



UNIVERSITÉ DE LILLE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ DE LILLE

THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Lille
Spécialité Biochimie et Biologie moléculaire

**Le porc européen CF :
Un modèle unique pour décrypter les altérations de
glycosylation des mucines pulmonaires**

Thèse soutenue le 12 décembre 2018 par :

Béline Ringot-Destrez

Composition du jury :

Président	Pr Jean-Marie LACROIX, Université de Lille
Rapporteurs	Dr Shaynoor DRAMSI, Institut Pasteur Paris Dr Nathalie JUGE, Institute of Food Research Norwich
Examineurs	Dr Caroline CIENIEWSKI-BERNARD, Université de Lille Dr Mathieu COUREUIL, Faculté de Médecine Paris Descartes
Directrice de thèse	Dr Catherine ROBBE-MASSELOT, Université de Lille

RAPPORT CONFIDENTIEL



UNIVERSITÉ DE LILLE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ DE LILLE

THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Lille
Spécialité Biochimie et Biologie moléculaire

**Le porc européen CF :
Un modèle unique pour décrypter les altérations de
glycosylation des mucines pulmonaires**

Thèse soutenue le 12 décembre 2018 par :

Béline Ringot-Destrez

Composition du jury :

Président	Pr Jean-Marie LACROIX, Université de Lille
Rapporteurs	Dr Shaynoor DRAMSI, Institut Pasteur Paris Dr Nathalie JUGE, Institute of Food Research Norwich
Examineurs	Dr Caroline CIENIEWSKI-BERNARD, Université de Lille Dr Mathieu COUREUIL, Faculté de Médecine Paris Descartes
Directrice de thèse	Dr Catherine ROBBE-MASSELOT, Université de Lille

RAPPORT CONFIDENTIEL

Je remercie le Professeur **Christophe D'Hulst**, directeur de l'UGSF, de m'avoir accueillie au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de l'Université de Lille-UMR 8576 du CNRS,

Je remercie ma directrice de thèse le Docteur **Catherine Robbe-Masselot**. Catherine, j'aurais pu écrire une thèse de remerciements à ton égard, ça m'aurait été bien plus facile. Un simple merci ne suffirait pas pour te montrer toute la gratitude que j'ai pour toi. J'ai trouvé ça touchant lorsque dans ton HDR tu comparais Calliope à ta deuxième maman... aujourd'hui je ne te dirai pas la même chose, non pas parce que je ne le veux pas mais parce que tu risquerais de mal le prendre ☺ alors je me contenterai de dire que j'ai trouvé ma grande sœur de cœur. Qui aurait cru un jour que je ferais une thèse ? De par ton aide, ta patience, la confiance que tu m'as accordée j'ai accepté. Cette thèse je ne l'aurais acceptée qu'avec toi et je pense te l'avoir dit assez souvent. Tu as toujours su me remotiver et me montrer que j'en étais capable. Mon aventure à tes côtés a commencé en 2008 et ce fût une magnifique rencontre scientifique! Moi qui suis fan de foie gras et de chips tu as réussi à m'emmener dans ton univers sucré et même à me le faire apprécier. Tu es une directrice de thèse et une chercheuse exceptionnelle tant d'un point de vue humain que scientifique. Ta transparence dans les résultats m'a confortée dans l'idée qu'il restait encore des personnes honnêtes qui aiment leur métier et qui n'ont pas oublié la finalité de notre travail : améliorer la qualité de vie des patients et peut-être même sauver des vies. J'espère vraiment qu'une équipe « mucines » verra le jour et que tu en seras la directrice car ces protéines sont importantes dans de nombreuses pathologies et elles ne nous ont pas encore dévoilé tous leurs secrets. J'espère aussi pouvoir t'aider encore longtemps dans tes recherches et même si je change d'horizon je sais que tu resteras mon amie. Dans tous les cas il est certain que je resterai disponible pour les repas de Noël et d'anniversaire ;) . J'espère que tu n'as pas regretté une seconde de m'avoir proposé cette thèse (même ces dernières semaines...) et ne pas t'avoir déçu. Encore MERCI pour tout!

Je remercie également le Docteur **Renaud Léonard**. Tes connaissances scientifiques m'ont permis d'avancer dans mes travaux et tes connaissances générales m'ont toujours impressionnée. J'ai apprécié la découverte de l'Autriche à travers tes récits, de ses spécialités culinaires que j'irai certainement (re)déguster sur place. Merci également pour ton aide dans mes enseignements me permettant d'avoir moins d'appréhension. J'espère ne pas t'avoir trop choqué avec mes expressions Calaisiennes un peu crues parfois.

Merci au Docteur **Caroline Cieniewski-Bernard** pour sa gentillesse et ses nombreux conseils et pour les gels 2D qui je dois bien l'avouer m'ont fait un peu peur la première fois,

Merci au Docteur **Mathieu Coureuil** pour sa gentillesse et ses nombreux conseils,

Je tenais également à remercier **Anaïs** pour m'avoir confié son sujet de M2, **Kévin** pour avoir manipulé à ma place les produits à risque pendant ma grossesse et **Karine** pour m'avoir enseigné de nombreuses techniques et à **Zéa** pour sa bonne humeur et son efficacité,

Un grand merci à **Adriana Mihalache**, **Pierre Gosset** et **Baptiste** pour leur aide en histologie ainsi que pour l'utilisation des machines,

Merci au Docteur **Bernadette Coddeville**, pour sa gentillesse, sa disponibilité et son partage de connaissances,

Merci à **Jean-Pascal Gimeno** et son équipe pour m'avoir aidé dans l'utilisation du spectromètre de masse,

Je tenais à remercier la plateforme de microscopie PICST et notamment **Elodie** et **Christian** qui ont été très patients pour m'enseigner les rudiments de la microscopie,

Merci au Docteur **Corentin Spriet** de m'avoir réconciliée avec la microscopie et pour tous les conseils que tu as pu me donner. J'espère qu'on aura l'occasion de se recroiser au C9 ou sur le site des 2 caps à la recherche de fossiles,

Un grand merci au Docteur **Jérôme de Ruyck** d'avoir réussi à me mettre des étoiles dans les yeux devant les modélisations moléculaires,

Merci à **Nadège, Laurence, Martine, Anne-Sophie, Fred** qui m'ont permis de me soulager des contraintes administratives et logistiques,

Merci à toutes les personnes que j'ai pu croiser de près ou de loin, et qui ont eu une attention à mon égard,

Merci aux équipes du Docteur **Ignacio Caballero**, du Docteur **Mustapha Si-Tahar** et du Docteur **Pascal Barbry** pour ce travail collaboratif et aux associations **Vaincre La Mucovscidose** et **Grégory Lemarchal** d'avoir financé cette thèse.

Merci à **David** de nous avoir facilité l'analyse de la spectrométrie de masse, à **Antoine** et son trop plein d'énergie pour avoir égayé mes lundis soir et à **Maxence**, futur commercial ou président de la République ☺, que je n'ai pas vu assez souvent à mon goût mais qui me fait toujours autant rire avec ses phrases d'adulte,

Merci à **Fatima** de ne pas m'oublier, tu es une femme, une maman et une scientifique extra. Je suis contente d'avoir gardé le contact même si avec notre smala les temps pour nous deviennent plus difficiles,

Un grand merci à **Emi** et **Xav** de m'avoir soutenue et d'être toujours là. Emi tu es mon anti-dépresseur naturel, reste comme ça. J'espère que l'on passera encore de nombreuses vacances ensemble pleines de fous rires et de bons souvenirs avec nos choupettes,

Alex et Loc merci d'être là depuis un bon moment déjà. J'espère que notre amitié ne s'essouffera jamais et que l'on continuera à discuter entre parents déprimés ☺. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et d'agréables moments avec la jolie boucle d'or,

Alex, Loc, Debbie, Nounou, Dédé, Damien, Flo je vous remercie pour nos fameux repas entre Boulonnais, Calaisien et Dunkerquois. J'espère que cette habitude ne se perdra jamais. Ne changez rien vous êtes géniaux,

Merci à mes **beaux-parents** et aux « **grands-parents par intérim** » de m'avoir toujours demandé si ma thèse se passait bien et d'être toujours là pour les filles,

Je remercie ma famille : **mes parents** qui n'ont pas vraiment compris pourquoi je retournais « à l'école » mais qui m'ont toujours laissé faire ce que je voulais, mes **sœurs** et mes **beaux-frères** avec qui je rigole toujours autant sachez que je ne pourrai jamais me passer de vous. Mes neveux et nièces que je vois grandir trop vite à mon grand désespoir,

Mémère, j'espère que de là où tu es tu es fière de moi même si je n'ai pas arrêté l'école pour faire des « ménages » comme tu me le conseillais,

Un immense merci à mon mari et au super papa **Sylvain** qui a accepté autant que moi cet engagement, m'a soutenue et a su prendre en main les tâches du quotidien pour me laisser du temps pour cette thèse. Je t'aime plus que tout.

Et enfin comment pourrais-je ne pas les citer : un énorme merci à mes choupinettes **Margaux** et **Raphaëlle** d'être tout simplement là et d'avoir accepté de partager leur maman entre câlins et travail. Maman a eu beaucoup de devoirs ces derniers temps mais a enfin fini d'écrire son « livre ». Vous resterez mes plus belles réussites et vous serez toujours ma priorité, je vous aime.

Je tiens à remercier pour l'honneur qu'ils me font :

Monsieur le Professeur **Jean-Marie Lacroix**,

en acceptant de présider ce jury ;

Madame le Docteur **Shaynoor Dramsi** ainsi que Madame le Docteur **Nathalie Juge**,

en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse ;

Madame le Docteur **Catherine Robbe-Masselot**,

ma directrice de thèse ;

Madame le Docteur **Caroline Cieniewski-Bernard** et Monsieur le Docteur **Mathieu Coureuil**,

qui ont bien voulu juger ce travail.

« On a coutume de dire que la vie est dure,
moi je me bats pour le futur quelle aventure »

Albert Tjamag alias MNLK

« Que vous pensiez en être capable
ou que vous pensiez en être incapable,
dans les deux cas vous avez raison. »

Henry Ford

« I'm still standing »

Elton John

Sommaire

Abréviations	13
Liste des figures et tableaux	16
Résumé	19
Abstract	20
INTRODUCTION	21
I. LA MUCOVISCIDOSE	22
1. Généralités	22
a) <i>Historique</i>	22
b) <i>Epidémiologie et tests diagnostiques</i>	23
2. La protéine CFTR	23
a) <i>Structure</i>	24
b) <i>Fonction</i>	25
c) <i>Mutations du CFTR</i>	26
3. Physiopathologie et manifestations cliniques	27
a) <i>Physiopathologie</i>	27
b) <i>Atteintes pulmonaires</i>	28
c) <i>Atteintes digestives</i>	30
d) <i>Autres atteintes</i>	31
e) <i>Infections microbiennes</i>	31
II. LES MUCINES	35
1. Composition et fonctions du mucus	35
2. Structure des mucines	36
a) <i>Les mucines membranaires</i>	39
b) <i>Les mucines sécrétées</i>	40
c) <i>Voies de biosynthèse des mucines</i>	41
d) <i>Sécrétion des mucines</i>	43
3. Viscoélasticité du gel de mucus	45
4. La O-glycosylation des mucines	46
5. La N-glycosylation des mucines	51
6. La C-mannosylation des mucines	52
III. LES MUCINES DANS L'APPAREIL RESPIRATOIRE	53
1. L'appareil respiratoire	53
a) <i>La trachée</i>	53
b) <i>Le poumon</i>	54
c) <i>L'épithélium trachéo-bronchique</i>	54
d) <i>La clairance muco-ciliaire</i>	56
2. Les mucines sécrétées de l'appareil respiratoire	58
a) <i>MUC5AC</i>	58
b) <i>MUC5B</i>	59
c) <i>Le mucus respiratoire</i>	60
3. Pathologies respiratoires obstructives	61
a) <i>Asthme</i>	61
b) <i>COPD</i>	61
IV. LES MUCINES DU TRACTUS INTESTINAL	62
1. Le tractus intestinal	62
a) <i>Généralités</i>	62
b) <i>Histologie du tractus intestinal</i>	62
2. <i>MUC2</i>	64
3. Le mucus intestinal	65
V. L'INFECTION A PSEUDOMONAS AERUGINOSA CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE	68

1. Présentation de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
2. Les facteurs de virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
a) Les facteurs de virulence associés à la bactérie	69
b) Les facteurs de virulence sécrétés par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75
3. Altérations du mucus respiratoire dans la mucoviscidose et infections par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
VI. LES MODELES ANIMAUX D'ETUDE DE LA MUCOVISCIDOSE	79
1. Le modèle de souris CF	80
2. Le modèle de rat CF	81
3. Le modèle de furet CF	81
4. Le modèle de porc CF	82
MATERIELS ET METHODES	85
I. MATERIEL BIOLOGIQUE	86
1. Le modèle de porcelets CF	86
2. Développement d'un modèle 3D de culture primaire de cellules épithéliales bronchiques de porcelets nouveau-nés CF et WT	87
3. Culture d'explants bronchiques de porcelets nouveau-nés CF et WT	87
II. INFECTIONS A PSEUDOMONAS AERUGINOSA	88
1. Infections expérimentales à <i>Pseudomonas aeruginosa in vivo</i>	88
2. Suivi de la colonisation des tissus par <i>Pseudomonas aeruginosa ex vivo</i>	88
3. Evaluation de la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur culture primaire de cellules épithéliales bronchiques CF et WT	88
III. ANALYSE DE LA O-GLYCOSYLATION DES MUCINES	89
1. Extraction et purification des mucines	89
2. Détection des mucines	89
3. Libération chimique des oligosaccharides par β -élimination en milieu réducteur	90
4. Perméthylation des oligosaccharides	90
5. Analyse des O-glycanes par spectrométrie de masse	90
IV. ANALYSES HISTOLOGIQUES ET IMMUNOHISTOCHIMIQUES	91
1. Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE)	91
2. Immunohistochimie des mucines MUC2, MUC5AC et MUC5B	91
3. Immunohistochimie avec les lectines SNA, UEA-1 et jacaline	92
4. Coloration des mucines par PAS-Bleu Alcian	92
5. Coloration des mucines par High Iron Diamin (HID)-Bleu Alcian	94
V. ANALYSE DE L'INFLAMMATION DES TISSUS	94
1. Extraction d'ARNs, synthèse d'ADNc et analyse par PCR quantitative	95
2. Détermination du niveau d'expression des cytokines et des chimiokines dans les BAL	96
VI. ANALYSE DU TRANSCRIPTOME PULMONAIRE DES PORCELETS NOUVEAU-NES	96
VII. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES SIALYLTRANSFERASES PAR PCR QUANTITATIVE	97
VIII. ADHESION DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUR MUCINES PURIFIEES	98
IX. MODULATION DE L'ACTIVITE DU CANAL CFTR SUR DES EXPLANTS DE TRACHEES DE PORCELETS CFTR^{+/+}	98
X. CULTURE DES CELLULES EPITHELIALES CANCEREUSES DE COLON HT29-5M21	99
XI. PURIFICATION DES O-GLYCANES DE MUCINES PRODUITES PAR LES CELLULES HT29-5M21	99
1. Séparation des oligosaccharides par chromatographie HPLC	99
2. Dessalage des oligosaccharides par chromatographie sur colonne de charbon	100

