J.F., Lehman, A., Smith, A.F., 2006. The annual cost of dry eye syndrome in France, Germany, Italy, Spain, Sweden and the United Kingdom among patients managed by ophthalmologists. *Ophthalmic Epidemiol.* 13, 263–74.
- Clunes, M.T., Boucher, R.C., 2007. Cystic Fibrosis: The Mechanisms of Pathogenesis of an Inherited Lung Disorder. *Drug Discov. Today. Dis. Mech.* 4, 63–72.

- Cohen, R.E., Aguirre, A., Neiders, M.E., Levine, M.J., Jones, P.C., Reddy, M.S., Haar, J.G., 1990. Immunochemistry of high molecular-weight human salivary mucin. *Arch. Oral Biol.* 35, 127–36.
- Cone, R.A., 2009. Barrier properties of mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 75–85.
- Coste, T.C., Deumer, G., Reyckler, G., Lebecque, P., Wallemacq, P., Leal, T., 2008. Influence of pancreatic status and sex on polyunsaturated fatty acid profiles in cystic fibrosis. *Clin. Chem.* 54, 388–95.
- Coyne, C.B., Vanhook, M.K., Gambling, T.M., Carson, J.L., Boucher, R.C., Johnson, L.G., 2002. Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol. Biol. Cell* 13, 3218–34.
- Critchfield, A.S., Yao, G., Jaishankar, A., Friedlander, R.S., Lieleg, O., Doyle, P.S., McKinley, G., House, M., Ribbeck, K., 2013. Cervical mucus properties stratify risk for preterm birth. *PLoS One* 8, e69528.
- Crouzier, T., Co, J., 2015. Mucus it's snot what you think! [En ligne]. URL biopolymersforlife.org/outreach/ (accessed 1.1.16).
- Cui, C.Y., Smith, J.A., Schlessinger, D., Chan, C.C., 2005. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia disruption yields a mouse model for ocular surface disease and resultant blindness. *Am. J. Pathol.* 167, 89–95.
- Culp, D.J., Latchney, L.R., Fallon, M.A., Denny, P.A., Denny, P.C., Couwenhoven, R.I., Chuang, S., 2004. The gene encoding mouse Muc19: cDNA, genomic organization and relationship to Smgc. *Physiol. Genomics* 19, 303–18.

D

- Das, B., Cash, M.N., Hand, A.R., Shivazad, A., Grieshaber, S.S., Robinson, B., Culp, D.J., 2010. Tissue distribution of murine Muc19/smgc gene products. *J. Histochem. Cytochem.* 58, 141–56.
- Daunter, B., Khoo, S.K., 1984. Role of cervical mucus in human infertility. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 24, 271–5.
- Davis, P.B., 2006. Cystic fibrosis since 1938. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 475–82.
- Davis, P.B., di Sant'Agnese, P.A., 1984. Diagnosis and treatment of cystic fibrosis. An update. *Chest* 85, 802–9.

- Debailleul, V., Laine, A., Huet, G., Mathon, P., D'Hooghe, M.C., Aubert, J.P., Porchet, N., 1998. Human mucin genes MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, and MUC6 express stable and extremely large mRNAs and exhibit a variable length polymorphism. An improved method to analyze large mRNAs. *J. Biol. Chem.* 273, 881–90.
- Denny, P.C., Mirels, L., Denny, P.A., 1996. Mouse submandibular gland salivary apomucin contains repeated N-glycosylation sites. *Glycobiology* 6, 43–50.
- Desseyn, J.L., 2009. Mucin CYS domains are ancient and highly conserved modules that evolved in concert. *Mol. Phylogenet. Evol.* 52, 284–92.
- Desseyn, J.L., 2016. Le défaut de mucus intestinal, nouvelle cible thérapeutique. *Biofutur* 372, 40–5.
- Desseyn, J.L., Aubert, J.P., Porchet, N., Laine, A., 2000. Evolution of the large secreted gel-forming mucins. *Mol. Biol. Evol.* 17, 1175–84.
- Desseyn, J.L., Aubert, J.P., Van Seuning, I., Porchet, N., Laine, A., 1997a. Genomic organization of the 3' region of the human mucin gene MUC5B. *J. Biol. Chem.* 272, 16873–83.
- Desseyn, J.L., Buisine, M.P., Porchet, N., Aubert, J.P., Degand, P., Laine, A., 1998a. Evolutionary history of the 11p15 human mucin gene family. *J. Mol. Evol.* 46, 102–6.
- Desseyn, J.L., Buisine, M.P., Porchet, N., Aubert, J.P., Laine, A., 1998b. Genomic organization of the human mucin gene MUC5B. cDNA and genomic sequences upstream of the large central exon. *J. Biol. Chem.* 273, 30157–64.
- Desseyn, J.L., Clavereau, I., Laine, A., 2002. Cloning, chromosomal localization and characterization of the murine mucin gene orthologous to human MUC4. *Eur. J. Biochem.* 269, 3150–9.
- Desseyn, J.L., Gouyer, V., Gottrand, F., 2016. Biological modeling of mucus to modulate mucus barriers. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 310, G225–7.
- Desseyn, J.L., Gouyer, V., Tetaert, D., 2008a. Architecture of the gel-forming mucins. In: *The Epithelial Mucins: Structure / Function. Role in Cancer and Inflammatory Diseases*.
- Desseyn, J.L., Guyonnet-Dupérat, V., Porchet, N., Aubert, J.P., Laine, A., 1997b. Human mucin gene MUC5B, the 10.7-kb large central exon encodes various alternate subdomains resulting in a super-repeat. Structural evidence for a 11p15.5 gene family. *J. Biol. Chem.* 272, 3168–78.

- Desseyn, J.L., Laine, A., 2003. Characterization of mouse muc6 and evidence of conservation of the gel-forming mucin gene cluster between human and mouse. *Genomics* 81, 433–6.
- Desseyn, J.L., Rousseau, K., Laine, A., 1999. Fifty-nine bp repeat polymorphism in the uncommon intron 36 of the human mucin gene MUC5B. *Electrophoresis* 20, 493–6.
- Desseyn, J.L., Tetaert, D., Gouyer, V., 2008b. Architecture of the large membrane-bound mucins. *Gene* 410, 215–22.
- DEWS, 2007a. Management and therapy of dry eye disease: report of the Management and Therapy Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul. Surf.* 5, 163–78.
- DEWS, 2007b. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul. Surf.* 5, 75–92.
- DEWS, 2007c. The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul. Surf.* 5, 93–107.
- DEWS, 2007d. Design and conduct of clinical trials: report of the Clinical Trials Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul. Surf.* 5, 153–62.
- Dif, F., Wu, Y.Z., Burgel, P.R., Ollero, M., Leduc, D., Aarbiou, J., Borot, F., Garcia-Verdugo, I., Martin, C., Chignard, M., Israel-Biet, D., Kita, Y., Scholte, B.J., Touqui, L., 2010. Critical role of cytosolic phospholipase A2{alpha} in bronchial mucus hypersecretion in CFTR-deficient mice. *Eur. Respir. J.* 36, 1120–30.
- Duane, David, T., Tasman, W., Jaeger, E.A., 2006. *Duane's Ophthalmology On Cd-rom*, Philadelph. ed.
- Dursun, D., Wang, M., Monroy, D., Li, D.Q., Lokeshwar, B.L., Stern, M.E., Pflugfelder, S.C., 2002. A mouse model of keratoconjunctivitis sicca. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 632–8.
- Dwek, M. V, Ross, H.A., Leatham, A.J., 2001. Proteome and glycosylation mapping identifies post-translational modifications associated with aggressive breast cancer. *Proteomics* 1, 756–62.

E

- Eickelberg, O., Selman, M., 2010. Update in diffuse parenchymal lung disease 2009. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181, 883–8.
- Elsheikh, M.N., Mahfouz, M.E., 2006. Up-regulation of MUC5AC and MUC5B mucin genes in nasopharyngeal respiratory mucosa and selective up-regulation of MUC5B in middle ear in pediatric otitis media with effusion. *Laryngoscope* 116, 365–9.
- Escande, F., Porchet, N., Aubert, J.P., Buisine, M.P., 2002. The mouse *Muc5b* mucin gene: cDNA and genomic structures, chromosomal localization and expression. *Biochem. J.* 363, 589–98.
- Evans, C.M., Williams, O.W., Tuvim, M.J., Nigam, R., Mixides, G.P., Blackburn, M.R., DeMayo, F.J., Burns, A.R., Smith, C., Reynolds, S.D., Stripp, B.R., Dickey, B.F., 2004. Mucin is produced by clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31, 382–94.