XII. PURIFICATION DU FLAGELLE DE LA SOUCHE PAO1 DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	100
XIII. ANALYSES STATISTIQUES	100
CONTEXTE DE LA THESE	102
RESULTATS	105
Caractérisation phénotypique et physiologique du tractus respiratoire des porcelets CFTR ^{-/-} à la naissance	106
I. ALTERATIONS DE LA GLYCOSYLATION DES MUCINES RESPIRATOIRES	106
1. Analyse de la glycosylation des mucines à partir des lavages broncho-alvéolaires	106
2. Analyse de la glycosylation des mucines respiratoires le long de l'arbre trachéo-bronchique	115
3. Analyses histologiques et immunohistochimiques des coupes de tissus de trachées de porcelets	118
a) Coloration PAS/BA	118
b) Immunomarquage des trachées avec la lectine SNA	119
c) Coloration HID/BA	119
II. LES ALTERATIONS DE GLYCOSYLATION NE SONT PAS CORRELEES A DES MODIFICATIONS D'EXPRESSION OU DE LOCALISATION DES MUCINES A LA NAISSANCE	120
III. LES PERTURBATIONS DU MUCUS PRECEDENT L'INFLAMMATION ET L'INFECTION	126
1. Analyse histologique des tissus	127
2. Dosage ELISA des IL-6 et IL-8	127
3. Dosage de l'expression des gènes de l'inflammation par PCR quantitative	128
IV. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DES POUMONS DE PORCELETS CFTR ^{-/-} ET CFTR ^{+/+} A LA NAISSANCE	129
V. L'ASCENSEUR MUCO-CILIAIRE EST INCAPABLE D'ELIMINER <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> CHEZ LES PORCELETS CFTR ^{-/-} A LA NAISSANCE	131
1. Evaluation de l'efficacité du transport muco-ciliaire <i>in vivo</i>	131
2. Evaluation de l'efficacité du transport muco-ciliaire <i>ex vivo</i>	132
Etude des mécanismes moléculaires induisant l'hypersialylation des mucines trachéales des porcelets CFTR ^{-/-}	134
I. L'HYPOXIE PEUT-ELLE ALTERER LA GLYCOSYLATION DES MUCINES RESPIRATOIRES ?	134
II. REGULATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DES SIALYLTRANSFERASES	135
III. L'ACTIVITE DU CANAL CFTR PEUT-ELLE REGULER LA GLYCOSYLATION DES MUCINES RESPIRATOIRES ?	137
IV. LE STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE PEUT-IL ALTERER LA GLYCOSYLATION DES MUCINES RESPIRATOIRES ?	138
Les altérations de sialylation des mucines favorisent l'infection des tissus par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	140
I. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ADHERE PREFERENTIELLEMENT AUX MUCINES SIALYLEES	140
II. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> CROIT PREFERENTIELLEMENT DANS DES CELLULES EPITHELIALES BRONCHIQUES ISSUES DE PORCELETS CFTR ^{-/-}	141
1. Validation du modèle de culture primaire de cellules épithéliales bronchiques des porcelets CFTR ^{-/-}	141
2. Croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans les cellules épithéliales	143

III. MODIFICATIONS DE LA SIALYLATION ET DE LA SECRETION DES MUCINES EN REPONSE A L'INFECTION	143
1. Validation du modèle d'infection des porcelets par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	143
2. Analyse transcriptomique de la réponse inflammatoire des poumons des porcelets CFTR ^{-/-} et CFTR ^{+/+} après infection par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	145
3. Altérations de la glycosylation des mucines respiratoires des porcelets en réponse à l'infection par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	146
4. Altérations de l'expression des mucines respiratoires des porcelets en réponse à l'infection par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	148
Caractérisation de la glycosylation et de l'expression des mucines du tractus intestinal des porcelets CFTR ^{-/-}	149
I. GLYCOSYLATION DES MUCINES MECONIALES	149
II. GLYCOSYLATION DES MUCINES DU COLON ET DE L'ILEON DES PORCELETS CFTR ^{-/-}	150
III. EXPRESSION ET LOCALISATION DES MUCINES DU COLON ET DE L'ILEON DES PORCELETS CFTR ^{-/-}	152
1. Coloration PAS/BA des mucines	152
2. Immunomarquage des mucines MUC2	153
Identification de ligands glycaniques reconnus par le flagelle de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	155
I. MODELISATION MOLECULAIRE DE L'INTERACTION MOLECULAIRE ENTRE FLI C ET LES OLIGOSACCHARIDES SIALYLES	155
II. GLYCOSYLATION DES MUCINES PRODUITES PAR LES CELLULES HT29-5M21	157
III. PURIFICATION DES ANTIGENES SIALYL-TF ET DISIALYL-TF A PARTIR DES MUCINES PRODUITES PAR LES CELLULES HT29-5M21	157
IV. PURIFICATION DU FLAGELLE DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	161
Développement d'un test rapide et sensible pour mesurer l'adhésion des bactéries sur mucines	162
I. MISES AU POINT DES CONDITIONS DU TEST	162
1. Choix du saturateur	162
2. Choix du fluorophore	163
3. Quantités minimales de mucines à utiliser	163
II. L'ADHESION DES BACTERIES SUR LA MUCINE COMMERCIALE GASTRIQUE DE PORC (PGM) OU LES MUCINES PRODUITES PAR LA LIGNEE CELLULAIRE HT29-MTX NE REFLETE PAS L'ADHESION DES BACTERIES SUR LES MUCINES HUMAINES	164
III. INFLUENCE DES RESIDUS D'ACIDE SIALIQUE OU DE LA NATURE DU « CORE » SUR L'ADHESION DES MICROORGANISMES AUX MUCINES HUMAINES	165
IV. ADHESION DES MICROORGANISMES AUX MUCINES HUMAINES TOUT AU LONG DU TRACTUS GASTRO-INTESTINAL	168
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	171
I. COMPARAISON DES PHENOTYPES PULMONAIRES DES PORCELETS CFTR ^{-/-} ET CFTR ^{+/+} A LA NAISSANCE	173
II. MECANISMES MOLECULAIRES REGULANT LA SIALYLATION DES MUCINES RESPIRATOIRES	176
III. IMPACT DE L'ENVIRONNEMENT PULMONAIRE SUR LA CAPACITE DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> A INFECTER LE TRACTUS RESPIRATOIRE DES PORCELETS CFTR ^{-/-}	178

IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	179
BIBLIOGRAPHIE	183
ANNEXES	202

Abréviations

Aa :	Acide aminé
ABC :	ATP Binding Cassette
ACN :	Acétonitrile
ADNe :	Adénosyl Diphosphate Complémentaire
<i>A. fumigatus</i> :	<i>Aspergillus fumigatus</i>
ALI :	Air Liquid Interface
AMPc :	Adenosine Monophosphate cyclique
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
ASL :	Airway Surface Liquid
Asp :	Acide Aspartique
ATP :	Adénosine Triphosphate
ATPases :	Adenosine Triphosphate Phosphatases
BAC :	Bacterial Artificial Chromosome
<i>B. cepacia</i> :	<i>Burkholderia cepacia</i>
Ca²⁺ :	Ion Calcium
CaCl₂ :	Chlorure de Calcium
<i>C. albicans</i> :	<i>Candida albicans</i>
CAZymes :	Carbohydrate-Active enzymes
CF :	Cystic Fibrosis
CFTR :	Cystic Fibrosis conductance Transmembrane Regulator
CFTR_{inhib172} :	Inhibiteur du CFTR
CFRD :	Cystic Fibrosis-Related Diabetes
CK :	Cystin Knot
Cl⁻ :	Ion chlorure
CMP :	Cytidine MonoPhosphate
CO₂ :	Dioxyde de Carbone
Cosmc :	Core 1 β3-Gal-T-specific molecular chaperone
CT :	Cytoplasmic Tail
CYS :	Cystéine
DAPI :	4',6-diamidino-2-phénylindole
DHB :	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DMEM :	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DOL-P :	Dolichol Phosphate
ECD :	Extra-Cellular Cellular Domain
EDTA :	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EF2 :	Elongation Factor 2
EGF :	Epithelial Growth Factor
ELISA :	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ENaC :	Epithelial Sodium Channel
EPS :	Exopolysaccharide
ExoA :	Exotoxine A
Fuc :	Fucose
FUT2 :	Fucosyl Transferase 2
Gal :	Galactose
GalNAc :	N-acétylGalactosamine
GDP :	Guanosine Diphosphate
GDPH :	Gyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase
GlcNAc :	N-acetylglucosamine
GlyH101 :	Glycine Hydrazide

H⁺ :	Ion Hydrogène
HCl :	Acide Chlorhydrique
HCO₃⁻ :	Ion bicarbonate
HE :	Hématoxyline-Eosine
HID :	High Iron Diamine
<i>H. influenzae</i> :	<i>Haemophilus influenzae</i>
HLB :	Hydrophobic-Lipophilic-Balanced
HPLC :	High Pressure Liquid Chromatography
HPRT :	Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransférase
ICH₃ :	Iodométhane
IgG :	Immunoglobuline G
IL :	Interleukine
INRA :	Institut National de la Recherche Agronomique
IVIS :	Imaging In Vivo System
Kb :	Kilobase
KCl :	Chlorure de Potassium
kDa :	KiloDalton
KH₂PO₄ :	Phosphate de potassium Monobasique
KO :	Knock-Out
LB :	Lysogeny Broth
Lex :	Lewis x
LPS :	Lipopolysaccharide
M :	Molaire
Man :	Mannose
Meti R :	Résistant à la méthicilline
Meti S :	Sensible à la méthicilline
MgCl₂ :	Chlorure de Magnésium
MgSO₄ :	Sulfate de Magnésium
MOI :	Multiplicity of Infection
MRSA :	Methicilline-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MS :	Mass Spectrometry
MSD :	Membrane-Spanning Domain
MSSA :	Methicillin-Sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
MUC :	Mucine
MWCO :	Molecular Weight Cut-Off
NA :	Non Applicable
Na⁺ :	Ion sodium
NaBH₄ :	Borohydrure de sodium
NaCl :	Chlorure de Sodium
NaHCO₃ :	Bicarbonate de Sodium
NaOH :	Hydroxide de Sodium
NBD :	Nucleotide Binding Domain
NFκB :	Nuclear factor-kappa B
nm :	Nanomètre
ORCC :	Outward-Rectifying Chloride Channel
ORL :	Oto-Rhino-Laryngologie
PA14 :	Souche PA14 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. aeruginosa</i> :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA01 :	Souche PA01 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAS :	Periodic Acid Schiff
pb :	Paire de base
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
Pel :	Polysaccharide Encoding Locus

PFBB :	Protein Free Blocking Buffer
PLC :	Phospholipase C
PMSF :	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PSL :	Periciliary Surface Liquid
Psl :	Polysaccharide Synthesis Locus
PTS :	Proline Thréonine Sérine
PULs :	Polysaccharide Utilization Loci
qPCR :	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RER :	Réticulum Endoplasmique Rugueux
RgNanH :	Trans-Sialidase de <i>Ruminococcus gnavus</i>
ROI :	Region of Interest
ROMK :	Renal Outer Medullary Potassium
rpm :	Rotation per minute
RT-PCR :	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCFA :	Short Chain Fatty Acid
SDS-PAGE :	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEA :	Sea-urchin-sperm-protein-enterokinase-agrin
Ser :	Sérine
<i>S. maltophilia</i> :	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SNA :	Sambucus Nigra
sPLA2-IIA :	Phospholipase A2
SPR :	Résonance plasmonique de surface
SST3 :	Système de Sécrétion de Type III
ST :	Sialyl Transférase
TEER :	Résistance électrique Transépithéliale
TFA :	Acide trifluoroacétique
TFF :	Trefoil Factor Family
TG2 :	Transglutaminase 2
Thr :	Thréonine
TLR :	Toll Like Receptor
TMD :	Transmembrane Domain
TNF :	Tumor Necrosis Factor
TR :	Tandem Repeat
Trp :	Tryptophane
UDP :	Uridine Diphosphate
UEA1 :	Ulex Europaeus Agglutinin 1
UV :	Ultra-violet
v/v :	Volume/volume
VIP36 :	Vesicular Integral Protein 36kDa
VNTR :	Variable Number of Tandem Repeat
vWB :	Von Willebrand
WT :	Wild type
ZmpB :	Zinc Metalloprotease
ZFN :	Zinc Finger Nuclease

Liste des figures et tableaux

- Figure 1** Représentation schématique du gène CFTR et de sa protéine.
- Figure 2** Schéma illustrant l'organisation de la protéine CFTR
- Figure 3** Schéma illustrant les différentes fonctions du canal CFTR exprimé au pôle apical des cellules épithéliales
- Figure 4** Schéma du gène CFTR, de son transcrit et de la distribution des mutations
- Figure 5** Schématisation des différentes mutations CFTR
- Figure 6** Physiopathologie de la mucoviscidose
- Figure 7** Physiopathologie des atteintes pulmonaires chez les patients CF
- Figure 8** Evolution des infections bactériennes en fonction de l'âge des patients CF
- Figure 9** Souches mucoïdes et non mucoïdes de *P. aeruginosa*
- Figure 10** Séquences polypeptidiques partielles déduites des séquences nucléotidiques de quelques gènes MUC humains
- Figure 11** Répartition des mucines dans le corps humain
- Figure 12** Représentation schématique de la structure et de l'organisation des mucines
- Figure 13** Schéma de la mucine membranaire MUC1
- Figure 14** Biosynthèse des mucines
- Figure 15** Transport des granules de sécrétion et exocytose des mucines
- Figure 16** Mécanisme d'exocytose des mucines
- Figure 17** Les 3 types de sécrétion de mucus dans les cellules en gobelet
- Figure 18** Représentation schématique de l'organisation des mucines sécrétées dans les granules de sécrétion et dans la couche de mucus
- Figure 19** La synthèse des différents noyaux, ou « cores » de chaînes O-glycaniques de mucines
- Figure 20** Les 3 types de N-glycanes
- Figure 21** Représentation schématique d'une protéine C-mannosylée
- Figure 22** Schéma du système respiratoire
- Figure 23** Représentation schématique de l'épithélium bronchique
- Figure 24** Organisation des voies aériennes inférieures et de l'épithélium associé
- Figure 25** Clairance muco-ciliaire
- Figure 26** Schéma du transport ionique des voies aériennes chez les individus sains et les patients CF
- Figure 27** Structure schématique de la mucine MUC5AC
- Figure 28** Représentation des domaines structuraux de la mucine MUC5B
- Figure 29** Les mucines sécrétées dans les voies aériennes saines et pathologiques
- Figure 30** Anatomie du tractus intestinal
- Figure 31** Histologie du côlon
- Figure 32** Structure et biosynthèse de la mucine MUC2
- Figure 33** Organisation du mucus dans l'intestin grêle et le côlon
- Figure 34** Voies microbiennes impliquées dans le métabolisme du mucus intestinal
- Figure 35** Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*
- Figure 36** Etapes de formation d'un biofilm
- Figure 37** Schéma de la membrane des bactéries gram négatif
- Figure 38** Structure du flagelle
- Figure 39** Assemblage des pili de type IV de *P. aeruginosa*
- Figure 40** La pyocyanine de *P. aeruginosa* est capable d'induire l'expression de mucines sialylées et de sialyl-Lewis^x
- Figure 41** Organes affectés dans différents modèles animaux KO pour le CFTR
- Figure 42** Développement et caractérisation moléculaire des porcs knock-out CFTR
- Figure 43** Etapes de la coloration PAS/BA avec oxydation ménagée des acides sialiques
- Figure 44** Spectres MS des O-glycanes
- Figure 45** Spectre de fragmentation MS/MS en mode positif de l'ion à m/z 895 (sialyl-TF)
- Figure 46** Spectre de fragmentation MS/MS en mode positif de l'ion à m/z 1140