F

- Fahy, J. V., Dickey, B.F., 2010. Airway mucus function and dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 363, 2233–47.
- Ferro, F., Vagelli, R., Bruni, C., Cafaro, G., Marcucci, E., Bartoloni, E., Baldini, C., 2016. One year in review 2016: Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 34, 161–71.
- Fields, S., Song, B., Rasoul, B., Fong, J., Works, M.G., Shew, K., Yiu, Y., Mirsalis, J., D'Andrea, A., 2014. New candidate biomarkers in the female genital tract to evaluate microbicide toxicity. *PLoS One* 9, e110980.
- Fischer, A.J., Singh, S.B., Adam, R.J., Stoltz, D.A., Baranano, C.F., Kao, S., Weinberger, M.M., McCray, P.B., Starner, T.D., 2014. Tracheomalacia is associated with lower FEV1 and *Pseudomonas* acquisition in children with CF. *Pediatr. Pulmonol.* 49, 960–70.
- Flores, A.M., Casey, S.D., Felix, C.M., Phuan, P.W., Verkman, A.S., Levin, M.H., 2016. Small-molecule CFTR activators increase tear secretion and prevent experimental dry eye disease. *FASEB J.* 30, 1789–97.
- Floyd, A.M., Zhou, X., Evans, C., Rompala, O.J., Zhu, L., Wang, M., Chen, Y., 2012. Mucin deficiency causes functional and structural changes of the ocular surface. *PLoS One* 7, e50704.

- Freedman, S.D., Blanco, P.G., Zaman, M.M., Shea, J.C., Ollero, M., Hopper, I.K., Weed, D.A., Gelrud, A., Regan, M.M., Laposata, M., Alvarez, J.G., O'Sullivan, B.P., 2004. Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *N. Engl. J. Med.* 350, 560–9.
- Freedman, S.D., Katz, M.H., Parker, E.M., Laposata, M., Urman, M.Y., Alvarez, J.G., 1999. A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in *cftr(-/-)* mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13995–4000.
- Fujisawa, T., Chang, M.M.J., Velichko, S., Thai, P., Hung, L.Y., Huang, F., Phuong, N., Chen, Y., Wu, R., 2011. NF- κ B mediates IL-1 β - and IL-17A-induced MUC5B expression in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45, 246–52.
- Furmanek, A., Hofsteenge, J., 2000. Protein C-mannosylation: facts and questions. *Acta Biochim. Pol.* 47, 781–9.

G

- Galluzzo, P., Bocchetta, M., 2011. Notch signaling in lung cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 11, 533–40.
- Ganesan, S., Comstock, A.T., Kinker, B., Mancuso, P., Beck, J.M., Sajjan, U.S., 2014. Combined exposure to cigarette smoke and nontypeable *Haemophilus influenzae* drives development of a COPD phenotype in mice. *Respir. Res.* 15, 11.
- Gauzeran, D., 2011. Pathologies tumorales des glandes salivaires accessoires. *Rev. Odontostomatol.* 40, 53–69.
- Ghosh, A., Boucher, R.C., Tarran, R., 2015. Airway hydration and COPD. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 3637–52.
- Gipson, I.K., 2004. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp. Eye Res.* 78, 379–88.
- Gipson, I.K., Ho, S.B., Spurr-Michaud, S.J., Tisdale, A.S., Zhan, Q., Torlakovic, E., Pudney, J., Anderson, D.J., Toribara, N.W., Hill, J.A., 1997. Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biol. Reprod.* 56, 999–1011.
- Gipson, I.K., Moccia, R., Spurr-Michaud, S., Argüeso, P., Gargiulo, A.R., Hill, J.A., Offner, G.D., Keutmann, H.T., 2001. The amount of MUC5B mucin in cervical mucus peaks at midcycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 594–600.

- Gipson, I.K., Spurr-Michaud, S., Moccia, R., Zhan, Q., Toribara, N., Ho, S.B., Gargiulo, A.R., Hill, J.A., 1999. MUC4 and MUC5B transcripts are the prevalent mucin messenger ribonucleic acids of the human endocervix. *Biol. Reprod.* 60, 58–64.
- Gipson, I.K., Tisdale, A.S., 1997. Visualization of conjunctival goblet cell actin cytoskeleton and mucin content in tissue whole mounts. *Exp. Eye Res.* 65, 407–15.
- Gosalia, N., Leir, S.H., Harris, A., 2013. Coordinate regulation of the gel-forming mucin genes at chromosome 11p15.5. *J. Biol. Chem.* 288, 6717–25.
- Gouyer, V., Dubuquoy, L., Robbe-Masselot, C., Neut, C., Singer, E., Plet, S., Geboes, K., Desreumaux, P., Gottrand, F., Desseyn, J.L., 2015. Delivery of a mucin domain enriched in cysteine residues strengthens the intestinal mucous barrier. *Sci. Rep.* 5, 9577.
- Gouyer, V., Leir, S.H., Tetaert, D., Liu, Y., Gottrand, F., Harris, A., Desseyn, J.L., 2010. The characterization of the first anti-mouse Muc6 antibody shows an increased expression of the mucin in pancreatic tissue of Cfr-knockout mice. *Histochem. Cell Biol.* 133, 517–25.
- Gross, T.J., Hunninghake, G.W., 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 345, 517–25.
- Grossman, S., Grossman, L.C., 2005. Pathophysiology of cystic fibrosis: implications for critical care nurses. *Crit. Care Nurse* 25, 46–51.
- Guillot, J., Guerry, M., Konska, G., Caldefie-Chezet, F., De Latour, M., Penault-Llorca, F., 2004. Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas. *Bull. Cancer* 91, 141–58.

H

- Han, F., Yu, H., Tian, C., Li, S., Jacobs, M.R., Benedict-Alderfer, C., Zheng, Q.Y., 2009. Role for Toll-like receptor 2 in the immune response to *Streptococcus pneumoniae* infection in mouse otitis media. *Infect. Immun.* 77, 3100–8.

- Hastan, D., Fokkens, W.J., Bachert, C., Newson, R.B., Bislimovska, J., Bockelbrink, A., Bousquet, P.J., Brozek, G., Bruno, A., Dahlén, S.E., Forsberg, B., Gunnbjörnsdóttir, M., Kasper, L., Krämer, U., Kowalski, M.L., Lange, B., Lundbäck, B., Salagean, E., Todo-Bom, A., Tomassen, P., Toskala, E., van Drunen, C.M., Bousquet, J., Zuberbier, T., Jarvis, D., Burney, P., 2011. Chronic rhinosinusitis in Europe—an underestimated disease. A GA²LEN study. *Allergy* 66, 1216–23.
- Hattrup, C.L., Gendler, S.J., 2008. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 431–57.
- Hauser, A.R., Jain, M., Bar-Meir, M., McColley, S.A., 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 29–70.
- Hautamaki, R.D., Kobayashi, D.K., Senior, R.M., Shapiro, S.D., 1997. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 277, 2002–4.
- Hayashi, T., Ishii, A., Nakai, S., Hasegawa, K., 2004. Ultrastructure of goblet-cell metaplasia from Clara cell in the allergic asthmatic airway inflammation in a mouse model of asthma in vivo. *Virchows Arch.* 444, 66–73.
- Hebbar, V., Damera, G., Sachdev, G.P., 2005. Differential expression of MUC genes in endometrial and cervical tissues and tumors. *BMC Cancer* 5, 124.
- Henderson, A.G., Ehre, C., Button, B., Abdullah, L.H., Cai, L.H., Leigh, M.W., DeMaria, G.C., Matsui, H., Donaldson, S.H., Davis, C.W., Sheehan, J.K., Boucher, R.C., Kesimer, M., 2014. Cystic fibrosis airway secretions exhibit mucin hyperconcentration and increased osmotic pressure. *J. Clin. Invest.* 124, 3047–60.
- Henke, M.O., John, G., Germann, M., Lindemann, H., Rubin, B.K., 2007. MUC5AC and MUC5B mucins increase in cystic fibrosis airway secretions during pulmonary exacerbation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 816–21.
- Hollingsworth, M.A., Swanson, B.J., 2004. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer* 4, 45–60.
- Horimasu, Y., Ohshimo, S., Bonella, F., Tanaka, S., Ishikawa, N., Hattori, N., Kohno, N., Guzman, J., Costabel, U., 2015. MUC5B promoter polymorphism in Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 20, 439–44.

- House, J.S., Zhu, S., Ranjan, R., Linder, K., Smart, R.C., 2010. C/EBPalpha and C/EBPbeta are required for Sebocyte differentiation and stratified squamous differentiation in adult mouse skin. *PLoS One* 5, e9837.
- Howe, L., Wiggins, R., Soothill, P.W., Millar, M.R., Horner, P.J., Corfield, A.P., 1999. Mucinase and sialidase activity of the vaginal microflora: implications for the pathogenesis of preterm labour. *Int. J. STD AIDS* 10, 442–7.
- Huang, J., Dattilo, L.K., Rajagopal, R., Liu, Y., Kaartinen, V., Mishina, Y., Deng, C.X., Umans, L., Zwijsen, A., Roberts, A.B., Beebe, D.C., 2009. FGF-regulated BMP signaling is required for eyelid closure and to specify conjunctival epithelial cell fate. *Development* 136, 1741–50.
- Huang, R., Yin, J., Chen, Y., Deng, F., Chen, J., Gao, X., Liu, Z., Yu, X., Zheng, J., 2015. The amino acid variation within the binding pocket 7 and 9 of HLA-DRB1 molecules are associated with primary Sjögren's syndrome. *J. Autoimmun.* 57, 53–9.
- Hubeau, C., Puchelle, E., Gaillard, D., 2001. Distinct pattern of immune cell population in the lung of human fetuses with cystic fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, 524–9.

I

- Iams, J.D., Goldenberg, R.L., Meis, P.J., Mercer, B.M., Moawad, A., Das, A., Thom, E., McNellis, D., Copper, R.L., Johnson, F., Roberts, J.M., 1996. The length of the cervix and the risk of spontaneous premature delivery. National Institute of Child Health and Human Development Maternal Fetal Medicine Unit Network. *N. Engl. J. Med.* 334, 567–72.
- Inaba, T., Hisatsune, C., Sasaki, Y., Ogawa, Y., Ebisui, E., Ogawa, N., Matsui, M., Takeuchi, T., Mikoshiba, K., Tsubota, K., 2014. Mice lacking inositol 1,4,5-trisphosphate receptors exhibit dry eye. *PLoS One* 9, e99205.
- Innes, A.L., Woodruff, P.G., Ferrando, R.E., Donnelly, S., Dolganov, G.M., Lazarus, S.C., Fahy, J. V, 2006. Epithelial mucin stores are increased in the large airways of smokers with airflow obstruction. *Chest* 130, 1102–8.
- Innes, B.A., Dorin, J.R., 2001. Submucosal gland distribution in the mouse has a genetic determination localized on chromosome 9. *Mamm. Genome* 12, 124–8.

- Itoh, Y., Kamata-Sakurai, M., Denda-Nagai, K., Nagai, S., Tsuiji, M., Ishii-Schrade, K., Okada, K., Goto, A., Fukayama, M., Irimura, T., 2008. Identification and expression of human epiglycanin/MUC21: a novel transmembrane mucin. *Glycobiology* 18, 74–83.
- Itzkowitz, S.H., Yuan, M., Montgomery, C.K., Kjeldsen, T., Takahashi, H.K., Bigbee, W.L., Kim, Y.S., 1989. Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res.* 49, 197–204.

J

- Jacob, A., Faddis, B.T., Chole, R.A., 2001. Chronic bacterial rhinosinusitis: description of a mouse model. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* 127, 657–64.
- Jacquot, J., Delion, M., Gangloff, S., Braux, J., Velard, F., 2016. Bone disease in cystic fibrosis: new pathogenic insights opening novel therapies. *Osteoporos. Int.* 27, 1401–12.
- Jeffery, P.K., Li, D., 1997. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur. Respir. J.* 10, 1655–62.
- Jonckheere, N., Velghe, A., Ducourouble, M.P., Copin, M.C., Renes, I.B., Van Seuninghen, I., 2011. The mouse *Muc5b* mucin gene is transcriptionally regulated by thyroid transcription factor-1 (TTF-1) and GATA-6 transcription factors. *FEBS J.* 278, 282–94.
- Jong, M.C., Gijbels, M.J., Dahlmans, V.E., Gorp, P.J., Koopman, S.J., Ponec, M., Hofker, M.H., Havekes, L.M., 1998. Hyperlipidemia and cutaneous abnormalities in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. *J. Clin. Invest.* 101, 145–52.

K

- Kamio, K., Matsushita, I., Hijikata, M., Kobashi, Y., Tanaka, G., Nakata, K., Ishida, T., Tokunaga, K., Taguchi, Y., Homma, S., Nakata, K., Azuma, A., Kudoh, S., Keicho, N., 2005. Promoter analysis and aberrant expression of the *MUC5B* gene in diffuse panbronchiolitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171, 949–57.

- Kaneko, Y., Yanagihara, K., Seki, M., Kuroki, M., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Mukae, H., Tomono, K., Kadota, J.I., Kohno, S., 2003. Clarithromycin inhibits overproduction of muc5ac core protein in murine model of diffuse panbronchiolitis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285, L847-53.
- Keicho, N., Hijikata, M., 2011. Genetic predisposition to diffuse panbronchiolitis. *Respirology* 16, 581–8.
- Kenchegowda, D., Swamynathan, S., Gupta, D., Wan, H., Whitsett, J., Swamynathan, S.K., 2011. Conditional disruption of mouse *Klf5* results in defective eyelids with malformed meibomian glands, abnormal cornea and loss of conjunctival goblet cells. *Dev. Biol.* 356, 5–18.
- Kerschner, J.E., 2007. Mucin gene expression in human middle ear epithelium. *Laryngoscope* 117, 1666–76.
- Kerschner, J.E., Hong, W., Taylor, S.R., Kerschner, J.A., Khampang, P., Wrege, K.C., North, P.E., 2013. A novel model of spontaneous otitis media with effusion (OME) in the *Oxgr1* knock-out mouse. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 77, 79–84.
- Kerschner, J.E., Li, J., Tsushiya, K., Khampang, P., 2010. Mucin gene expression and mouse middle ear epithelium. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 74, 864–8.
- Kim, D.-Y., Lee, S.H., Carter, R.G., Kato, A., Schleimer, R.P., Cho, S.H., 2016. A Recently Established Murine Model of Nasal Polyps Demonstrates Activation of B Cells, as Occurs in Human Nasal Polyps. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 55, 170–5.
- Kim, D.W., Lee, S.H., Ku, S.K., Cho, S.H., Cho, S.W., Yoon, G.H., Hwang, H.S., Park, J., Eum, W.S., Kwon, O.S., Choi, S.Y., 2013. Transduced PEP-1-FK506BP ameliorates corneal injury in Botulinum toxin A-induced dry eye mouse model. *BMB Rep.* 46, 124–9.
- Kim, Y.S., Gum, J., Brockhausen, I., 1996. Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconj. J.* 13, 693–707.
- Kirkham, S., Kolsum, U., Rousseau, K., Singh, D., Vestbo, J., Thornton, D.J., 2008. MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 1033–9.
- Kirkham, S., Sheehan, J.K., Knight, D., Richardson, P.S., Thornton, D.J., 2002. Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *Biochem. J.* 361, 537–46.

- Kojima, T., Wakamatsu, T.H., Dogru, M., Ogawa, Y., Igarashi, A., Ibrahim, O.M.A., Inaba, T., Shimizu, T., Noda, S., Obata, H., Nakamura, S., Wakamatsu, A., Shirasawa, T., Shimazaki, J., Negishi, K., Tsubota, K., 2012. Age-related dysfunction of the lacrimal gland and oxidative stress: evidence from the Cu,Zn-superoxide dismutase-1 (Sod1) knockout mice. *Am. J. Pathol.* 180, 1879–96.
- Kondo, M., Tamaoki, J., Takeyama, K., Nakata, J., Nagai, A., 2002. Interleukin-13 induces goblet cell differentiation in primary cell culture from Guinea pig tracheal epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27, 536–41.
- Konska, G., Favy, D., Guillot, J., Bernard-Gallon, D., de Latour, M., Fonck, Y., 1998. Expression of T and Tn antigens in breast cancers. *Comptes rendus des séances la Société Biol. ses Fil.* 192, 733–47.
- Kropski, J.A., Pritchett, J.M., Zoz, D.F., Crossno, P.F., Markin, C., Garnett, E.T., Degryse, A.L., Mitchell, D.B., Polosukhin, V. V, Rickman, O.B., Choi, L., Cheng, D.S., McConaha, M.E., Jones, B.R., Gleaves, L.A., McMahon, F.B., Worrell, J.A., Solus, J.F., Ware, L.B., Lee, J.W., Massion, P.P., Zaynagetdinov, R., White, E.S., Kurtis, J.D., Johnson, J.E., Groshong, S.D., Lancaster, L.H., Young, L.R., Steele, M.P., Phillips Iii, J.A., Cogan, J.D., Loyd, J.E., Lawson, W.E., Blackwell, T.S., 2015. Extensive phenotyping of individuals at risk for familial interstitial pneumonia reveals clues to the pathogenesis of interstitial lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 417–26.
- Kubba, H., Pearson, J.P., Birchall, J.P., 2000. The aetiology of otitis media with effusion: a review. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 25, 181–94.
- Kuperman, D., Schofield, B., Wills-Karp, M., Grusby, M.J., 1998. Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production. *J. Exp. Med.* 187, 939–48.

L

- Lamblin, G., Roussel, P., 1993. Airway mucins and their role in defence against micro-organisms. *Respir. Med.* 87, 421–6.
- Lang, T., Hansson, G.C., Samuelsson, T., 2007. Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16209–14.
- Lange, C., Fernandez, J., Shim, D., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A., Gipson, I.K., 2003. Mucin gene expression is not regulated by estrogen and/or progesterone in the ocular surface epithelia of mice. *Exp. Eye Res.* 77, 59–68.