Figure 47 Pourcentage relatif des O-glycanes sialylés majoritaires dans les LBA des porcelets

Figure 48 Spectre de fragmentation MS/MS en mode positif de l'ion à m/z 983

Figure 49 Représentation schématique des régions trachéo-bronchiques prélevées pour l'analyse de la glycosylation des mucines

Figure 50 Analyse histologique des échantillons de muqueuses et sous-muqueuses trachéales

Figure 51 La sialylation des mucines respiratoires des porcelets CFTR^{-/-} est altérée dans la partie haute de la trachée

Figure 52 Pourcentage relatif des O-glycanes sialylés majoritaires portés par les mucines de la muqueuse et des glandes sous-muqueuses du haut de la trachée des porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+}

Figure 53 Coloration PAS/BA des trachées de porcelets CFTR

Figure 54 Immunomarquage des trachées de porcelets avec la lectine SNA marquée à la fluorescéine

Figure 55 Coloration HID des trachées de porcelets

Figure 56 Immunolocalisation de MUC5AC et de MUC5B dans le tractus respiratoire des porcelets

Figure 57 Localisation de MUC5AC (vert) et MUC5B (rouge) dans les trachées de porcelets

Figure 58 Les lectines WGA et jacaline marquent préférentiellement MUC5B et MUC5AC respectivement

Figure 59 Les trachées des porcelets CFTR^{-/-} présentent des faisceaux de mucus enchevêtrés

Figure 60 Co-marquage de la jacaline (vert) et des mucines MUC5AC et MUC5B (rouge) dans la trachée des porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}

Figure 61 Les trachées des porcelets présentent des faisceaux de mucus enchevêtrés

Figure 62 Co-marquage de UEA-1 (vert) et des mucines MUC5B (rouge) dans la trachée des porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}

Figure 63 Etude histologique des poumons et trachées de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} avant infection

Figure 64 Dosage ELISA du niveau d'expression des interleukines IL-8 et IL-6 des poumons de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}

Figure 65 Analyse en qPCR de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation

Figure 66 Analyse transcriptomique des poumons de porcelets nouveau-nés

Figure 67 Représentation schématique du système de défense antimicrobien DUOX/LPO dans les poumons

Figure 68 Le transport muco-ciliaire est inefficace chez les porcelets CFTR^{-/-}

Figure 69 Suivi par imagerie bioluminescente de la souche PAK-Lux sur des explants de trachée de porcelets

Figure 70 Glycosylation des LBA de porcs CFTR^{+/+} placés ou non sous hypoventilation

Figure 71 Etude de l'expression des sialyltransférases ST3Gal1 et ST6GalNAc1 chez les porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+}

Figure 72 Augmentation de la sialylation des mucines respiratoires après inhibition de l'activité du canal CFTR

Figure 73 Le stress du réticulum et l'inhibition de l'activité du canal CFTR altèrent la sialylation des mucines

Figure 74 L'inhibition de l'activité du canal CFTR induit un stress du réticulum

Figure 75 Adhésion de la souche PAO1 de *P. aeruginosa* sur les mucines bronchiques de porcs CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} avant et après infection

Figure 76 *P. aeruginosa* adhère préférentiellement aux mucines respiratoires sialylées des porcelets CFTR^{-/-}

Figure 77 Modèle de culture primaire de cellules pulmonaires polarisées issues de poumons de porcelets CFTR^{-/-} (A) ou CFTR^{+/+} (B)

Figure 78 Immunofluorescence de cellules d'épithélium respiratoire différenciées de porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} cultivées en condition air-liquide

Figure 79 Suivi de la croissance de *P. aeruginosa* sur cellules épithéliales différenciées par imagerie bioluminescente de la souche PAK-Lux

Figure 80 Coloration HE des tissus de poumons et de trachées de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} infectés

Figure 81 La réponse inflammatoire à l'infection par *P. aeruginosa* n'est pas affectée par le génotype

Figure 82 Réponse transcriptionnelle des poumons de porcelets CFTR^{-/-} suite à l'infection par *P. aeruginosa*

Figure 83 La sialylation des mucines respiratoires des porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} augmente de façon significative en réponse à l'infection par *P. aeruginosa*

Figure 84 Pourcentage relatif des O-glycanes sialylés majoritaires portés par les mucines respiratoires des porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} infectés ou non par *P. aeruginosa*

Figure 85 Immunomarquage des mucines MUC5AC (vert) et MUC5B (rouge) sur les tissus de poumon et de trachée de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} infectés par *P. aeruginosa*

Figure 86 Spectres MS des O-glycanes perméthylés issus des mucines purifiées à partir de méconium de porcelets CFTR^{+/+} (A) et CFTR^{-/-} (B)

Figure 87 Augmentation significative de la sialylation des mucines dans le méconium des porcelets CFTR^{-/-}

Figure 88 Augmentation significative de la sialylation des mucines dans l'iléon des porcelets CFTR^{-/-}

Figure 89 Augmentation significative de la sialylation des mucines dans le côlon des porcelets CFTR^{-/-}

Figure 90 Coloration PAS/BA des côlons de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}

Figure 91 Coloration PAS/BA des iléons de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}

Figure 92 Co-marquage de UEA-1 (vert) et des mucines MUC2 (rouge) dans le côlon des porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}

Figure 93 Structure cristallographique du monomère de FliC

Figure 94 Modélisation moléculaire de l'interaction de différents oligosaccharides avec FliC

Figure 95 Modélisation moléculaire de l'interaction des 3 oligosaccharides avec FliC

Figure 96 Spectre de masse en mode positif des O-glycanes perméthylés de mucines sécrétées par les cellules épithéliales d'adénocarcinome colique HT29-5M21

Figure 97 Profil chromatographique en phase normale des O-glycanes de mucines produites par les cellules HT29-5M21

Figure 98 Spectre de fragmentation MS/MS en mode positif de l'ion à m/z 895

Figure 99 Spectre de fragmentation MS/MS en mode positif de l'ion à m/z 895

Figure 100 Spectre de fragmentation MS/MS en mode positif de l'ion à m/z 1256

Figure 101 Purification du flagelle de *P. aeruginosa*

Figure 102 Schéma du principe du test d'adhésion des bactéries sur mucines purifiées

Figure 103 Relation entre l'intensité de fluorescence et la quantité de mucines utilisées

Figure 104 Etude de l'adhésion de différents probiotiques et microorganismes pathogènes sur de la mucine gastrique de porc commerciale, de la mucine intestinale HT29-MTX et de la mucine humaine de côlon

Figure 105 Influence des résidus d'acide sialique sur l'adhésion des microorganismes aux mucines

Figure 106 Toutes les mucines sialylées ne sont pas des ligands pour les microorganismes

Figure 107 Adhésion des microorganismes aux mucines du tractus gastro-intestinal

Figure 108 Caractéristiques structurales de la glycosylation des mucines gastriques, jéjunales et iléales humaines

Figure 109 L'environnement pulmonaire des porcelets CFTR^{-/-} facilite la colonisation de *P. aeruginosa*

Figure 110 Analyse des transcrits de MUC5AC et ST3GAL1

Tableau 1 Caractéristiques des mucines membranaires

Tableau 2 Caractéristiques des mucines sécrétées formant ou non un gel

Tableau 3 Les différents noyaux des O-glycanes

Tableau 4 Exemple de squelettes de chaînes glycaniques de mucines

Tableau 5 Exemple de déterminants antigéniques portés par les O-glycanes de type mucine

Tableau 6 Séquences des amorces, température d'hybridation des amorces (°C), tailles de fragments de PCR attendues (pb) et numéro d'accèsion dans PubMed

Tableau 7 Séquences nucléotidiques des amorces de q-PCR

Tableau 8 Structures ou séquences proposées pour les oligosaccharides neutres et acides identifiés sur les mucines respiratoires issues des LBA de porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+}, infectés ou non par *P. aeruginosa*

Tableau 9 Comparaison du niveau d'expression des gènes codant pour les sialyltransférases dans les poumons de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} infectés ou non par *P. aeruginosa*

Résumé

La mucoviscidose est la maladie génétique héréditaire létale la plus fréquente dans les populations caucasiennes. Elle touche principalement les fonctions respiratoires et digestives et elle est causée par des mutations au niveau du gène codant pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Cette protéine est un canal qui régule le passage des ions chlorures à travers la membrane des cellules épithéliales. Sa dysfonction aboutit à la production de sécrétions visqueuses et déshydratées qui obstruent la lumière des épithélia. D'un point de vue physiopathologique, la mucoviscidose se caractérise par une inflammation et une infection pulmonaire chronique avec hypersécrétion de mucines bronchiques. De nombreuses bactéries y trouvent avantage pour coloniser durablement ce tractus respiratoire. Parmi elles, *P. aeruginosa* se révèle particulièrement persistante. Les patients souffrent d'infections chroniques à *P. aeruginosa*, responsables d'exacerbations de la symptomatologie pulmonaire. Les raisons de l'extrême vulnérabilité des patients à *P. aeruginosa* ne sont toujours pas élucidées. De nombreuses études ont montré une augmentation de la sialylation et de la sulfatation des mucines chez les patients CF, en lien avec la sévérité de la maladie sans pouvoir conclure ni sur l'origine de ces modifications ni sur l'impact de ces changements de glycosylation quant à la capacité des bactéries pathogènes à coloniser le mucus.

Les objectifs de cette thèse ont été de caractériser, dans un modèle porcin de mucoviscidose, les altérations de la composition biochimique des mucines dès la naissance; d'identifier les mécanismes moléculaires responsables de ces altérations; et d'évaluer l'impact de ces altérations sur la colonisation par *P. aeruginosa*.

Nous avons montré que les mucines respiratoires des porcelets CFTR^{-/-} étaient beaucoup plus sialylées que celles des porcelets CFTR^{+/+}, et ce dès la naissance, avant même toute infection ou inflammation. Ces altérations de la glycosylation des mucines n'étaient pas corrélées à des changements d'expression ou de localisation des mucines sécrétées MUC5AC et MUC5B, ni à des changements du niveau d'expression génique et protéique des sialyltransférases. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques du canal CFTR nous a permis de démontrer un effet direct de l'activité du canal CFTR sur la sialylation des mucines, qui pourrait être expliqué par un stress du réticulum endoplasmique quand le CFTR est déficient. En utilisant une souche PAK-Lux de *P. aeruginosa* inoculée dans la trachée de porcelets nouveau-nés, nous avons démontré que le transport muco-ciliaire est incapable d'éliminer les bactéries pathogènes *in vivo*, dès la naissance. Les modifications de sialylation des mucines favorisent l'adhésion de *P. aeruginosa* aux mucines et engendrent un environnement favorable à sa croissance, comme nous avons pu l'observer sur des cultures primaires de cellules épithéliales polarisées issues de trachées de porcelets CFTR^{-/-}. L'infection des porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} par *P. aeruginosa* entraîne les mêmes modifications de sialylation des mucines que celles observées constitutivement chez les nouveau-nés CFTR^{-/-}, suggérant que ces motifs sialylés sont impliqués dans la primo-colonisation des poumons par la bactérie. Deux ligands O-glycaniques, reconnus par le flagelle de *P. aeruginosa* semblent particulièrement importants dans l'étape d'adhésion. Une augmentation de la sialylation des mucines coliques, iléales et provenant du méconium des porcelets CFTR^{-/-} a également été observée, confirmant le rôle du CFTR dans ces altérations.

Ce travail de thèse a permis de mieux comprendre comment *P. aeruginosa* est capable de croître et de survivre dans les poumons CFTR^{-/-} dont la composition biochimique du mucus est profondément altérée dès la naissance. Il constitue la base de travaux futurs visant à développer de nouveaux glycomimétiques pour lutter contre ces infections bactériennes.

Abstract

Cystic fibrosis is the most common lethal genetic inherited disease in Caucasian populations. CF mainly affects respiratory and digestive functions and is caused by mutations in the gene coding for the CFTR protein (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). This protein is a channel that regulates the passage of chloride ions across the membrane of epithelial cells. Its dysfunction results in the production of viscous and dehydrated secretions that obstruct lumen of the epithelia. From a physiopathological point of view, cystic fibrosis is characterized by inflammation, hypersecretion of respiratory mucins and chronic colonization of the lungs by a variety of bacteria, chief among which is *P. aeruginosa*. Patients suffer from chronic *P. aeruginosa* infections, which are responsible for exacerbations of pulmonary symptoms. The reasons for the extreme vulnerability of patients to the infection by *P. aeruginosa* are still unclear. Numerous studies have shown an increase in mucin sialylation and sulfatation in CF patients, in relation to the severity of the disease, without being able to conclude either on the origin of these changes or on the impact of these glycosylation modification as to the ability of pathogenic bacteria to colonize mucus.

The objectives of this thesis were to characterize, in a porcine model of cystic fibrosis, the biochemical alterations of mucins at birth; to identify the molecular mechanisms responsible for these alterations; and to evaluate the impact of these alterations on *P. aeruginosa* lung colonization.

We have shown that the respiratory mucins of CFTR^{-/-} piglets were much more sialylated than those of CFTR^{+/+} piglets, as early as birth, before any previous infection or inflammation. These alterations in mucin glycosylation were not correlated with changes in the expression or localization of the secreted mucins MUC5AC and MUC5B, nor with changes in the level of gene and protein expression of sialyltransferases. The use of pharmacological inhibitors of the CFTR channel has allowed us to demonstrate a direct effect of the CFTR channel activity on mucin sialylation, which could be explained by endoplasmic reticulum stress when the CFTR is deficient. Using a PAK-Lux strain of *P. aeruginosa* inoculated in the trachea of newborn piglets, we demonstrated that mucociliary transport was unable to eliminate pathogenic bacteria *in vivo* at birth. The changes in mucin sialylation promoted adhesion of *P. aeruginosa* to the secreted mucins and created a favorable environment for its growth, as observed on primary cultures of polarized epithelial cells from CFTR^{-/-} piglet tracheae. The same profiles of hypersialylated glycans, as those observed constitutively in CFTR^{-/-} neonates, were detected on mucins from CFTR^{-/-} and CFTR^{+/+} piglets after infection by *P. aeruginosa*, suggesting that these sialylated oligosaccharides are involved in the colonization of the lungs by the bacteria. Two O-glycan ligands recognized by the flagella of *P. aeruginosa* seemed particularly important in the first step of adhesion. An increase in sialylation of ileal, colonic and meconial mucins from CFTR^{-/-} piglets was also observed, confirming the role of CFTR in these alterations.