- Lavoie, T.N., Lee, B.H., Nguyen, C.Q., 2011. Current Concepts: Mouse Models of Sjögren's Syndrome. *J. Biomed. Biotechnol.* 1–14.
- Lee, M.J., Kim, D.H., Ryu, J.S., Ko, A.Y., Ko, J.H., Kim, M.K., Wee, W.R., Khwarg, S.I., Oh, J.Y., 2015a. Topical TSG-6 Administration Protects the Ocular Surface in Two Mouse Models of Inflammation-Related Dry Eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 5175–81.
- Lee, M.J., Ko, A.Y., Ko, J.H., Lee, H.J., Kim, M.K., Wee, W.R., Khwarg, S.I., Oh, J.Y., 2015b. Mesenchymal stem/stromal cells protect the ocular surface by suppressing inflammation in an experimental dry eye. *Mol. Ther.* 23, 139–46.
- Lee, S.P., 1981. Hypersecretion of mucus glycoprotein by the gallbladder epithelium in experimental cholelithiasis. *J. Pathol.* 134, 199–207.
- Legssyer, R., Huaux, F., Lebacq, J., Delos, M., Marbaix, E., Lebecque, P., Lison, D., Scholte, B.J., Wallemacq, P., Leal, T., 2006. Azithromycin reduces spontaneous and induced inflammation in DeltaF508 cystic fibrosis mice. *Respir. Res.* 7, 134.
- Lemp, M.A., 1992. *The Dry Eye: A Comprehensive Guide*, Springer-V. ed.
- Li, C., Song, Y., Luan, S., Wan, P., Li, N., Tang, J., Han, Y., Xiong, C., Wang, Z., 2012. Research on the stability of a rabbit dry eye model induced by topical application of the preservative benzalkonium chloride. *PLoS One* 7, e33688.
- Li, H., Cho, S.N., Evans, C.M., Dickey, B.F., Jeong, J.W., DeMayo, F.J., 2008. Cre-mediated recombination in mouse Clara cells. *Genesis* 46, 300–7.
- Lin, J., Tsuboi, Y., Rimell, F., Liu, G., Toyama, K., Kawano, H., Paparella, M.M., Ho, S.B., 2003. Expression of mucins in mucoid otitis media. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 4, 384–93.
- Lin, J., Tsuprun, V., Kawano, H., Paparella, M.M., Zhang, Z., Anway, R., Ho, S.B., 2001. Characterization of mucins in human middle ear and Eustachian tube. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 280, L1157-67.
- Lin, L., Zhao, X., Yan, W., Guo, Y., Liang, S., 2014. Amelioration of Muc5b mucin hypersecretion is enhanced by IL-33 after 2-APB administration in a murine model of allergic rhinitis. *Biotech. Histochem.* 89, 273–86.
- Lin, M.H., Hsu, F.F., Miner, J.H., 2013. Requirement of fatty acid transport protein 4 for development, maturation, and function of sebaceous glands in a mouse model of ichthyosis prematurity syndrome. *J. Biol. Chem.* 288, 3964–76.

- Lin, Z., Liu, X., Zhou, T., Wang, Y., Bai, L., He, H., Liu, Z., 2011. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. *Mol. Vis.* 17, 257–64.
- Lindsay, R., Slaughter, T., Britton-Webb, J., Mog, S.R., Conran, R., Tadros, M., Earl, N., Fox, D., Roberts, J., Bolger, W.E., 2006. Development of a murine model of chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* 134, 724–32.
- Liu, B., Offner, G.D., Nunes, D.P., Oppenheim, F.G., Troxler, R.F., 1998. MUC4 is a major component of salivary mucin MG1 secreted by the human submandibular gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 757–61.

M

- Malet, F., Le Goff, M., Colin, J., Schweitzer, C., Delyfer, M.N., Korobelnik, J.F., Rougier, M.B., Radeau, T., Dartigues, J.F., Delcourt, C., 2014. Dry eye disease in French elderly subjects: the Alienor Study. *Acta Ophthalmol.* 92, 429–36.
- Mall, M.A., Harkema, J.R., Trojanek, J.B., Treis, D., Livraghi, A., Schubert, S., Zhou, Z., Kreda, S.M., Tilley, S.L., Hudson, E.J., O’Neal, W.K., Boucher, R.C., 2008. Development of chronic bronchitis and emphysema in beta-epithelial Na⁺ channel-overexpressing mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177, 730–42.
- Mall, M., Grubb, B.R., Harkema, J.R., O’Neal, W.K., Boucher, R.C., 2004. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat. Med.* 10, 487–93.
- Mantelli, F., Massaro-Giordano, M., Macchi, I., Lambiase, A., Bonini, S., 2013. The cellular mechanisms of dry eye: from pathogenesis to treatment. *J. Cell. Physiol.* 228, 2253–6.
- Marko, C.K., Menon, B.B., Chen, G., Whitsett, J.A., Clevers, H., Gipson, I.K., 2013. Spdef null mice lack conjunctival goblet cells and provide a model of dry eye. *Am. J. Pathol.* 183, 35–48.
- Marko, C.K., Tisdale, A.S., Spurr-Michaud, S., Evans, C., Gipson, I.K., 2014. The ocular surface phenotype of Muc5ac and Muc5b null mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 291–300.
- Mathew, A., MacLean, J.A., DeHaan, E., Tager, A.M., Green, F.H., Luster, A.D., 2001. Signal transducer and activator of transcription 6 controls chemokine production and T helper cell type 2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *J. Exp. Med.* 193, 1087–96.

- McDermott, S., Barry, S.C., Judge, E.P., Judge, E.E., Collins, S., de Jong, P.A., Tiddens, H.A.W.M., McKone, E.F., Gallagher, C.C., Dodd, J.D., 2009. Tracheomalacia in adults with cystic fibrosis: determination of prevalence and severity with dynamic cine CT. *Radiology* 252, 577–86.
- McGregor, J.A., French, J.I., Jones, W., Milligan, K., McKinney, P.J., Patterson, E., Parker, R., 1994. Bacterial vaginosis is associated with prematurity and vaginal fluid mucinase and sialidase: results of a controlled trial of topical clindamycin cream. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170, 1048–60.
- Meitinger, T., Meindl, A., Bork, P., Rost, B., Sander, C., Haasemann, M., Murken, J., 1993. Molecular modelling of the Norrie disease protein predicts a cystine knot growth factor tertiary structure. *Nat. Genet.* 5, 376–80.
- Menard, J.P., Bretelle, F., 2012. Bacterial vaginosis and preterm delivery. *Gynécologie, Obs. Fertil.* 40, 48–54.
- Miller, L.M., Foster, W.M., Dambach, D.M., Doebler, D., McKinnon, M., Killar, L., Longphre, M., 2002. A murine model of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation using intranasally administered smoke-conditioned medium. *Exp. Lung Res.* 28, 435–55.
- Mimoun, M., Coste, T.C., Lebacqz, J., Lebecque, P., Wallemacq, P., Leal, T., Armand, M., 2009. Increased tissue arachidonic acid and reduced linoleic acid in a mouse model of cystic fibrosis are reversed by supplemental glycerophospholipids enriched in docosahexaenoic acid. *J. Nutr.* 139, 2358–64.
- Miyashita, K., Azuma, N., Hida, T., 1992. Morphological and histochemical studies of goblet cells in developing human conjunctiva. *Jpn. J. Ophthalmol.* 36, 169–74.
- Miyazaki, M., Man, W.C., Ntambi, J.M., 2001. Targeted disruption of stearoyl-CoA desaturase1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid. *J. Nutr.* 131, 2260–8.
- Moore, B.B., Lawson, W.E., Oury, T.D., Sisson, T.H., Raghavendran, K., Hogaboam, C.M., 2013. Animal models of fibrotic lung disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49, 167–79.
- Mukhopadhyay, P., Chakraborty, S., Ponnusamy, M.P., Lakshmanan, I., Jain, M., Batra, S.K., 2011. Mucins in the pathogenesis of breast cancer: implications in diagnosis, prognosis and therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1815, 224–40.
- Munck, A., Languépin, J., Debray, D., Lamireau, T., Abely, M., Huet, F., Maudinas, R., Michaud, L., Mas, E., 2015. Management of pancreatic, gastrointestinal and liver complications in adult cystic fibrosis. *Rev. Mal. Respir.* 32, 566–85.

N

- Naito, A., Yoshida, H., Nishioka, E., Satoh, M., Azuma, S., Yamamoto, T., Nishikawa, S., Inoue, J., 2002. TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8766–71.
- Nakano, Y., Yang, I. V, Walts, A.D., Watson, A.M., Helling, B.A., Fletcher, A.A., Lara, A.R., Schwarz, M.I., Evans, C.M., Schwartz, D.A., 2016. MUC5B Promoter Variant rs35705950 Affects MUC5B Expression in the Distal Airways in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 464–6.
- Netter, F., 2015. Atlas d'anatomie humaine, Elsevier M. ed.
- Niwa, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., Simizu, S., 2016. Identification of DPY19L3 as the C-mannosyltransferase of R-spondin1 in human cells. *Mol. Biol. Cell* 27, 744–56.
- Noben-Trauth, K., Latoche, J.R., 2011. Ectopic mineralization in the middle ear and chronic otitis media with effusion caused by RPL38 deficiency in the Tail-short (Ts) mouse. *J. Biol. Chem.* 286, 3079–93.

O

- O'Donnell, R.A., Richter, A., Ward, J., Angco, G., Mehta, A., Rousseau, K., Swallow, D.M., Holgate, S.T., Djukanovic, R., Davies, D.E., Wilson, S.J., 2004. Expression of ErbB receptors and mucins in the airways of long term current smokers. *Thorax* 59, 1032–40.
- Offner, G.D., Nunes, D.P., Keates, A.C., Afdhal, N.H., Troxler, R.F., 1998. The amino-terminal sequence of MUC5B contains conserved multifunctional D domains: implications for tissue-specific mucin functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 350–5.
- Oliver, C., Watson, H., 2016. Omega-3 fatty acids for cystic fibrosis. *Cochrane database Syst. Rev.* 1, CD002201.
- Olmsted, S.S., Meyn, L.A., Rohan, L.C., Hillier, S.L., 2003. Glycosidase and proteinase activity of anaerobic gram-negative bacteria isolated from women with bacterial vaginosis. *Sex. Transm. Dis.* 30, 257–61.
- Onady, G.M., Stolfi, A., 2016. Insulin and oral agents for managing cystic fibrosis-related diabetes. *Cochrane database Syst. Rev.* 4, CD004730.

Ordoñez, C.L., Khashayar, R., Wong, H.H., Ferrando, R., Wu, R., Hyde, D.M., Hotchkiss, J.A., Zhang, Y., Novikov, A., Dolganov, G., Fahy, J. V, 2001. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 517–23.

P

Paccou, J., Zeboulon, N., Combescure, C., Gossec, L., Cortet, B., 2010. The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis. *Calcif. Tissue Int.* 86, 1–7.

Pardo, A., Selman, M., 2002. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front. Biosci.* 7, d1743-61.

Parry, S., Hanisch, F.G., Leir, S.H., Sutton-Smith, M., Morris, H.R., Dell, A., Harris, A., 2006. N-Glycosylation of the MUC1 mucin in epithelial cells and secretions. *Glycobiology* 16, 623–34.

Paulsen, F., Langer, G., Hoffmann, W., Berry, M., 2004. Human lacrimal gland mucins. *Cell Tissue Res.* 316, 167–77.

Peljto, A.L., Selman, M., Kim, D.S., Murphy, E., Tucker, L., Pardo, A., Lee, J.S., Ji, W., Schwarz, M.I., Yang, I. V, Schwartz, D.A., Fingerlin, T.E., 2015. The MUC5B promoter polymorphism is associated with idiopathic pulmonary fibrosis in a Mexican cohort but is rare among Asian ancestries. *Chest* 147, 460–4.

Peljto, A.L., Zhang, Y., Fingerlin, T.E., Ma, S.F., Garcia, J.G.N., Richards, T.J., Silveira, L.J., Lindell, K.O., Steele, M.P., Loyd, J.E., Gibson, K.F., Seibold, M.A., Brown, K.K., Talbert, J.L., Markin, C., Kossen, K., Seiwert, S.D., Murphy, E., Noth, I., Schwarz, M.I., Kaminski, N., Schwartz, D.A., 2013. Association between the MUC5B promoter polymorphism and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *JAMA* 309, 2232–9.

Pemberton, L., Taylor-Papadimitriou, J., Gendler, S.J., 1992. Antibodies to the cytoplasmic domain of the MUC1 mucin show conservation throughout mammals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 167–75.

Perez-Vilar, J., Eckhardt, A.E., DeLuca, A., Hill, R.L., 1998. Porcine submaxillary mucin forms disulfide-linked multimers through its amino-terminal D-domains. *J. Biol. Chem.* 273, 14442–9.

- Perez-Vilar, J., Hill, R.L., 1999. The structure and assembly of secreted mucins. *J. Biol. Chem.* 274, 31751–4.
- Perez-Vilar, J., Mabolle, R., 2007. Gel-forming mucins. Notions from in vitro studies. *Histol. Histopathol.* 22, 455–64.
- Perez-Vilar, J., Randell, S.H., Boucher, R.C., 2004. C-Mannosylation of MUC5AC and MUC5B Cys subdomains. *Glycobiology* 14, 325–37.
- Perrais, M., Pigny, P., Buisine, M.P., Porchet, N., Aubert, J.P., Van Seuning-Lempire, I., 2001. Aberrant expression of human mucin gene MUC5B in gastric carcinoma and cancer cells. Identification and regulation of a distal promoter. *J. Biol. Chem.* 276, 15386–96.
- Pierre, M., Husson, M.O., Le Berre, R., Desseyn, J.L., Galabert, C., Béghin, L., Beermann, C., Dagenais, A., Berthiaume, Y., Cardinaud, B., Barbry, P., Gottrand, F., Guery, B.P., 2007. Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve host response in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292, L1422-31.
- Pigny, P., Guyonnet-Duperat, V., Hill, A.S., Pratt, W.S., Galiegue-Zouitina, S., D'Hooge, M.C., Laine, A., Van-Seuning, I., Degand, P., Gum, J.R., Kim, Y.S., Swallow, D.M., Aubert, J.P., Porchet, N., 1996. Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics* 38, 340–52.
- Piludu, M., Rayment, S.A., Liu, B., Offner, G.D., Oppenheim, F.G., Troxler, R.F., Hand, A.R., 2003. Electron microscopic immunogold localization of salivary mucins MG1 and MG2 in human submandibular and sublingual glands. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 69–79.
- Pinho, S., Marcos, N.T., Ferreira, B., Carvalho, A.S., Oliveira, M.J., Santos-Silva, F., Harduin-Lepers, A., Reis, C.A., 2007. Biological significance of cancer-associated sialyl-Tn antigen: modulation of malignant phenotype in gastric carcinoma cells. *Cancer Lett.* 249, 157–70.
- Pinto-de-Sousa, J., Reis, C.A., David, L., Pimenta, A., Cardoso-de-Oliveira, M., 2004. MUC5B expression in gastric carcinoma: relationship with clinico-pathological parameters and with expression of mucins MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6. *Virchows Arch.* 444, 224–30.

- Plikus, M., Wang, W.P., Liu, J., Wang, X., Jiang, T.X., Chuong, C.M., 2004. Morphoregulation of ectodermal organs: integument pathology and phenotypic variations in K14-Noggin engineered mice through modulation of bone morphogenic protein pathway. *Am. J. Pathol.* 164, 1099–114.
- Pramanik, R., Osailan, S.M., Challacombe, S.J., Urquhart, D., Proctor, G.B., 2010. Protein and mucin retention on oral mucosal surfaces in dry mouth patients. *Eur. J. Oral Sci.* 118, 245–53.
- Preciado, D., Goyal, S., Rahimi, M., Watson, A.M., Brown, K.J., Hathout, Y., Rose, M.C., 2010. MUC5B is the predominant mucin glycoprotein in chronic otitis media fluid. *Pediatr. Res.* 68, 231–6.
- Preciado, D., Lin, J., Wuertz, B., Rose, M., 2008. Cigarette smoke activates NF kappa B and induces Muc5b expression in mouse middle ear cells. *Laryngoscope* 118, 464–71.

R

- Raclawska, D.S., Ttofali, F., Fletcher, A.A., Harper, D.N., Bochner, B.S., Janssen, W.J., Evans, C.M., 2016. Mucins and Their Sugars. Critical Mediators of Hyperreactivity and Inflammation. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 13 Suppl 1, S98-9.
- Ratjen, F., Döring, G., 2003. Cystic fibrosis. *Lancet* 361, 681–689.
- Reid, C.J., Gould, S., Harris, A., 1997. Developmental expression of mucin genes in the human respiratory tract. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17, 592–8.
- Renzoni, E., Srihari, V., Sestini, P., 2014. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: review of recent findings. *F1000Prime Rep.* 6, 69.
- Ridder, W., Karsolia, A., 2015. New drugs for the treatment of dry eye disease. *Clin. Optom.* Volume 7, 91.
- Ridley, C., Kouvatso, N., Raynal, B.D., Howard, M., Collins, R.F., Desseyn, J.L., Jowitt, T.A., Baldock, C., Davis, C.W., Hardingham, T.E., Thornton, D.J., 2014. Assembly of the respiratory mucin MUC5B: a new model for a gel-forming mucin. *J. Biol. Chem.* 289, 16409–20.
- Rocha, E.M., Cotrim, A.P., Zheng, C., Riveros, P.P., Baum, B.J., Chiorini, J.A., 2013. Recovery of radiation-induced dry eye and corneal damage by pretreatment with adenoviral vector-mediated transfer of erythropoietin to the salivary glands in mice. *Hum. Gene Ther.* 24, 417–23.