Altogether, our results shed new light on the long-standing question dealing with the initiation of the mucin O-glycan alterations in the CF context and definitively prove that sialylation precedes infection and inflammation of airway tissues, providing a pre-existing favorable ecological niche for *P. aeruginosa* colonization. Data gleaned from these study provide new leads for the design of sialylated glycomimetics targeting *P. aeruginosa* and the development of new therapeutic strategies for treating bacterial infections.

CHAPITRE



1

Introduction

I. La mucoviscidose

1. Généralités

a) Historique

La mucoviscidose est une maladie génétique héréditaire qui touche principalement les voies respiratoires et digestives. Elle se traduit par une atteinte respiratoire létale et concerne environ une naissance sur 2500.

Au XVII^{ème} siècle, lorsque une mère embrassait son nouveau-né et que le baiser avait un goût « salé », on considérait que le bébé était ensorcelé ; son espérance de vie dépassait rarement un an (Welsh et Smith, 1995). Ce n'est qu'au XX^{ème} siècle que les premières anomalies associées à cette maladie ont été mises en évidence. En raison des anomalies pancréatiques et respiratoires, la mucoviscidose fut tout d'abord nommée « fibrose kystique du pancréas et bronchectasie » par le docteur Fanconi en 1936 puis « Cystic Fibrosis » (CF) par la pédiatre Andersen en 1938 qui décela chez les patients une obstruction intestinale ainsi que des difficultés respiratoires. D'autres observations, faites par Farber *et al.* en 1943, démontrèrent l'encombrement des bronches et des canaux pancréatiques par un mucus épais et visqueux d'où l'apparition du terme mucoviscidose en France dans les années 1940 (Quinton, 1999). Suite à cela, d'autres médecins se sont intéressés aux signes cliniques de la maladie. Ce fut le cas du docteur Di San't Agnese qui observa, en 1953, une augmentation importante du chlore et du sodium dans la sueur des patients. Il proposa alors un test diagnostique appelé test de la sueur encore utilisé de nos jours.

Les travaux d'Andersen et Hodge en 1946 ont permis d'établir que la mucoviscidose était une maladie autosomique récessive. Mais il aura fallu attendre plus de 40 ans avant la découverte du gène CFTR (Tsui *et al.*, 1985) et son isolement (Kerem *et al.*, 1989 ; Riordan *et al.*, 1989 ; Rommens *et al.*, 1989) et ainsi se voir ajouter le test génétique aux tests diagnostiques.

b) Épidémiologie et tests diagnostiques

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques. Elle est cependant considérée comme une maladie rare du fait de sa prévalence mondiale peu élevée. Elle affecte approximativement 75 000 personnes dans le monde avec une très forte variabilité inter-ethnique. Elle est très fréquente dans les populations caucasiennes alors que les populations africaines et asiatiques sont moins touchées. En France, un enfant tous les 3 jours naît avec une anomalie du gène CFTR, la prévalence de cette maladie est de l'ordre de 1/4700 avec une forte disparité inter-régionale. En effet, dans le Nord-Ouest de la France, elle concerne une naissance sur 2500 alors que dans le Sud-Est, la prévalence est de 1/10000 (Registre Français de la mucoviscidose-Bilan des données 2015).

L'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose a nettement augmenté au cours des 50 dernières années. En effet, dans les années 60 elle était de 5 ans en moyenne contre 47 ans en 2005. Cette augmentation est due à la détection précoce de la maladie, à la meilleure prise en charge des patients ainsi qu'à l'avancée de la recherche.

Des diagnostics prénataux sont proposés aux parents ayant déjà un premier enfant atteint de mucoviscidose par amniocentèse et/ou choriocentèse. Un prélèvement sanguin au niveau du talon du bébé dans les 3 premiers jours de vie permet de doser la trypsine immuno-réactive. Si son taux est élevé d'autres tests pour confirmer le diagnostique sont faits comme le test de la sueur.

2. La protéine CFTR

La mucoviscidose est liée à différentes mutations du gène CFTR démontrant la grande variabilité phénotypique de cette maladie. Ce gène est retrouvé sur le chromosome 7, s'étend sur 180 kb, est constitué de 27 exons et code pour une glycoprotéine de 1480 acides aminés (Figure 1).

Cette glycoprotéine est exprimée au pôle apical des cellules de différents organes tels que les reins, les poumons et le pancréas.

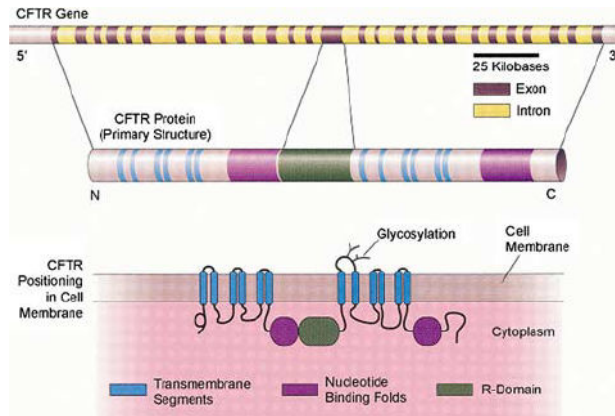


Figure 1. Représentation schématique du gène CFTR et de sa protéine (d'après Tsui L.C. et Durie, 1997).

a) *Structure*

La découverte de la séquence codant la protéine CFTR a permis de démontrer que cette dernière appartenait à la famille des transporteurs ATP binding cassette (ABC). Ces transporteurs utilisent l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour le transport de molécules (acides aminés, peptides, protéines, toxines, voire même des antibiotiques) et d'ions organiques et inorganiques (Riordan *et al.*, 1989).

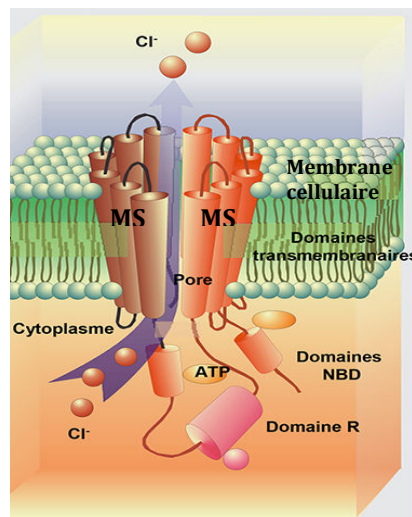


Figure 2. Schéma illustrant l'organisation de la protéine CFTR. MSD1 et MSD2 : Membrane Spanning Domain 1 et 2 (domaines transmembranaires) ; NBD1 et NBD2 : Nucleotide Binding Domain 1 et 2 (domaines de fixation des nucléotides) ; R : Regulatory Domain (domaine régulateur)

Elle se présente sous forme de deux domaines transmembranaires hydrophobes constitués de 6 segments transmembranaires sous forme d'hélice alpha (MSD1 et MSD2), de deux

nucleotide-binding domain (NBD) hydrophiles et d'un domaine régulateur cytoplasmique reliant les deux domaines hydrophiles et hydrophobes et contenant plusieurs sérines pouvant être phosphorylées et de nombreux résidus chargés (Figure 2 ; Gadsby *et al.*, 2006 ; Aleksandrov *et al.*, 2007 ; Sheppard et Welsh, 1999).

b) Fonction

Comme tous les transporteurs ABC, la protéine CFTR utilise l'ATP comme source d'énergie qu'elle hydrolyse au niveau de ses sites NBD. L'hydrolyse de l'ATP permet de fournir de l'énergie pour que le canal puisse s'ouvrir et permette le passage de substrat.

Son fonctionnement est AMPc dépendant. Une forte concentration intracellulaire d'AMPc entraîne la phosphorylation des sérines du domaine R par les phosphokinases A et C, étape indispensable pour l'hydrolyse de la molécule d'ATP. La fixation d'ATP sur les NBD rapproche les 2 domaines NBD, permettant l'ouverture du canal. L'hydrolyse de l'ATP sur le NBD2 permet la fermeture du canal. Il est le seul transporteur de la famille ABC à posséder un domaine de régulation permettant de contrôler le trafic des ions chlorure.

La protéine CFTR est multifonctionnelle : elle joue un rôle dans le transport des ions Cl^- mais aussi dans la régulation du Na^+ , dans la libération de l'ATP, dans la régulation du pH intracellulaire et des phénomènes d'endocytose/exocytose (Figure 3, Schwiebert *et al.*, 1999).

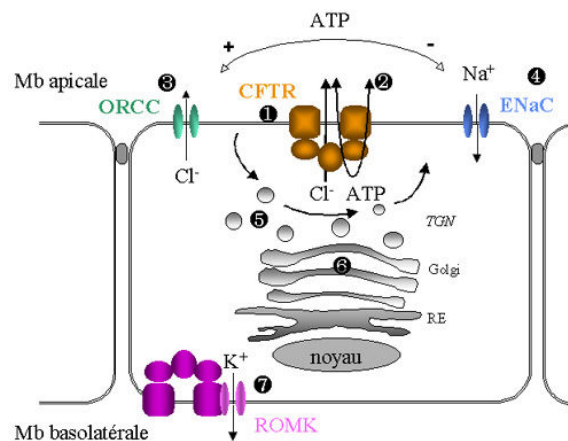


Figure 3. Schéma illustrant les différentes fonctions du canal CFTR exprimé au pôle apical des cellules épithéliales. (1) Fonction de canal Chlore ; (2) Libération d'ATP ; (3) Régulation positive des canaux chlorure rectifiés à grande conductance ORCC (outward-rectifying Cl^- channel) ; (4) Régulation négative des canaux sodiques épithéliaux (ENaC) ; (5) Régulation du trafic des vésicules ; (6) Régulation de l'acidification des compartiments intracellulaires et du trafic des protéines ; (7) Modulation de la sensibilité des canaux ROMK (Renal Outer Medullary potassium channel) aux sulfonyleurées (d'après Schwiebert *et al.*, 1999).

c) Mutations du CFTR

Il existe aujourd'hui plus de 1800 mutations du gène codant la protéine CFTR. La plupart de ces mutations sont ponctuelles et impliquent seulement quelques nucléotides. Environ 40% d'entre elles sont des mutations faux-sens ; les autres sont des mutations non-sens, entraînant un décalage du cadre de lecture, altérant les codons essentiels pour l'épissage ou induisant des variations dans la séquence du CFTR (Figure 4).

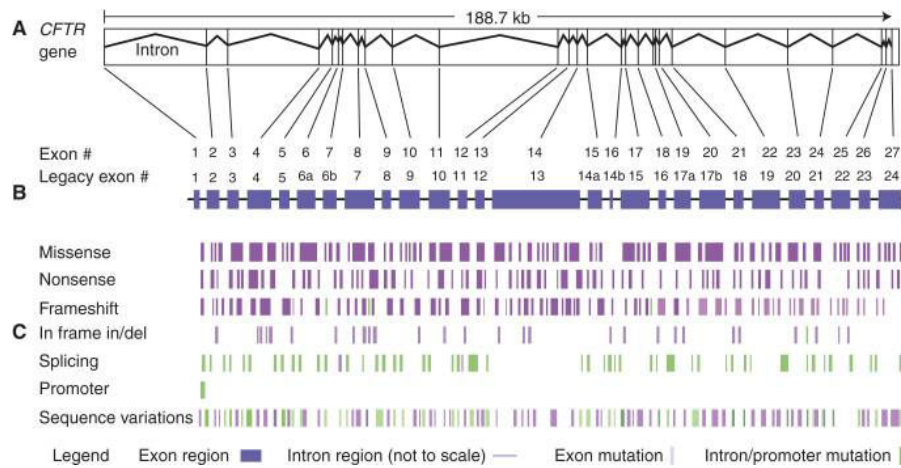


Figure 4. Schéma du gène CFTR, de son transcrit et de la distribution des mutations. (A) Représentation schématique des exons et des introns du gène CFTR. (B) Représentation des exons avec les introns minimisés. (C) Distribution des mutations et des polymorphismes (d'après Tsui et Dorfman, 2013).

Les mutations sont réparties en 6 classes (Figure 5) :

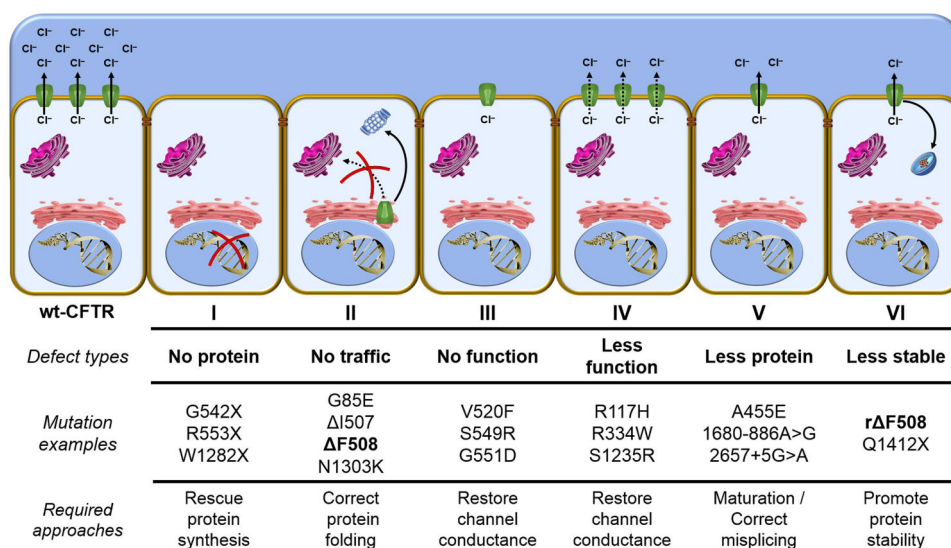


Figure 5. Schématisation des différentes mutations CFTR (selon Lopes-Pacheco, 2016).

- Classe I : mutations non sens ou des délétions/insertions conduisant à une absence d'expression de la protéine,
- Classe II : Anomalie de repliement et de trafic intracellulaire,
- Classe III : Impact sur la régulation de la protéine,
- Classe IV : Mutations faux sens situées dans le canal transmembranaire affectant la conductance,
- Classe V : mutations affectant la transcription en diminuant la quantité de transcrits,
- Classe VI : mutations affectant la stabilité de la protéine.

Les mutations de classes I à III sont les plus sévères ; les épithélia affectés ne présentent pas ou peu d'activité de la protéine CFTR.

La mutation la plus retrouvée est une mutation de classe II qui se situe sur la phénylalanine en position F508 du domaine NBD1 du CFTR. Cette mutation perturbe le repliement post-traductionnel de la protéine CFTR et cause son accumulation puis sa dégradation par le protéasome. Elle empêche ainsi le passage des ions chlorure vers la lumière, ce qui a pour conséquence une modification de l'homéostasie à la surface de l'épithélium et une augmentation de la viscosité du mucus (Dalemans *et al.*, 1991). Cette mutation est associée à différents symptômes comme une insuffisance pancréatique, une obstruction des voies biliaires, une infertilité, une sudation élevée, une obstruction intestinale, une formation de polypes nasaux, des sinusites chroniques, une déshydratation du mucus et est associée à des infections pulmonaires chroniques à *P. aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Morales *et al.*, 1999).