- Rose, M.C., Voynow, J.A., 2006. Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 86, 245–78.
- Rousseau, K., Kirkham, S., Johnson, L., Fitzpatrick, B., Howard, M., Adams, E.J., Rogers, D.F., Knight, D., Clegg, P., Thornton, D.J., 2008. Proteomic analysis of polymeric salivary mucins: no evidence for MUC19 in human saliva. *Biochem. J.* 413, 545–52.
- Rowe, S.M., Miller, S., Sorscher, E.J., 2005. Cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 352, 1992–2001.
- Roy, M.G., Livraghi-Butrico, A., Fletcher, A.A., McElwee, M.M., Evans, S.E., Boerner, R.M., Alexander, S.N., Bellinghausen, L.K., Song, A.S., Petrova, Y.M., Tuvim, M.J., Adachi, R., Romo, I., Bordt, A.S., Bowden, M.G., Sisson, J.H., Woodruff, P.G., Thornton, D.J., Rousseau, K., De la Garza, M.M., Moghaddam, S.J., Karmouty-Quintana, H., Blackburn, M.R., Drouin, S.M., Davis, C.W., Terrell, K.A., Grubb, B.R., O’Neal, W.K., Flores, S.C., Cota-Gomez, A., Lozupone, C.A., Donnelly, J.M., Watson, A.M., Hennessy, C.E., Keith, R.C., Yang, I. V, Barthel, L., Henson, P.M., Janssen, W.J., Schwartz, D.A., Boucher, R.C., Dickey, B.F., Evans, C.M., 2014. Muc5b is required for airway defence. *Nature* 505, 412–6.
- Roy, M.G., Rahmani, M., Hernandez, J.R., Alexander, S.N., Ehre, C., Ho, S.B., Evans, C.M., 2011. Mucin production during prenatal and postnatal murine lung development. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 755–60.
- Rubin, B.K., 2007. Mucus structure and properties in cystic fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* 8, 4–7.
- Ryan, A.F., Ebmeyer, J., Furukawa, M., Pak, K., Melhus, A., Wasserman, S.I., Chung, W.H., 2006. Mouse models of induced otitis media. *Brain Res.* 1091, 3–8.
- Rye, M.S., Bhutta, M.F., Cheeseman, M.T., Burgner, D., Blackwell, J.M., Brown, S.D.M., Jamieson, S.E., 2011. Unraveling the genetics of otitis media: from mouse to human and back again. *Mamm. Genome* 22, 66–82.

S

- Saari, H., Halinen, S., Ganlöv, K., Sorsa, T., Konttinen, Y.T., 1997. Salivary mucous glycoprotein MG1 in Sjögren’s syndrome. *Clin. Chim. Acta.* 259, 83–96.
- Sabirov, A., Metzger, D.W., 2008. Mouse models for the study of mucosal vaccination against otitis media. *Vaccine* 26, 1501–24.

- Sadler, J.E., 2009. von Willebrand factor assembly and secretion. *J. Thromb. Haemost.* 7 Suppl 1, 24–7.
- Sasaki, M., Nakanuma, Y., Kim, Y.S., 1998. Expression of apomucins in the intrahepatic biliary tree in hepatolithiasis differs from that in normal liver and extrahepatic biliary obstruction. *Hepatology* 27, 54–61.
- Scholand, M.B., Wolff, R., Crossno, P.F., Sundar, K., Winegar, M., Whipple, S., Carey, P., Sunchild, N., Coon, H., 2014. Severity of cough in idiopathic pulmonary fibrosis is associated with MUC5 B genotype. *Cough* 10, 3.
- Scotton, C.J., Chambers, R.C., 2010. Bleomycin revisited: towards a more representative model of IPF? *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 299, L439–41.
- Seibold, M.A., Smith, R.W., Urbanek, C., Groshong, S.D., Cosgrove, G.P., Brown, K.K., Schwarz, M.I., Schwartz, D.A., Reynolds, S.D., 2013. The idiopathic pulmonary fibrosis honeycomb cyst contains a mucociliary pseudostratified epithelium. *PLoS One* 8, e58658.
- Seibold, M.A., Wise, A.L., Speer, M.C., Steele, M.P., Brown, K.K., Loyd, J.E., Fingerlin, T.E., Zhang, W., Gudmundsson, G., Groshong, S.D., Evans, C.M., Garantziotis, S., Adler, K.B., Dickey, B.F., du Bois, R.M., Yang, I. V, Herron, A., Kervitsky, D., Talbert, J.L., Markin, C., Park, J., Crews, A.L., Slifer, S.H., Auerbach, S., Roy, M.G., Lin, J., Hennessy, C.E., Schwarz, M.I., Schwartz, D.A., 2011. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 364, 1503–12.
- Selman, M., Pardo, A., 2013. Update in diffuse parenchymal lung disease 2012. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 920–5.
- Seys, L.J.M., Verhamme, F.M., Dupont, L.L., Desauter, E., Duerr, J., Seyhan Agircan, A., Conickx, G., Joos, G.F., Brusselle, G.G., Mall, M.A., Bracke, K.R., 2015. Airway Surface Dehydration Aggravates Cigarette Smoke-Induced Hallmarks of COPD in Mice. *PLoS One* 10, e0129897.
- Sharma, R., Lakhani, R., Rimmer, J., Hopkins, C., 2014. Surgical interventions for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Cochrane database Syst. Rev.* CD006990.
- Sheehan, J.K., Howard, M., Richardson, P.S., Longwill, T., Thornton, D., 1999. Physical characterization of a low-charge glycoform of the MUC5B mucin comprising the gel-phase of an asthmatic respiratory mucous plug. *Biochem. J Pt 2*, 507–13.

- Sheehan, J.K., Kirkham, S., Howard, M., Woodman, P., Kutay, S., Brazeau, C., Buckley, J., Thornton, D.J., 2004. Identification of molecular intermediates in the assembly pathway of the MUC5AC mucin. *J. Biol. Chem.* 279, 15698–705.
- Sheehan, J.K., Oates, K., Carlstedt, I., 1986. Electron microscopy of cervical, gastric and bronchial mucus glycoproteins. *Biochem. J.* 239, 147–53.
- Sheehan, J.K., Richardson, P.S., Fung, D.C., Howard, M., Thornton, D.J., 1995. Analysis of respiratory mucus glycoproteins in asthma: a detailed study from a patient who died in status asthmaticus. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13, 748–56.
- Shirinde, J., Wichmann, J., Voyi, K., 2015. Allergic rhinitis, rhinoconjunctivitis and hayfever symptoms among children are associated with frequency of truck traffic near residences: a cross sectional study. *Environ. Health* 14, 84.
- Shoda, J., Kano, M., Asano, T., Irimura, T., Ueda, T., Iwasaki, R., Furukawa, M., Kamiya, J., Nimura, Y., Todoroki, T., Matsuzaki, Y., Tanaka, N., 1999. Secretory low-molecular-weight phospholipases A2 and their specific receptor in bile ducts of patients with intrahepatic calculi: factors of chronic proliferative cholangitis. *Hepatology* 29, 1026–36.
- Situ, D., Wang, J., Ma, Y., Zhu, Z., Hu, Y., Long, H., Rong, T., 2011. Expression and prognostic relevance of MUC1 in stage IB non-small cell lung cancer. *Med. Oncol.* 28 Suppl 1, S596-604.
- Slomiany, B.L., Slomiany, A., 2006. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced cytosolic phospholipase A2 activation interferes with salivary mucin synthesis via platelet activating factor generation. *Inflammopharmacology* 14, 144–9.
- Smirnova, M.G., Birchall, J.P., Pearson, J.P., 2002. In vitro study of IL-8 and goblet cells: possible role of IL-8 in the aetiology of otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol.* 122, 146–52.
- Song, X.J., Li, D.Q., Farley, W., Luo, L.H., Heuckeroth, R.O., Milbrandt, J., Pflugfelder, S.C., 2003. Neurturin-deficient mice develop dry eye and keratoconjunctivitis sicca. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 4223–9.
- Sóñora, C., Mazal, D., Berois, N., Buisine, M.P., Ubillos, L., Varangot, M., Barrios, E., Carzoglio, J., Aubert, J.P., Osinaga, E., 2006. Immunohistochemical analysis of MUC5B apomucin expression in breast cancer and non-malignant breast tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 289–99.

- Stevenson, W., Chen, Y., Lee, S.M., Lee, H.S., Hua, J., Dohlman, T., Shiang, T., Dana, R., 2014. Extraorbital lacrimal gland excision: a reproducible model of severe aqueous tear-deficient dry eye disease. *Cornea* 33, 1336–41.
- Stock, C.J., Sato, H., Fonseca, C., Banya, W.A.S., Molyneaux, P.L., Adamali, H., Russell, A.M., Denton, C.P., Abraham, D.J., Hansell, D.M., Nicholson, A.G., Maher, T.M., Wells, A.U., Lindahl, G.E., Renzoni, E.A., 2013. Mucin 5B promoter polymorphism is associated with idiopathic pulmonary fibrosis but not with development of lung fibrosis in systemic sclerosis or sarcoidosis. *Thorax* 68, 436–41.
- Strous, G.J., Dekker, J., 1992. Mucin-type glycoproteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 27, 57–92.
- Sun, H., Chen, J., Qian, W., Kang, J., Wang, J., Jiang, L., Qiao, L., Chen, W., Zhang, J., 2016. Integrated long non-coding RNA analyses identify novel regulators of epithelial-mesenchymal transition in the mouse model of pulmonary fibrosis. *J. Cell. Mol. Med.* 1234–46.
- Surveyor, G.A., Gendler, S.J., Pemberton, L., Das, S.K., Chakraborty, I., Julian, J., Pimental, R.A., Wegner, C.C., Dey, S.K., Carson, D.D., 1995. Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology* 136, 3639–47.
- Suwan-Apichon, O., Rizen, M., Rangsin, R., Herretes, S., Reyes, J.M.G., Lekhanont, K., Chuck, R.S., 2006. Botulinum toxin B-induced mouse model of keratoconjunctivitis sicca. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 133–9.
- Swamynathan, S.K., Katz, J.P., Kaestner, K.H., Ashery-Padan, R., Crawford, M.A., Piatigorsky, J., 2007. Conditional deletion of the mouse *Klf4* gene results in corneal epithelial fragility, stromal edema, and loss of conjunctival goblet cells. *Mol. Cell. Biol.* 27, 182–94.