3. Physiopathologie et manifestations cliniques

a) Physiopathologie

Comme indiqué ci-dessus, la protéine CFTR n'a pas uniquement un rôle de transporteur de chlore. Elle est aussi capable d'inhiber le canal sodique épithélial (ENaC) (Stutts *et al.*, 1995) tout en influençant d'autres canaux chlorure (Tarran *et al.*, 2002). Son absence d'expression entraîne donc une anomalie du transport ionique dans les organes qui se traduit par une obstruction des canaux pancréatiques, biliaires, bronchiques et déférents (Figure 6).

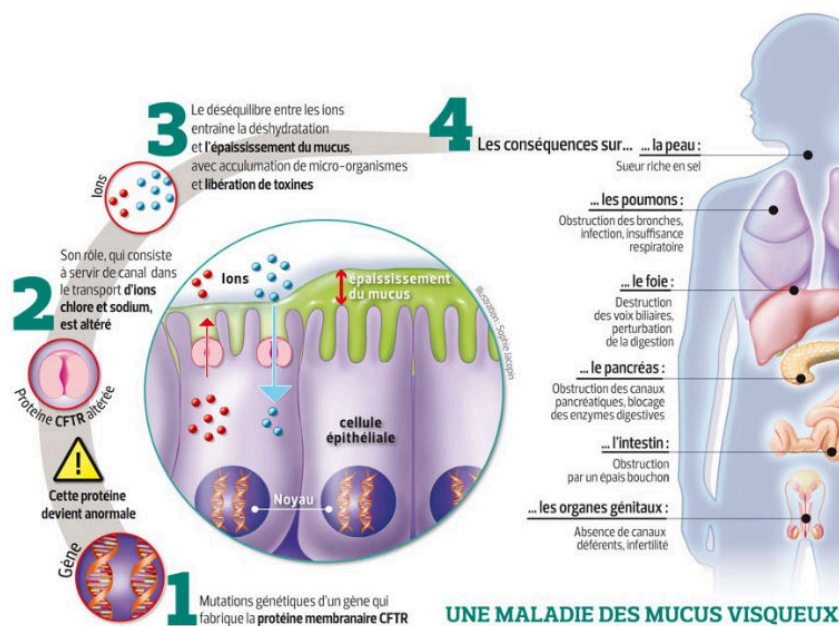


Figure 6. Physiopathologie de la mucoviscidose

De nombreuses études se sont intéressées uniquement à la physiopathologie bronchique chez les patients mucoviscidosiques car c'est l'unique organe dans lequel on retrouve un phénotype infectieux associé à la pathologie. Cependant, du fait de la spécificité d'expression de la protéine CFTR dans les tissus, la mucoviscidose affecte les organes ayant une fonction exocrine et nécessitant par conséquent la sécrétion de substances pour leur bon fonctionnement (Figure 6). Les atteintes cliniques sont très variables d'un patient à l'autre ; la sévérité des manifestations cliniques étant fortement corrélée au type de mutations du gène CFTR, mais également influencée par les facteurs génétiques et environnementaux (Cutting, 2005 ; Drumm *et al.*, 2005 ; Ratjen *et al.*, 2005).

b) Atteintes pulmonaires

Les atteintes du tractus respiratoire restent encore aujourd'hui la première cause de morbidité et de mortalité chez les patients CF. Les signes respiratoires apparaissent très précocement chez les nouveau-nés et les très jeunes enfants. Ils se caractérisent par une toux chronique et sèche qui devient rapidement grasse et associée à des expectorations purulentes. Les enfants souffrent de bronchites infectieuses et/ou asthmatiformes. Ils peuvent également présenter une tachypnée, des difficultés à respirer avec un essoufflement à l'effort ainsi que des signes d'hyperactivité bronchique (sifflement, piégeage d'air).

L'épithélium respiratoire est recouvert d'une fine couche de mucus qui est éliminée des voies respiratoires grâce aux battements des cils présents au pôle apical des cellules ciliées. Cette évacuation permet à l'organisme de se protéger de l'environnement et notamment des pathogènes en les piégeant dans le mucus et en les éliminant au niveau des voies aériennes aidé par un mécanisme de toux. Les mutations du gène codant pour la protéine CFTR affectent la rhéologie des sécrétions, réduisant l'hydratation et augmentant la viscosité du mucus. L'hyperviscosité du mucus diminue le battement ciliaire et la clairance muco-ciliaire (Tang *et al.*, 2014). Le mucus stagne dans les voies aériennes et constitue ainsi un terrain favorable pour le développement de bactéries, virus et champignons (Pezzulo *et al.*, 2012 ; Stoltz *et al.*, 2015). L'apparition de souches résistantes aux antibiotiques conduit le plus souvent à des cycles d'infections chroniques associées à des réactions inflammatoires exacerbées provoquant la destruction progressive des tissus pulmonaires (Mall et Boucher, 2014 ; Stoltz *et al.*, 2015).

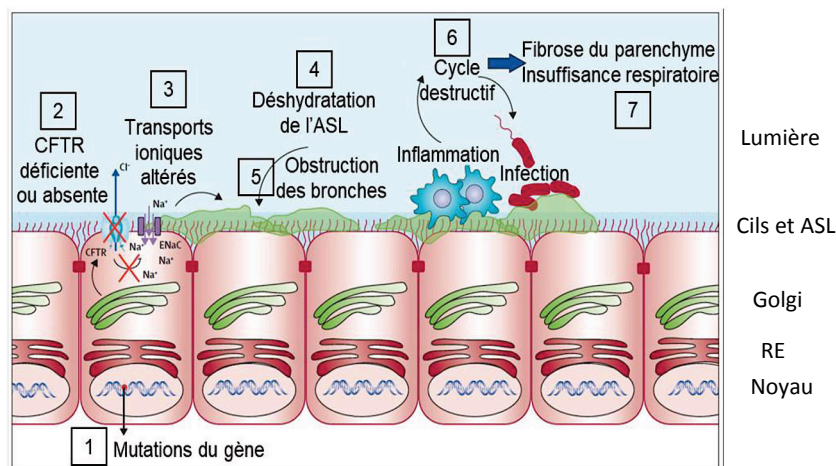


Figure 7. Physiopathologie des atteintes pulmonaires chez les patients CF. (1) Les mutations du gène codant pour la protéine CFTR conduisent à (2) une protéine CFTR déficiente ou absente. (3) Les transports ioniques de chlore et de sodium sont altérés. (4) Il y a déshydratation du liquide périciliaire (ASL : airway surface layer) et production d'un mucus visqueux et épais qui obstrue les bronches (5). Ce mucus épais devient un environnement propice aux infections microbiennes (bactéries, virus, champignons). (6) Les infections chroniques et la forte inflammation associée vont conduire progressivement à la fibrose du parenchyme pulmonaire et à une insuffisance respiratoire (7) (d'après De Boeck et Amaral, 2016).

Les déficiences du système immunitaire chez les patients CF, avec notamment une diminution des défenses antibactériennes conduisant au recrutement des neutrophiles, ainsi que la

stagnation du mucus déclenchent une cascade d'évènements aboutissant progressivement à la dégradation des fonctions pulmonaires (Figure 7).

c) Atteintes digestives

Le dysfonctionnement de la protéine CFTR qui est exprimée tout au long du tractus gastro-intestinal se traduit par une déshydratation de la bile, des sucs pancréatiques et des sécrétions intestinales.

Dès la naissance, le méconium est plus épais chez 10-15% des nouveau-nés atteints de mucoviscidose entraînant une occlusion intestinale appelée iléus méconial (Kreda *et al.*, 2012). Chez le sujet adulte, des diarrhées ou une constipation ainsi que des reflux gastro-oesophagiens sont les signes d'une atteinte digestive. Le mucus épais et visqueux peut s'accumuler au niveau de l'iléon et du caecum, engendrant un syndrome d'obstruction intestinale distale. Il peut se compliquer en syndrome occlusif complet et est généralement associé à un phénotype sévère de la mucoviscidose.

L'insuffisance pancréatique exocrine est retrouvée chez plus de 90% des patients à la naissance. La diminution des transports anioniques dans les canaux pancréatiques engendre une stagnation et une acidification des sucs pancréatiques qui empêchent les enzymes pancréatiques de s'écouler dans le tube digestif, ce qui conduit progressivement à la fibrose du pancréas (Gibson-Corley *et al.*, 2016). Les enzymes ne permettent plus la digestion des nutriments, entraînant une malabsorption des vitamines liposolubles, protéines, minéraux et graisses, qui peut-être à l'origine d'une dénutrition et d'un retard de croissance (Gelfond et Borowitz, 2013). Si les îlots de Langerhans sont atteints, les patients pourront développer un diabète insulino-dépendant appelé CFRD (Cystic Fibrosis Related Diabetes) (Gibson-Corley *et al.*, 2016).

Au niveau hépatique, les canaux biliaires peuvent être obstrués par la bile épaisse et visqueuse. Cette obstruction débute le plus souvent par une cirrhose biliaire focale qui peut évoluer en cirrhose macronodulaire multilobaire. Elle est généralement asymptomatique et se traduit par la présence d'une hépatomégalie et moins fréquemment une insuffisance hépatique. Si l'atteinte est trop sévère, une transplantation peut-être envisagée (Flass et Narkewicz, 2013).

d) Autres atteintes

Les enfants CF présentent un retard de la puberté qui est partiellement causé par un dérèglement de la production d'hormones de croissance au niveau de l'hypothalamus. Les organes génitaux sont également touchés avec une stérilité dans 98% des cas chez les hommes. Les canaux déférents sont obstrués par un mucus visqueux et épais. Chez la femme, il a été observé une hypofertilité. La glaire cervicale plus épaisse peut gêner le passage des spermatozoïdes.

Les manifestations ostéo-articulaires concernent principalement les adultes. Les maladies osseuses sont principalement liées à la malnutrition, au faible indice de masse corporelle et à la sévérité de l'atteinte pulmonaire. Les patients présentent un risque d'ostéoporose ou de fracture vertébrale lié à une densité minérale osseuse faible (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2011).

Un excès de chlore est retrouvé également dans la sueur suite aux dysfonctionnements du canal CFTR au niveau de ces glandes. Cette perte de sel dans la sueur peut causer une déshydratation sévère en cas d'exposition à de fortes chaleurs.

e) Infections microbiennes

Les infections bactériennes pulmonaires sont la plus grande cause de mortalité et de morbidité chez les patients atteints de mucoviscidose. Les infections sont très fréquentes et souvent associées à des épisodes d'exacerbation aiguë. L'acidification du milieu extracellulaire due à un dérèglement de la sécrétion d'ions bicarbonates et l'épaississement du mucus impactent les défenses naturelles de l'hôte (Pezzulo *et al.*, 2012 ; Abou Alaiwa *et al.*, 2014). Associés à une clairance muco-ciliaire déficiente, ces conditions constituent un environnement favorable pour l'implantation de micro-organismes.

Les principaux germes rencontrés sont *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *Streptotrophomonas maltophilia* et *P. aeruginosa*. La fréquence de la colonisation par ces bactéries varie en fonction de l'âge du patient (Figure 8).

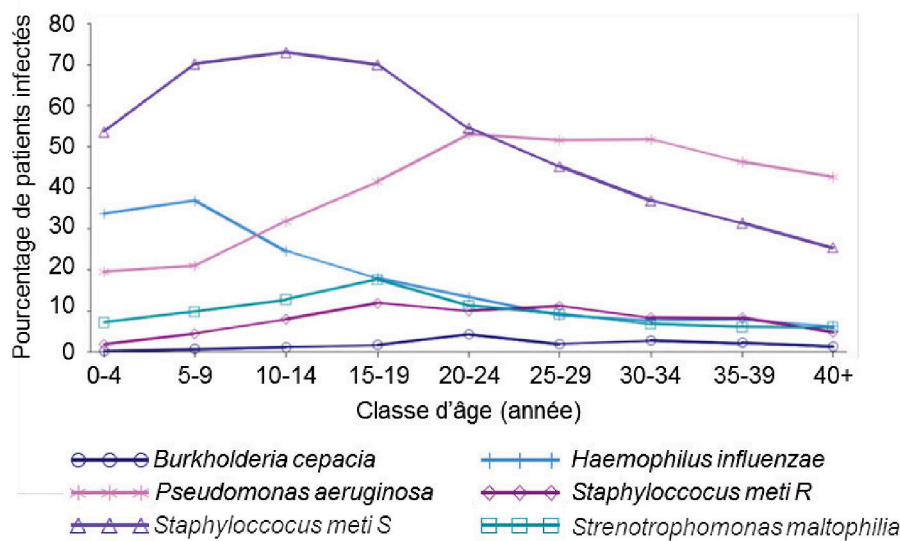


Figure 8. Evolution des infections bactériennes en fonction de l'âge des patients CF (d'après les données du Registre Français de la Mucoviscidose 2015).

S. aureus (sensible à la méthicilline, meti S ou MSSA) est un colonisateur précoce. C'est une bactérie à Gram positif qui peut acquérir des résistances aux antibiotiques comme par exemple les *S. aureus* résistants à la méthicilline (meti R ou MRSA). Plus de la moitié des patients CF de moins de 5 ans est colonisée par cette bactérie. Sa fréquence diminue ensuite pour atteindre moins de 30% des patients CF de plus de 40 ans. La prévalence de souches MRSA ne cesse d'augmenter depuis ces dix dernières années et cette émergence complique le traitement des patients. Ces souches produiraient spécifiquement certaines toxines et facteurs de virulence qui augmenteraient significativement le processus inflammatoire respiratoire. L'infection précoce à *S. aureus*, qui affaiblit les fonctions pulmonaires, associée aux traitements antibiotiques anti-staphylococciques semblent favoriser une colonisation plus précoce du patient par *P. aeruginosa* (Govan et Nelson, 1993 ; Ratjen *et al.*, 2001). Une étude de Pernet *et al.* a montré que *P. aeruginosa* était capable de stimuler le système immunitaire des cellules pulmonaires afin qu'elles détruisent *S. aureus* lui laissant ainsi le champ libre pour coloniser les bronches. *P. aeruginosa* stimulerait la production de la phospholipase A2 de type II-A (sPLA2-IIA), connue comme étant un puissant antimicrobien ayant la capacité de tuer les bactéries gram positif et plus précisément *S. aureus* (Pernet *et al.*, 2014). Ainsi, *P. aeruginosa* remplacerait souvent *S. aureus* dans l'histoire infectieuse du patient même si un grand nombre de patients CF reste colonisé par les deux agents pathogènes en même temps.

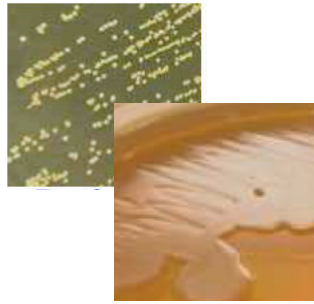
Un autre colonisateur précoce est *H. influenzae*. *H. influenzae* est retrouvée au niveau de la sphère ORL des enfants de 0 à 10 ans. Elle se présente sous deux formes : une forme encapsulée et une forme sans capsule. Elle est responsable d'otite, sinusite, pharyngite ou encore conjonctivite. Ce germe est retrouvé très souvent en association avec *S. aureus* et/ou *Streptococcus pneumoniae* chez les nourrissons et les très jeunes enfants et n'est que très rarement associé à des infections chroniques.

B. cepacia est une bactérie opportuniste responsable d'infections plus ou moins graves allant de la simple infection asymptomatique jusqu'à la pneumonie nécrosante associée ou non à une septicémie en passant par les infections nosocomiales. Elle est majoritairement retrouvée chez les patients adultes et sa présence est une contre-indication à la greffe pulmonaire pour le patient (Segonds *et al.*, 2001).

S. maltophilia est une bactérie opportuniste dans de nombreuses pathologies chroniques dont la mucoviscidose. Ces dernières années, la pression de sélection exercée sur les populations bactériennes principalement due à l'utilisation d'antibiotiques anti-pyocyaniques a conduit à l'émergence et l'identification de nouveaux pathogènes dont *S. maltophilia* dans les sécrétions des voies respiratoires des patients CF (Parkins et Floto, 2015). Des études récentes ont montré que l'infection pulmonaire chronique à *S. maltophilia* était associée à un risque accru d'exacerbations pulmonaires, de transplantation pulmonaire et de décès chez les patients CF (Waters *et al.*, 2013). La persistance de *S. maltophilia* dans les poumons CF serait probablement due à sa capacité à coloniser les cellules bronchiques en formant des biofilms intrinsèquement résistants aux antibiotiques et capables d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Di Bonaventura *et al.*, 2004 ; Pompilio *et al.*, 2010).

P. aeruginosa est le pathogène ayant la plus forte prévalence avec plus de la moitié des patients souffrant de mucoviscidose porteurs de la bactérie. Elle est présente chez 80% des patients de plus de 18 ans et 95% des patients en phase terminale. C'est une bactérie à Gram négative, également appelée bacille pyocyanique pour le pigment bleu (pyocyanine) ou vert (pyoverdine) qu'elle peut sécréter. Lors de la primo-colonisation des voies respiratoires par *P. aeruginosa*, la bactérie se trouve sous forme planctonique, capable de pénétrer facilement dans le mucus. Progressivement, les bactéries s'adaptent et prennent une forme mucoïde caractérisée par la sécrétion d'exo-polysaccharides et notamment d'alginate, avec production de biofilms résistants aux antibiotiques et au système immunitaire de l'hôte (Figure 9).

Pseudomonas aeruginosa
souche non mucoïde



Pseudomonas aeruginosa
souche mucoïde

Figure 9. Souches mucoïdes et non mucoïdes de *P. aeruginosa*

La présence de *P. aeruginosa* de façon chronique dans les voies respiratoires des patients CF semble marquer le début du déclin de la fonction respiratoire.

Les bactéries ne sont pas les seuls pathogènes identifiés dans la flore pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose. Les patients développent également des infections virales causées par des rhinovirus ainsi que des infections fongiques (Pihet *et al.*, 2009 ; Burns *et al.*, 2012 ; Touati *et al.*, 2014 ; Billard *et al.*, 2017). De nombreuses espèces fongiques sont capables de coloniser le tractus respiratoire des patients CF. Parmi elles, *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans* demeurent les espèces les plus dangereuses conduisant à une dégradation importante de la fonction respiratoire. La colonisation des bronches par *A. fumigatus* débute par l'inhalation des spores (conidies) qui se caractérisent par leur capacité à résister à des températures variant de 15 à 53°C, ce qui permet une dissémination jusqu'aux alvéoles pulmonaires. La colonisation provoque des réactions d'hypersensibilité de type I, III ou IV, responsables de différentes formes d'aspergilloses telles que les aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques. Environ 50% des patients CF présentent une infection par *A. fumigatus* dont la colonisation reste peu importante avant le début de l'adolescence. *C. albicans* est également une espèce très fréquemment retrouvée dans les expectorations de patients CF, infectant 55 à 75% des patients. Cette levure est un champignon commensal opportuniste capable de coloniser les muqueuses buccales, gastro-intestinales et uro-génitales humaines.

II. Les mucines

1. Composition et fonctions du mucus

Les épithélia respiratoires, gastro-intestinaux, de l'appareil reproducteur et oculaires sont recouverts d'une couche visco-élastique appelée mucus. Sa composition varie en fonction de sa localisation anatomique mais il est généralement constitué d'eau, d'électrolytes, de protéines, de glycoprotéines, de lipides et d'acides nucléiques. Le mucus est sécrété au niveau du pôle apical des cellules à gobelets, dans les cellules épithéliales polarisées, et au niveau des cellules sécrétrices dans les glandes sous-muqueuses (Rose et Voynow, 2006). C'est une sécrétion physiologique d'épaisseur variable formant un tapis continu à la surface des épithélia et constituant ainsi une barrière de protection efficace entre l'environnement et la muqueuse.

Les fonctions du mucus sont nombreuses. Il joue un rôle de lubrification des épithélia sous-jacents et participe à l'hydratation des épithélia respiratoires, oculaires et salivaires qui sont directement exposés aux effets asséchants de l'air. Le mucus respiratoire joue un rôle de barrière physique contre les agressions : les particules et les micro-organismes inhalés s'adsorbent dans le gel de mucus et les mécanismes de clairance muco-ciliaire permettent leur évacuation vers les voies aériennes supérieures où elles sont expectorées ou dégluties (Silberberg, 1990 ; Cone, 2009). Ce mécanisme de défense primitif fait partie de l'immunité innée. Le mucus constitue une couche de gel sélectivement perméable, ce qui facilite la diffusion et permet d'assurer les échanges nutritifs, gazeux, hydriques, électrolytiques et hormonaux (Dhanisha *et al.*, 2018). Il participe au maintien de l'homéostasie mucoale.

Le mucus joue un rôle majeur dans l'interaction entre l'hôte et les bactéries commensales ou pathogènes présentes dans les tractus respiratoires et gastro-intestinaux. De part sa très forte concentration en oligosaccharides, qui représentent des sites d'adhésion des bactéries et qui constituent une source de nutriments, le mucus offre une matrice idéale pour la colonisation et la croissance de la flore commensale intestinale (Johansson *et al.*, 2010). La diversité d'espèces bactériennes formant le microbiote commensal s'explique d'ailleurs en partie par la diversité et la grande hétérogénéité des structures glycaniques portées par les mucines. L'implantation d'un microbiote commensal permet à l'organisme de lutter indirectement contre les pathogènes, qui vont entrer en compétition avec les commensaux pour les sites d'adhésion et la disponibilité des nutriments. Le mucus renferme également des molécules de

défense antimicrobienne qui proviennent soit de la circulation sanguine (immunoglobulines) ou alors sont sécrétées par les cellules épithéliales (défensines, histatines...) (McGuckin et al., 2010). De plus les mucines peuvent exprimer des glycanes antibiotiques naturels, comme par exemple des O-glycanes portant une coiffe terminale constituée de N-acétylglucosamine liée en α 1-4. Ces composés naturellement retrouvés sur la mucine gastrique MUC6, ont la capacité d'inhiber la synthèse des composants de la paroi d'*Helicobacter pylori*, limitant ainsi la croissance de ce pathogène dans l'estomac (Fukuda *et al.*, 2006).

Le mucus est constamment produit, sécrété puis éliminé dans tous les organes où il est présent. La vitesse de renouvellement diffère en fonction de l'organe et des conditions physio-pathologiques associées à cet organe. L'épaisseur de la couche de mucus varie également de façon importante en fonction de l'organe, impactant fortement les fonctions du mucus.

2. Structure des mucines

Les mucines sont les glycoprotéines majeures du mucus. Ce sont des protéines de haut poids moléculaire (pouvant atteindre plusieurs millions de daltons) fortement O-glycosylées ; leur masse glucidique pouvant représenter jusqu'à 80% du poids total de celle-ci (Devine et McKenzie, 1992, Rose, 1992 ; Strous et Dekker, 1992).

Sur la base de leurs caractéristiques structurales, les mucines sont généralement classées en 2 sous-familles : les mucines membranaires et les mucines sécrétées formant ou non un gel de mucus (Tableaux 1 et 2 et Figure 10). La différence principale entre les mucines membranaires et sécrétées repose sur la présence d'un domaine transmembranaire hydrophobe permettant l'ancrage à la membrane plasmique des mucines membranaires. Vingt-deux gènes de mucines ont été identifiés à ce jour qui codent pour 12 mucines membranaires (MUC1, 3A, 3B, 4, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 20 et 21) et 8 mucines sécrétées (MUC2, 5AC, 5B, 6, 7, 8, 9 et 19) (Andrianifahanana *et al.*, 2006 ; Itoh *et al.*, 2008). L'expression et la localisation de ces différentes mucines varient en fonction de l'organe, de l'espèce et des conditions physio-pathologiques (Figure 11).

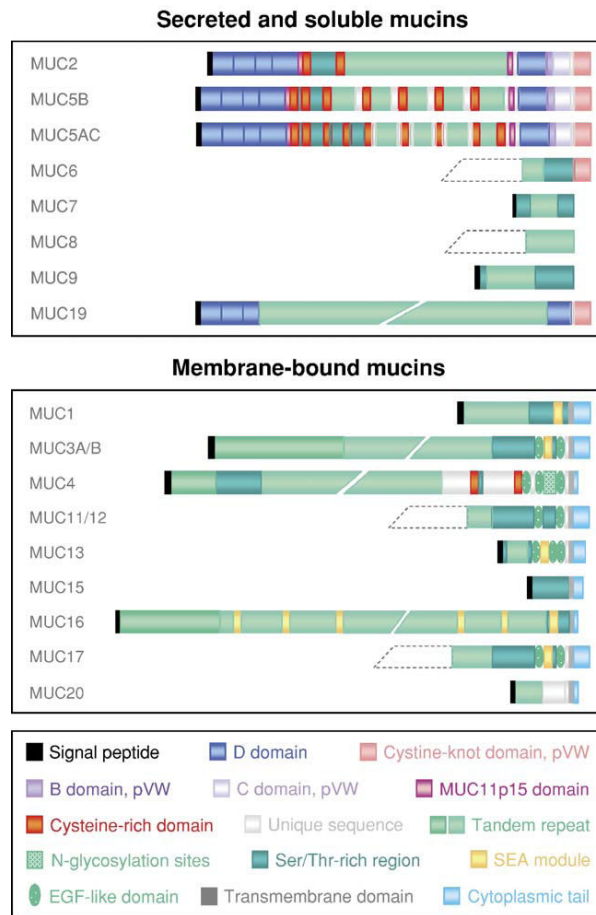


Figure 10. Séquences polypeptidiques partielles déduites des séquences nucléotidiques de quelques gènes MUC humains (d'après Andrianifahanana *et al.*, 2006).

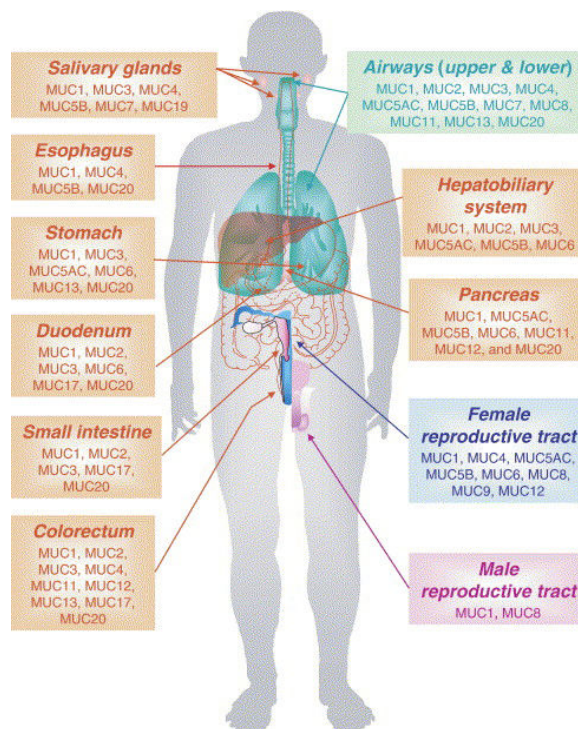


Figure 11 : Répartition des mucines dans le corps humain (d'après Andrianifahanana *et al.*, 2006).

Les mucines membranaires et sécrétées sont toutes constituées d'un squelette protéique codé par les gènes MUC et appelé apomucine qui va être hérissé de plusieurs centaines de chaînes glycaniques différentes. Cette apomucine est organisée en deux régions distinctes (Figure 11). La première région est une région centrale renfermant des séquences peptidiques répétées en tandem, appelées « tandem repeat » (TR) ou région PTS (riche en proline, thréonine et sérine). Ces régions comportent des sites potentiels de O-glycosylation au niveau des résidus de sérine et de thréonine, auxquels viennent s'attacher les chaînes glycaniques. Les résidus de proline favorisent la O-glycosylation de type O-GalNAc (N-acétylgalactosamine), la GalNAc étant le premier résidu de monosaccharide greffé sur un acide aminé hydroxylé de l'axe peptidique. La taille, le nombre et la séquence des unités de répétition varient d'une mucine et d'une espèce à l'autre. Lorsque le domaine nucléotidique répétitif dépasse quelques kilobases, apparaît un polymorphisme génétique interindividuel dit de type VNTR (Variable Number of Tandem Repeat), le nombre de séquences répétitives pour le gène pouvant varier d'un sujet à un autre. Cela est dû à une instabilité des répétitions au cours des générations. Par exemple, la mucine épithéliale MUC2 présente une unité de 69 acides aminés répétée de 51 à 115 fois (Toribara *et al.*, 1991).

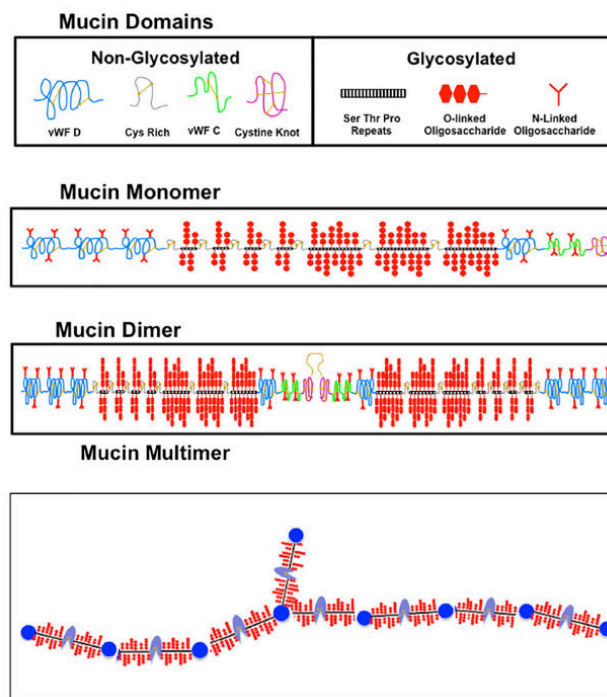


Figure 12. Représentation schématique de la structure et de l'organisation des mucines (d'après Bansil et Turner, 2018). Les monomères de mucines sont des structures linéaires formées d'une région PTS centrale riche en sérine et thréonine, substituées par des O-glycanes (en rouge). Les monomères de mucines se dimérisent via la formation de ponts disulfures entre 2 résidus de cystéine. Ces dimères vont se polymériser ensuite pour former des multimères.