T

- Tabak, L.A., Levine, M.J., Mandel, I.D., Ellison, S.A., 1982. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J. Oral Pathol.* 11, 1–17.
- Tailford, L.E., Crost, E.H., Kavanaugh, D., Juge, N., 2015. Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front. Genet.* 6, 81.

- Takahashi, M., Ishimaru, N., Yanagi, K., Haneji, N., Saito, I., Hayashi, Y., 1997. High incidence of autoimmune dacryoadenitis in male non-obese diabetic (NOD) mice depending on sex steroid. *Clin. Exp. Immunol.* 109, 555–61.
- Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J., Miles, D.W., Dalziel, M., 1999. MUC1 and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1455, 301–13.
- Tekkanat, K.K., Maassab, H.F., Cho, D.S., Lai, J.J., John, A., Berlin, A., Kaplan, M.H., Lukacs, N.W., 2001. IL-13-induced airway hyperreactivity during respiratory syncytial virus infection is STAT6 dependent. *J. Immunol.* 166, 3542–8.
- Télé-Québec, 2016. L'ABC de l'oreille [En ligne]. URL medecinsansrendezvous.telequebec.tv/articles/46-labc-de-loreille
- Ten Hagen, K.G., Fritz, T.A., Tabak, L.A., 2003. All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* 13, 1R–16R.
- Tetaert, D., Pierre, M., Demeyer, D., Husson, M.O., Béghin, L., Galabert, C., Gottrand, F., Beermann, C., Guery, B., Desseyn, J.L., 2007. Dietary n-3 fatty acids have suppressive effects on mucin upregulation in mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Respir. Res.* 8, 39.
- Thai, P., Loukoianov, A., Wachi, S., Wu, R., 2008. Regulation of airway mucin gene expression. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 405–29.
- Thornton, D.J., Howard, M., Khan, N., Sheehan, J.K., 1997. Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory mucus. Evidence for a cysteine-rich sequence repeated within the molecule. *J. Biol. Chem.* 272, 9561–6.
- Thornton, D.J., Rousseau, K., McGuckin, M.A., 2008. Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 459–86.
- Tian, C., Yu, H., Yang, B., Han, F., Zheng, Y., Bartels, C.F., Schelling, D., Arnold, J.E., Scacheri, P.C., Zheng, Q.Y., 2012. Otitis media in a new mouse model for CHARGE syndrome with a deletion in the *Chd7* gene. *PLoS One* 7, e34944.
- Tiesset, H., Bernard, H., Bartke, N., Beermann, C., Flachaire, E., Desseyn, J.L., Gottrand, F., Husson, M.O., 2011. (n-3) long-chain PUFA differentially affect resistance to *Pseudomonas aeruginosa* infection of male and female *cftr*^{-/-} mice. *J.Nutr.*

- Tiesset, H., Pierre, M., Desseyn, J.L., Guery, B., Beermann, C., Galabert, C., Gottrand, F., Husson, M.O., 2009. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids affect the kinetics of pro- and antiinflammatory responses in mice with *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J Nutr* 139, 82–9.
- Treuting, P.M., Dintzis, S.M., 2012. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*, Academic P. ed, *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*.
- Trotman, B.W., Bernstein, S.E., Bove, K.E., Wirt, G.D., 1980. Studies on the pathogenesis of pigment gallstones in hemolytic anemia: description and characteristics of a mouse model. *J. Clin. Invest.* 65, 1301–8.
- Troxler, R.F., Iontcheva, I., Oppenheim, F.G., Nunes, D.P., Offner, G.D., 1997. Molecular characterization of a major high molecular weight mucin from human sublingual gland. *Glycobiology* 7, 965–73.
- Tsau, C., Ito, M., Gromova, A., Hoffman, M.P., Meech, R., Makarenkova, H.P., 2011. Barx2 and Fgf10 regulate ocular glands branching morphogenesis by controlling extracellular matrix remodeling. *Development* 138, 3307–17.
- Turck, D., Braegger, C.P., Colombo, C., Declercq, D., Morton, A., Pancheva, R., Robberecht, E., Stern, M., Strandvik, B., Wolfe, S., Schneider, S.M., Wilschanski, M., 2016. ESPEN-ESPGHAN-ECFS guidelines on nutrition care for infants, children, and adults with cystic fibrosis. *Clin. Nutr.* 35, 557–77.
- Turner, B.S., Bhaskar, K.R., Hadzopoulou-Cladaras, M., LaMont, J.T., 1999. Cysteine-rich regions of pig gastric mucin contain von willebrand factor and cystine knot domains at the carboxyl terminal(1). *Biochim. Biophys. Acta* 1447, 77–92.
- Turner, J.H., May, L., Reed, R.R., Lane, A.P., 2010. Reversible loss of neuronal marker protein expression in a transgenic mouse model for sinusitis-associated olfactory dysfunction. *Am. J. Rhinol. Allergy* 24, 192–6.

U

- Uchino, Y., Kawakita, T., Ishii, T., Ishii, N., Tsubota, K., 2012. A new mouse model of dry eye disease: oxidative stress affects functional decline in the lacrimal gland. *Cornea* 31 Suppl 1, S63-7.

V

- Val, S., Kwon, H.J., Rose, M.C., Preciado, D., 2015a. Middle Ear Response of Muc5ac and Muc5b Mucins to Nontypeable Haemophilus influenzae. *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.* 141, 997–1005.
- Val, S., Mubeen, H., Tomney, A., Chen, S., Preciado, D., 2015b. Impact of Staphylococcus epidermidis lysates on middle ear epithelial proinflammatory and mucogenic response. *J. Investig. Med.* 63, 258–66.
- Valque, H., 2011. MUC5B, mucine gélifiante clé. Embryogénèse, mucoviscidose et cancer mammaire. Université Lille 2.
- Valque, H., Gouyer, V., Gottrand, F., Desseyn, J.L., 2012. MUC5B leads to aggressive behavior of breast cancer MCF7 cells. *PLoS One* 7, e46699.
- Valque, H., Gouyer, V., Husson, M.O., Gottrand, F., Desseyn, J.L., 2011. Abnormal expression of Muc5b in Cfr-null mice and in mammary tumors of MMTV-ras mice. *Histochem. Cell Biol.* 136, 699–708.
- Van der Vis, J.J., Snetselaar, R., Kazemier, K.M., Ten Klooster, L., Grutters, J.C., van Moorsel, C.H.M., 2016. Effect of Muc5b promoter polymorphism on disease predisposition and survival in idiopathic interstitial pneumonias. *Respirology* 21, 712–7.
- Van Klinken, B.J., Dekker, J., Van Gool, S.A., Van Marle, J., Büller, H.A., Einerhand, A.W., 1998. MUC5B is the prominent mucin in human gallbladder and is also expressed in a subset of colonic goblet cells. *Am. J. Physiol.* 274, G871-8.
- Van Seuningen, I., Perrais, M., Pigny, P., Porchet, N., Aubert, J.P., 2000. Sequence of the 5'-flanking region and promoter activity of the human mucin gene MUC5B in different phenotypes of colon cancer cells. *Biochem. J.* 348 Pt 3, 675–86.
- Van Seuningen, I., Pigny, P., Perrais, M., Porchet, N., Aubert, J.P., 2001. Transcriptional regulation of the 11p15 mucin genes. Towards new biological tools in human therapy, in inflammatory diseases and cancer? *Front. Biosci.* 6, D1216-34.
- Vandehaute, B., Buisine, M.P., Debailleul, V., Clément, B., Moniaux, N., Dieu, M.C., Degand, P., Porchet, N., Aubert, J.P., 1997. Mucin gene expression in biliary epithelial cells. *J. Hepatol.* 27, 1057–66.
- Veerman, E.C.I., van den Keijbus, P.A.M., Nazmi, K., Vos, W., van der Wal, J.E., Bloemena, E., Bolscher, J.G.M., Amerongen, A.V.N., 2003. Distinct localization of MUC5B glycoforms in the human salivary glands. *Glycobiology* 13, 363–6.

- Verhaeghe, C., Delbecq, K., de Leval, L., Oury, C., Bours, V., 2007. Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus. *J. Cyst. Fibros.* 6, 304–8.
- Vinall, L.E., Hill, A.S., Pigny, P., Pratt, W.S., Toribara, N., Gum, J.R., Kim, Y.S., Porchet, N., Aubert, J.P., Swallow, D.M., 1998. Variable number tandem repeat polymorphism of the mucin genes located in the complex on 11p15.5. *Hum. Genet.* 102, 357–66.