La deuxième région correspond aux parties N- et C-terminales de l'apomucine, qui peuvent être riches en résidus cystéine. Elles sont formées par la juxtaposition de domaines fonctionnels, certains ayant de fortes similarités avec des domaines déjà connus : domaines B, C, D, et CK (« Cystin Knot »), du prépro-facteur de von Willebrand (vWB) humain (Gum *et al.*, 1994 ; Joba et Hoffmann, 1997) et domaine « EGF-like » (Gum *et al.*, 1997).

a) Les mucines membranaires

Les mucines membranaires sont exprimées à la surface des cellules épithéliales et sont « attachées » à la membrane constituant ainsi le glycocalyx. Elles jouent un rôle important pour la cellule en activant certaines voies de signalisation dans différentes pathologies. Elles se composent d'une partie intracellulaire appelée « queue cytoplasmique », d'une partie transmembranaire hydrophobe et d'une partie extra-cellulaire comprenant de nombreux tandem-repeat. Cette dernière partie est fortement O-glycosylée, caractéristique des mucines, et contient de nombreux résidus de sérine, proline et thréonine (Figure 13).

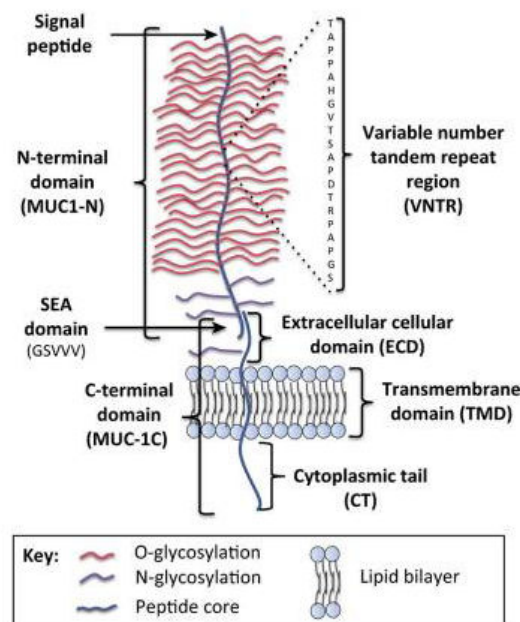


Figure 13 : Schéma de la mucine membranaire MUC1 (d'après Nath et Mukherjee, 2014).

Deux domaines sont souvent retrouvés au niveau des mucines membranaires : les domaines EGF-like et les domaines de type « sea-urchin-sperm-protein-enterokinase-agrin » (SEA). Les domaines homologues à EGF ont été identifiés dans les séquences de plusieurs gènes MUC (Williams *et al.*, 2001 ; Dekker *et al.*, 2002 ; Gum *et al.*, 2002). Certains travaux suggèrent

leur implication dans la modulation de la croissance et la différenciation épithéliale (Carraway *et al.*, 2007). Les domaines SEA sont présents à l'extrémité C-terminale, dans la partie extracellulaire de MUC1, MUC3, MUC12, MUC13 et MUC17 (Dekker *et al.*, 2002 ; Gum *et al.*, 2002). Ils contiennent un site de coupure protéolytique qui permettrait la libération des mucines membranaires sous forme soluble (Wreschner *et al.*, 2002 ; Macao *et al.*, 2006).

Tableau 1. Caractéristiques des mucines membranaires

Mucines	Sous-famille	Locus	ARN	Taille du TR (aa)	Masse moléculaire de l'apomucine
MUC1	membranaire	1q21	4.4 kb	20	122 kDa
MUC3	membranaire	7q22	nd	17	nd
MUC4	membranaire	3q29	26.5kb	16	930 kDa
MUC12	membranaire	7q22	nd	28	nd
MUC13	membranaire	3q13.3	2.8 kb	27	54.7 kDa
MUC15	membranaire	11p14.3	3.4 kb	-	33.3 kDa
MUC16	membranaire	19q13.3	35 kb	156	>1000 kDa
MUC17	membranaire	7q22	nd	59	nd
MUC20	membranaire	3q29	2.4 kb	18	55-79 kDa

b) Les mucines sécrétées

Les mucines sécrétées sont synthétisées dans les cellules à gobelet au niveau de l'épithélium ou par les cellules à mucus constituant les glandes sous-muqueuses. Elles sont sécrétées par exocytose au niveau du pôle apical des cellules en gobelet et par influx nerveux au niveau des glandes. Cette sous-famille compte 7 membres : MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC9 et MUC19. Les gènes codant pour MUC2, MUC5AC, MUC5B et MUC6 sont organisés en cluster et localisés sur le chromosome 11p15.5 selon l'ordre suivant : Télomère-HRAS-MUC6-MUC2-MUC5AC-MUC5B-IGF2-Centromère (Pigny *et al.*, 1996).

Il existe deux types de mucines sécrétées : les mucines formant un gel et les mucines ne formant pas de gel.

- Les mucines formant un gel : elles comportent de nombreux domaines cystéine permettant leur dimérisation au niveau du réticulum endoplasmique rugueux par des ponts disulfures.

- Les mucines ne formant pas de gel : ces mucines ne contiennent pas de domaine riche en cystéine et ne forment donc pas de dimère dans le réticulum endoplasmique. Elles sont retrouvées sous forme de monomère et ne peuvent pas former de réseau.

Tableau 2. Caractéristiques des mucines sécrétées formant ou non un gel

Mucines	Sous-famille	Locus	ARN	Taille du TR (aa)	Masse moléculaire de l'apomucine
MUC2	Gel	11p15.5	15.7 kb	23	540 kDa
MUC5AC	Gel	11p15.5	17.5 kb	8	641 kDa
MUC5B	Gel	11p15.5	17 kb	29	620 kDa
MUC6	Gel	11p15.5	nd	169	nd
MUC7	Pas de gel	4q13-q21	2.3 kb	23	41.5 kDa
MUC9	Pas de gel	1p13	2.3 kb	15	83 kDa
MUC19	Gel	12q12	nd	nd	nd

Les 3 mucines MUC2, MUC5AC et MUC5B possèdent au niveau de leur région centrale des domaines CYS de 110 acides aminés riches en cystéines, interrompant les régions PST. Ce domaine CYS est retrouvé 2 fois dans MUC2, 7 fois dans MUC5B et 9 fois dans MUC5AC. C'est le domaine le mieux conservé, apparu il y a 650 millions d'années, et qui est également retrouvé dans de nombreuses mucines animales (Desseyn, 2009). La fonction de ce domaine reste encore inconnue, il pourrait participer au stockage des mucines dans les granules de sécrétion, favoriser l'agrégation des mucines entre elles ou encore interagir avec des protéines du mucus (Brunelli *et al.*, 2007). Tous les domaines CYS possèdent dans leur région aminotermine une séquence Trp-(Ser/Thr)-Aaa-Trp (où Aaa représente n'importe quel acide aminé). C'est une séquence consensus de C-mannosylation (Desseyn *et al.*, 2000).

c) *Voies de biosynthèse des mucines*

La biosynthèse des mucines débute par la transcription d'un gène MUC en ARN_m sous l'effet de différents facteurs de transcription (Figure 14). La traduction a lieu dans le réticulum endoplasmique rugueux puis le précurseur peptidique se retrouve dans la lumière du RER où il va être N-glycosylé, étape nécessaire pour l'orientation des peptides précurseurs vers le bon compartiment cytoplasmique et leur maturation (Asker *et al.*, 1998 ; Van Klinken *et al.*, 1998). La mucine est ensuite transportée vers l'appareil de Golgi pour être O-glycosylée par l'intermédiaire d'une série de glycosyltransférases qui utilisent les nucléotides glucidiques

dans la lumière de l'appareil de Golgi pour ajouter un résidu glucidique à la fois à l'apomucine. Aucune séquence consensus de O-glycosylation n'est connue, cependant un résidu de proline à proximité des résidus de sérine ou thréonine faciliterait l'accès à la N-acétylgalactosaminyl transférase (Wilson *et al.*, 1991).

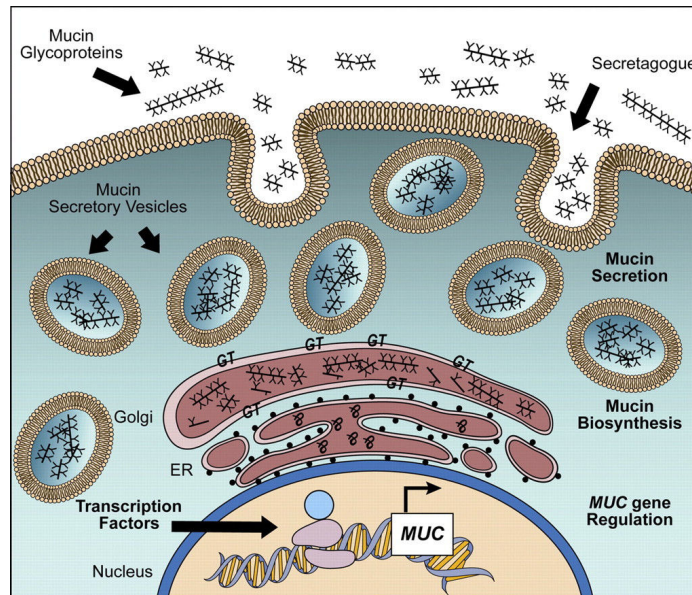


Figure 14. Biosynthèse des mucines (d'après Rose et Voynow, 2006). Les transcrits sont traduits en protéines au niveau des ribosomes associées au RER (ER). La O-glycosylation est initiée dans le cis-Golgi par transfert d'un résidu de GalNAc sur une sérine ou une thréonine, via une GalNAc transférase. L'addition de GalNAc altère la conformation de l'apomucine globulaire pour obtenir une mucine plus linéaire, qui facilite le transfert des autres monosaccharides, de façon séquentielle, sur la chaîne O-glycanique naissante. Les mucines matures sont empaquetées et stockées dans des vésicules de sécrétion jusqu'à ce qu'un sécrétagogue entraîne la libération des mucines à la surface apicale.

A la fin de la biosynthèse, les mucines quittent le réseau trans-golgien de l'appareil de Golgi sous forme de vésicules ou granules de sécrétion qui se forment par bourgeonnement à l'aide du récepteur cargo VIP36. Les mucines sont alors empaquetées, condensées et stockées dans ces vésicules du côté apical de la cellule. La condensation se produit brusquement et elle est sans doute provoquée par une acidification de la lumière de la vésicule. Les nombreuses charges négatives répulsives (structures sialylées et sulfatées) portées par les mucines sont neutralisées et complexées avec des contre-ions positifs tels que Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , ce qui permet la formation d'interactions hydrophobes entre les mucines et des lipides responsables d'une très forte condensation des mucines dans les granules. C'est parce que les vésicules matures sont remplies de façon aussi dense que les cellules pourront sécréter rapidement de grandes

quantités de mucus par exocytose. Les mucines membranaires sont quant à elles, ancrées à la surface de la cellule.

d) Sécrétion des mucines

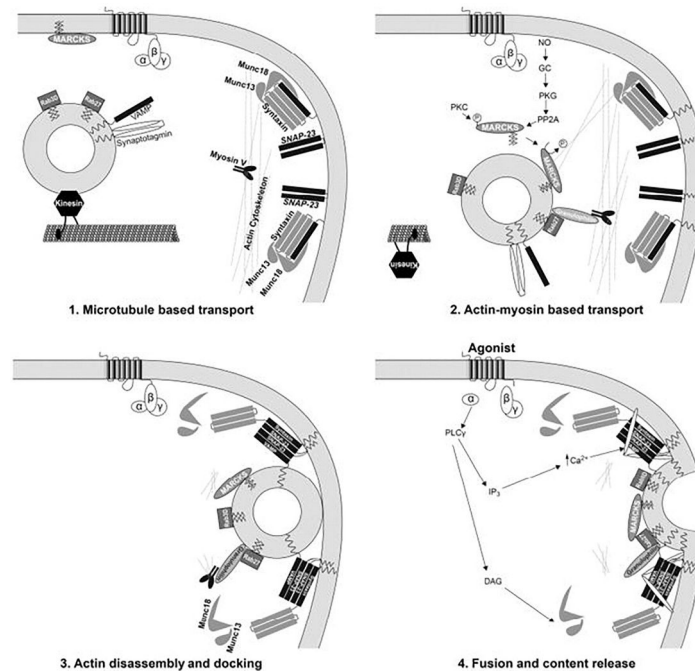


Figure 15. Transport des granules de sécrétion et exocytose des mucines (d'après Bansil et Turner, 2018).

1. Transport des granules de sécrétion le long des microtubules jusqu'au pôle apical de la cellule. 2. Transport des granules de sécrétion médié par le système actine/myosine. 3. Ancrage des granules de sécrétion à la membrane plasmique et rupture du réseau d'actine. 4. Fusion des granules de sécrétion avec la membrane plasmique et libération du contenu des granules.

La sécrétion basale des mucines dans la lumière des épithélia est un mécanisme actif d'exocytose des vésicules cytoplasmiques qui contiennent des mucines condensées sous une forme déshydratée. Le cytosquelette de la cellule en gobelet joue un rôle important dans ce phénomène. En effet, la lenteur de la sécrétion serait expliquée par la présence de filaments d'actine qui formeraient un barrage entre le granule et l'apex de la cellule (Figure 15). L'inhibition ou la rupture des filaments d'actine (respectivement par la cytochalasine D et la latrunculin A) accélère la sécrétion basale des mucines (Oliver et Specian 1990; Ehre *et al.*, 2005).

Dès l'exocytose, les mucines sont instantanément hydratées, leur volume augmente de quatre cent à six cents fois par rapport au volume condensé dans le granule en quelques millisecondes. Cette augmentation de volume est due à des répulsions électrostatiques entre les charges négatives des mucines qui vont former un gel de mucus hydraté (Figure 16).

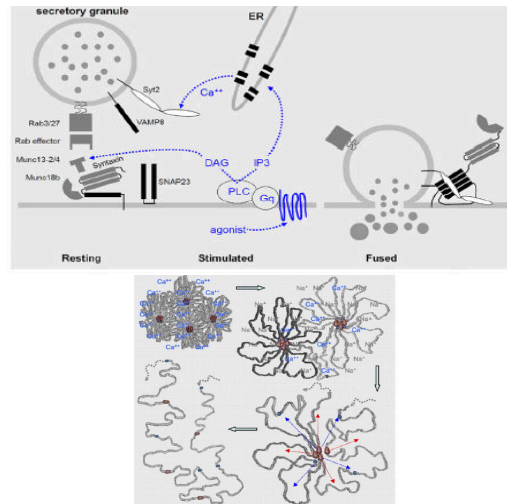


Figure 16. Mécanisme d'exocytose des mucines (d'après Bansil et Turner, 2018). Les mucines sont condensées dans des vésicules de sécrétion par complexation avec du Ca^{2+} . Les vésicules fusionnent avec la membrane plasmique via des interactions avec les protéines Rab et d'autres effecteurs non identifiés. Ces interactions conduisent à l'activation de voies de signalisation aboutissant à la libération de Ca^{2+} déstabilisant les liaisons avec les charges négatives des mucines. Cette diffusion de Ca^{2+} et la répulsion due aux charges négatives qui ne sont plus neutralisées entraînent l'extrusion du réseau de mucines fortement expansé.