W

- Walsh, M.D., Clendenning, M., Williamson, E., Pearson, S.A., Walters, R.J., Nagler, B., Packenas, D., Win, A.K., Hopper, J.L., Jenkins, M.A., Haydon, A.M., Rosty, C., English, D.R., Giles, G.G., McGuckin, M.A., Young, J.P., Buchanan, D.D., 2013. Expression of MUC2, MUC5AC, MUC5B, and MUC6 mucins in colorectal cancers and their association with the CpG island methylator phenotype. *Mod. Pathol.* 26, 1642–56.
- Walters, D.M., Kleeberger, S.R., 2008. Mouse models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Curr. Protoc. Pharmacol.* Chapter 5, Unit 5.46.
- Wang, C., Zhuang, Y., Guo, W., Cao, L., Zhang, H., Xu, L., Fan, Y., Zhang, D., Wang, Y., 2014. Mucin 5B promoter polymorphism is associated with susceptibility to interstitial lung diseases in Chinese males. *PLoS One* 9, e104919.
- Wang, D.Q.H., Cohen, D.E., Carey, M.C., 2009. Biliary lipids and cholesterol gallstone disease. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S406-11.
- Wang, H., Lu, X., Cao, P.-P., Chu, Y., Long, X.-B., Zhang, X.-H., You, X.-J., Cui, Y.-H., Liu, Z., 2008. Histological and immunological observations of bacterial and allergic chronic rhinosinusitis in the mouse. *Am. J. Rhinol.* 22, 343–8.
- Wang, H.H., Afdhal, N.H., Gendler, S.J., Wang, D.Q.H., 2004. Targeted disruption of the murine mucin gene 1 decreases susceptibility to cholesterol gallstone formation. *J. Lipid Res.* 45, 438–47.
- Wang, Y.C., Li, S., Chen, X., Ma, B., He, H., Liu, T., Yu, J., Zhang, L., Chen, Y., Liu, Z., Li, W., 2016. Meibomian Gland Absence Related Dry Eye in Ectodysplasin A Mutant Mice. *Am. J. Pathol.* 186, 32–42.
- Wilke, M., Buijs-Offerman, R.M., Aarbiou, J., Colledge, W.H., Sheppard, D.N., Touqui, L., Bot, A., Jorna, H., De Jonge, H.R., Scholte, B.J., 2011. Mouse models of cystic fibrosis: Phenotypic analysis and research applications. *J. Cyst. Fibros.* 10, S152–S171.

- Winkelmann, A., Noack, T., 2010. The Clara cell: a “Third Reich eponym”? *Eur. Respir. J.* 36, 722–7.
- Won, S., Kho, H., Kim, Y., Chung, S., Lee, S., 2001. Analysis of residual saliva and minor salivary gland secretions. *Arch. Oral Biol.* 46, 619–24.
- Wong, A.P., Keating, A., Waddell, T.K., 2009. Airway regeneration: the role of the Clara cell secretory protein and the cells that express it. *Cytherapy* 11, 676–87.
- Wood, R.E., Boat, T.F., Doershuk, C.F., 1976. Cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 113, 833–78.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K.C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., Botzenhart, K., Yankaskas, J.R., Randell, S., Boucher, R.C., Döring, G., 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest.* 109, 317–25.

X

- Xiong, C., Chen, D., Liu, J., Liu, B., Li, N., Zhou, Y., Liang, X., Ma, P., Ye, C., Ge, J., Wang, Z., 2008. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 1850–6.
- Xu, H., Zhao, Y., Li, J., Wang, M., Lian, F., Gao, M., Ghishan, F.K., 2015. Loss of NHE8 expression impairs ocular surface function in mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 308, C79-87.

Y

- Yagyu, H., Kitamine, T., Osuga, J., Tozawa, R., Chen, Z., Kaji, Y., Oka, T., Perrey, S., Tamura, Y., Ohashi, K., Okazaki, H., Yahagi, N., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Harada, K., Shimano, H., Yamashita, H., Gotoda, T., Yamada, N., Ishibashi, S., 2000. Absence of ACAT-1 attenuates atherosclerosis but causes dry eye and cutaneous xanthomatosis in mice with congenital hyperlipidemia. *J. Biol. Chem.* 275, 21324–30.
- Yanagihara, K., Tomono, K., Sawai, T., Hirakata, Y., Kadota, J., Koga, H., Tashiro, T., Kohno, S., 1997. Effect of clarithromycin on lymphocytes in chronic respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155, 337–42.

- Yu, D.F., Chen, Y., Han, J.M., Zhang, H., Chen, X.P., Zou, W.J., Liang, L.Y., Xu, C.C., Liu, Z.G., 2008. MUC19 expression in human ocular surface and lacrimal gland and its alteration in Sjögren syndrome patients. *Exp. Eye Res.* 86, 403–11.
- Yudin, M.H., Money, D.M., Infectious Diseases Committee, 2008. Screening and management of bacterial vaginosis in pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Canada JOGC* 30, 702–16.

Z

- Zanetta, J.P., Pons, A., Richet, C., Huet, G., Timmerman, P., Leroy, Y., Bohin, A., Bohin, J.P., Trinel, P.A., Poulain, D., Hofsteenge, J., 2004. Quantitative gas chromatography/mass spectrometry determination of C-mannosylation of tryptophan residues in glycoproteins. *Anal. Biochem.* 329, 199–206.
- Zhang, Y., Yu, H., Xu, M., Han, F., Tian, C., Kim, S., Fredman, E., Zhang, J., Benedict-Alderfer, C., Zheng, Q.Y., 2012. Pathological features in the *LmnaDhe/+* mutant mouse provide a novel model of human otitis media and laminopathies. *Am. J. Pathol.* 181, 761–74.
- Zhu, L., Lee, P., Yu, D., Tao, S., Chen, Y., 2011. Cloning and characterization of human MUC19 gene. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45, 348–58.
- Zhu, Y., Ehre, C., Abdullah, L.H., Sheehan, J.K., Roy, M., Evans, C.M., Dickey, B.F., Davis, C.W., 2008. *Munc13-2^{-/-}* baseline secretion defect reveals source of oligomeric mucins in mouse airways. *J. Physiol.* 586, 1977–92.
- Zhu, Z., Homer, R.J., Wang, Z., Chen, Q., Geba, G.P., Wang, J., Zhang, Y., Elias, J.A., 1999. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J. Clin. Invest.* 103, 779–88.
- Zinzen, K., Hand, A., Yankova, M., Ball, W., Mirels, L., 2004. Molecular cloning and characterization of the neonatal rat and mouse submandibular gland protein SMGC. *Gene* 334, 23–33.
- Zoukhri, D., Macari, E., Kublin, C.L., 2007. A single injection of interleukin-1 induces reversible aqueous-tear deficiency, lacrimal gland inflammation, and acinar and ductal cell proliferation. *Exp. Eye Res.* 84, 894–904.
- Zuhdi Alimam, M., Piazza, F.M., Selby, D.M., Letwin, N., Huang, L., Rose, M.C., 2000. Muc-5/5ac mucin messenger RNA and protein expression is a marker of goblet cell metaplasia in murine airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22, 253–60.

ANNEXE 1

Preclinical mouse model to monitor live conjunctival goblet cell density under pharmacological treatments

Céline Portal, Valérie Gouyer, Frédéric Gottrand and Jean-Luc Desseyn*

LIRIC UMR 995, Université Lille, Inserm, CHU de Lille, F-59000, Lille, France

***Corresponding author:**

Dr Jean-Luc Desseyn

LIRIC UMR 995, Université Lille, Inserm, CHU de Lille, F-59000, Lille, France

Email : jean-luc.desseyn@inserm.fr

tel : +33 320 627 789

ANNEXE 2

***In vivo* imaging of the Muc5b gel-forming mucin**

Céline Portal, Valérie Gouyer, Mylène Magnien, Ségolène Plet, Frédéric Gottrand
and Jean-Luc Desseyn

LIRIC UMR 995, Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, F-59000 Lille, France

Corresponding author:

Jean-Luc Desseyn, PhD

LIRIC UMR 995, Faculté de Médecine, Université Lille 2,
Bâtiment Huriez, Pôle Recherche, 5^{ème} étage,
1 place Verdun, F-59045 Lille, France.

Tel: (+33) 320 627 789

Email: jean-luc.desseyn@inserm.fr

Running head: Reporter Muc5b-GFP mouse model

Conflict of interest: no conflicting relationship exists for any author

Keywords: goblet cell, gel-forming mucin Muc5b, GFP transgenic mouse, probe-based confocal laser endomicroscopy

ANNEXE 3

Long-term dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids show benefits to the lungs of Cftr Δ F508 mice

Céline Portal¹, Valérie Gouyer¹, Renaud Léonard², Marie-Odile Husson¹, Frédéric Gottrand¹ & Jean-Luc Desseyn¹

¹LIRIC – UMR 995, Inserm; University of Lille; CHU Lille, F-59000 Lille, France

²UGSF – UMR 8576, CNRS; University of Lille, F-59650, Villeneuve d'Ascq, France

Corresponding author: J-L. Desseyn, LIRIC – UMR 995, Inserm, Univ. Lille, CHU Lille, F-59000 Lille, France.

Email: jean-luc.desseyn@inserm.fr

Keywords: cystic fibrosis; mouse Δ F508; polyunsaturated fatty acids; diet