La sécrétion des mucines peut également être régulée par différents stimuli. Elle correspond à une libération massive et rapide de granules de mucus dans la lumière des épithélia. Il existe deux types de sécrétion régulée : l'accélération de la sécrétion basale et l'exocytose composée (Figure 17).

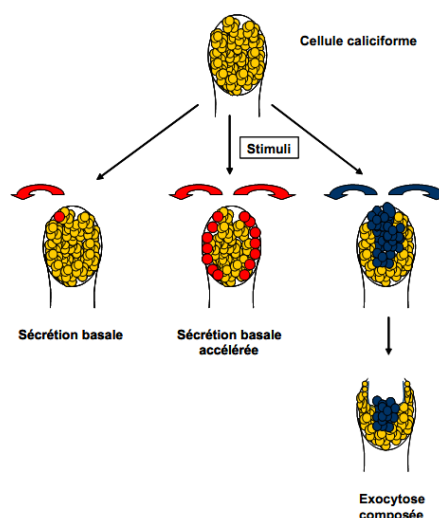


Figure 17. Les 3 types de sécrétion de mucus dans les cellules en gobelet

Lors d'une stimulation, les cellules en gobelet peuvent sécréter leur produit via un mécanisme dit « d'exocytose composée » qui met en jeu les granules centraux ayant préalablement fusionnés. La fusion de ces granules avec la membrane apicale induit une augmentation de la surface de la membrane apicale donnant un aspect de profonde cavitation à la cellule. De nombreuses molécules biologiquement actives, telles que des cytokines, des produits bactériens, des facteurs de croissance et d'autres facteurs sont capables de moduler la sécrétion des mucines.

3. Viscoélasticité du gel de mucus

Après la sécrétion, les macromolécules de mucines vont pouvoir être modifiées par des facteurs extracellulaires tels que des endo et exoprotéases, qui peuvent cliver des séquences peptidiques au sein du domaine du prépro-facteur de von Willebrand (vWB) (Wickstrom et Carlstedt 2001 ; Ridley *et al.*, 2016) ou dans une séquence GDPH située dans le domaine vWD4 ou le long de l'apomucine (Lidell *et al.*, 2003 ; Lidell et Hansson, 2006). L'activité isopeptidasique de la transglutaminase 2 (TG2) peut également médier des liaisons covalentes entre domaines CYS, supportant leur rôle dans la formation du réseau de mucines (Recktenwald et Hansson, 2016).

Le rôle de protection physique du mucus dépend de la formation d'un réseau de mucines dont la structure de base repose sur des liaisons disulfures. Ce réseau est également stabilisé par des interactions plus faibles telles que des liaisons hydrophobes ou électrostatiques (Figure 18).

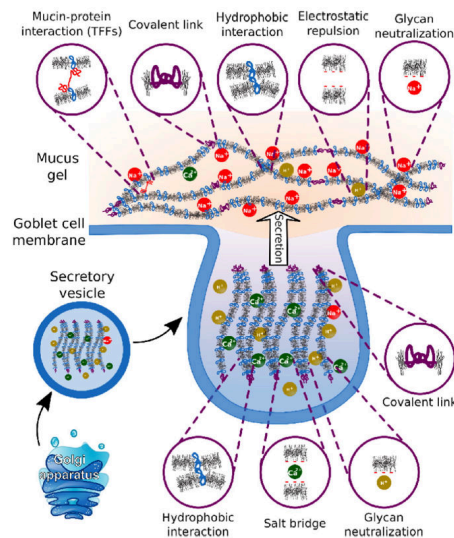


Figure 18. Représentation schématique de l'organisation des mucines sécrétées dans les granules de sécrétion et dans la couche de mucus (d'après Demouveau *et al.*, 2018).

Le grand nombre de résidus de sulfate et d'acide sialique exposés à la surface des mucines sécrétées confère une charge globale nette négative, responsable des répulsions électrostatiques requises pour adopter une structure « random coil » en milieu aqueux.

La force ionique est aussi un facteur très important dans la viscoélasticité du mucus. A des concentrations modérées de sels, les oligosaccharides sont soumis à de fortes répulsions électrostatiques du fait de leur charge négative. L'ajout de sels diminue la pression osmotique dans le réseau de mucines et réduit la capacité du mucus à gonfler et à former des interactions moléculaires (McCullagh *et al.*, 1995 ; Celli *et al.*, 2007). Lorsque la charge nette est neutre, les mucines ont tendance à s'agréger. Les ions extracellulaires HCO_3^- permettent de séquestrer le Ca^{2+} intracellulaire, qui est nécessaire pour le gonflement du mucus et sa viscoélasticité (Muchekehu et Quinton, 2010).

Il existe une forte corrélation entre viscoélasticité du mucus et pH. Ce phénomène a été très bien étudié dans le contexte de l'acidification du mucus gastrique lors de la digestion (Cao *et al.*, 1999). A pH 2-4, la couche de mucus passe d'un état de solution à un état de type gel pour protéger l'épithélium gastrique de l'autodigestion.

La viscoélasticité du mucus dépend également de la concentration en mucines sécrétées, de la présence d'autres molécules comme les peptides en trèfle (TFF ou trefoil factor family) qui stabilisent et augmentent la viscosité du gel de mucus.



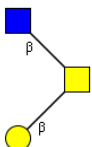



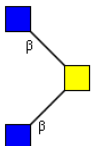

4. La O-glycosylation des mucines

La O-glycosylation est la principale modification post-traductionnelle des mucines. Elle joue un rôle majeur pour leurs propriétés physiques et biologiques. Les glycanes sont reliés à l'axe peptidique par une liaison O-glycosidique entre un résidu de sérine/thréonine et une GalNAc. Des monosaccharides comme la N-acétylglucosamine (GlcNAc), le galactose (Gal), le fucose (Fuc) et divers acides sialiques sont ensuite ajoutés à cette GalNAc de façon séquentielle par l'action de glycosyltransférases. Des groupements sulfates peuvent également exister en périphérie.

Les O-glycanes se décomposent en trois parties qui correspondent aux différentes étapes du processus de O-glycosylation qui se déroulent dans les différents saccules golgiens et dans le réseau transgolgien : le noyau (initiation), le squelette (élongation) et la périphérie (fin de synthèse des glycanes) (Hounsell *et al.*, 1996).

Le noyau est la partie la plus proche de l'apomucine, il est constitué d'une GalNAc qui peut être substituée par un ou deux résidus monosaccharidiques. Huit structures différentes ont été décrites jusqu'à présent (Tableau 3).

Tableau 3. Les différents noyaux des O-glycanes

Désignation	Structure	Désignation	Structure
Core 1		Core 5	
Core 2		Core 6	
Core 3		Core 7	
Core 4		Core 8	

Le core 1 (Gal β 1-3GalNAc) a été découvert le premier (Carlson, 1968) dans les mucines sous-maxillaires de porc. Il constitue le déterminant antigénique T (antigène Thomsen-Friedenreich). L'enzyme impliquée est appelée « core 1 β 1,3 galactosyltransférase » (Core 1 β 3Gal-T1 ou T-synthétase). Elle est protégée de l'adressage au protéasome par une chaperonne appelée Cosmc (Core 1 β 3Gal-T specific molecular chaperon), une protéine transmembranaire de type II. Le glycanes Gal β 1-3GalNAc est le O-glycane le plus fréquent, rencontré dans de nombreuses glycoprotéines et mucines. L'absence de Core 1 peut être liée soit à un défaut de la T-synthétase, soit à l'absence d'une chaperonne Cosmc fonctionnelle, comme il a été retrouvé dans le syndrome Tn, une maladie auto-immune rare caractérisée par une glycosylation incomplète des glycoprotéines membranaires au niveau des cellules sanguines (Ju et Cummings, 2005).

Le core 2 est constitué à partir du core 1 par l'action des enzymes β 1,6-N-acétylgucosaminyltransférases (C2 β 6GlcNAc-T). Le core 3 est synthétisé d'une manière similaire au core 1, par un transfert d'un résidu de GlcNAc sur le carbone 3 du résidu de GalNAc, sous l'action de l'enzyme β 1,3-N-acétylgucosaminyltransférase (β 3Gn-T6 ou C3GnT). Son expression est restreinte en majeure partie aux épithéliums du tractus gastro-intestinal (estomac, côlon et intestin grêle) et respiratoire et aux glandes salivaires (Iwai *et al.*, 2002 ; Lamblin *et al.*, 2001). La synthèse du core 4 à partir du core 3 nécessite la même enzyme que pour la synthèse du core 2, une β 6GlcNAc-T4, appelée aussi C2/C4GnT. Les cores 3 et 4 sont retrouvés seulement au niveau des mucines sécrétées de certains tissus comme les bronches, le côlon et les glandes salivaires (Varki *et al.*, 2009). Le core 5 est constitué d'un résidu de GalNAc lié en α sur le résidu de GalNAc du point d'attache. Les cores 6 et 7 comprennent respectivement un résidu de GlcNAc ou de GalNAc lié au résidu de GalNAc. Le core 8 est constitué d'un résidu de Gal lié en α sur le résidu de GalNAc du point d'attache. Les cores 5-8 sont plus rarement rencontrés, comme par exemple le core 5 dans le méconium ainsi que la muqueuse et l'adénocarcinome intestinal, le core 6 dans les mucines de kystes ovariens mucineux, ou le core 8 dans les mucines du tractus respiratoire

La synthèse des différents « cores » se fait de façon séquentielle. Après transfert de la N-acétylgalactosamine de liaison par les polypeptides N-acétylgalactosaminyltransférases (ppGalNAcTfases), il y a soit fixation de galactose par la β 1-3 galactosyltransférase de core 1, soit fixation de N-acétylgucosamine par la β 1-3 glucosaminyltransférase de core 3, ce qui permet d'obtenir respectivement les noyaux de type 1 et de type 3. Secondairement, la fixation de N-acétylgucosamine sur la N-acétylgalactosamine de liaison, permet d'obtenir le core de type 2 à partir du type 1 et le core de type 4 à partir du type 3 (Figure 19).

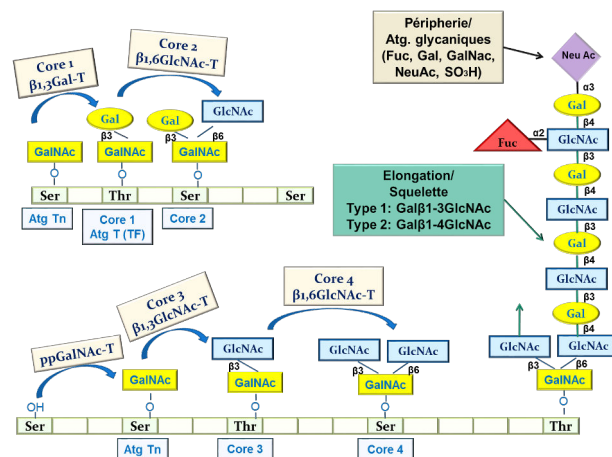


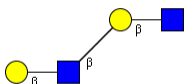
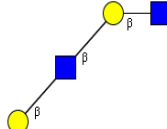
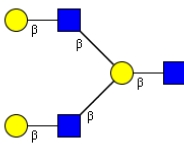
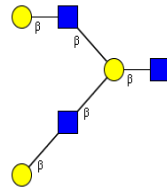


Figure 19. La synthèse des différents noyaux, ou « cores » de chaînes O-glycaniques de mucines.

La séquence protéique à laquelle est fixée la chaîne glycosidique, ainsi que la concentration en glycosyltransférases influencent fortement la composition de chaque core, et ce, de manière tissu-spécifique.

L'élongation des chaînes glycaniques de mucines se poursuit par la formation de chaînes lactosaminiques qui correspondent à l'addition de galactose et de *N*-acétylglucosamine, formant des structures soit de type 1 (Gal β 1-3GlcNAc), soit de type 2 (Gal β 1-4GlcNAc), antigéniquement distinctes (Tableau 4). Ces structures lactosaminiques peuvent être répétées au sein d'une même chaîne osidique, formant un squelette poly *N*-acétyllactosaminique. Le squelette peut être linéaire, formant l'antigène i. Il peut aussi être ramifié. On parle d'antigène I, qui correspond à une structure branchée constituée de chaînes de type 2, associées par une liaison (β 1-6) et une liaison (β 1-3) entre les deux résidus de GlcNAc et le même résidu de Gal (Tableau 4).





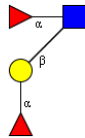
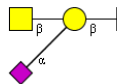

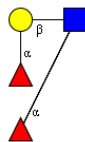

Tableau 4. Exemple de squelettes de chaînes glycaniques de mucines

	Type 1	Type 2
Chaînes lactosaminiques		
Antigène i		
Structures linéaires		
Antigène I		
Structures branchées		

La périphérie correspond à l'ajout de monosaccharides qui viennent se greffer sur le squelette sous l'action de différentes glycosyltransférases. Il s'agit de résidus de fucose liés en α 1,2 sur un Gal terminal et/ou en α 1,3 ou en α 1,4 sur une GlcNAc interne, de Gal lié en α 1,3 sur un

résidu de Gal terminal, de GalNAc liée en β 1,4 ou en α 1,3 sur un résidu de Gal ou encore d'acide sialique lié en α 2,3 sur un résidu de Gal terminal ou en α 2,6 sur la GalNAc du point d'attache. Les chaînes glycaniques peuvent également être sulfatées en périphérie en position 3 sur un résidu de Gal terminal, ou en position 6 sur un résidu de GlcNAc interne (Lo-Guidice *et al.*, 1994 ; Robbe *et al.*, 2004). Ce domaine est porteur des activités antigéniques reliées aux groupes sanguins (A, B, H, Lewis) (Tableau 5). Les mucines des sujets de groupe O se terminent par Fuc(α 1-2)Gal. Les mucines des sujets sécréteurs de groupe A ou B ont en plus respectivement un résidu de GalNAc ou un résidu de Gal. Chez les sujets non sécréteurs, qui n'expriment pas la fucosyltransférase FUT2 (environ 20% de la population), les oligosaccharides se terminent par un résidu de Gal seul. Des résidus de fucose ajoutés à des disaccharides terminaux de type 1 ou 2 génèrent différentes structures (H1, Le^a, Le^b, H2, Le^x, Le^y).

Tableau 5. Exemple de déterminants antigéniques portés par les O-glycanes de type mucine

Antigène H	Antigène A	Antigène B
		
Lewis ^a	Lewis ^b	Sda/Cad
		
Lewis ^x	Lewis ^y	Antigène sialyl-Tn
		

Les monosaccharides sont transférés par des glycosyltransférases à partir de leur forme activée, un glycosyl-nucléotide synthétisé dans le compartiment cytoplasmique à partir de précurseurs d'origine endogène. Les glycosyltransférases sont spécifiques du monosaccharide à transférer, du substrat accepteur et du type de liaison formée. Les Gal, GalNAc et GlcNAc

sont activés par l'UDP (Uridine diphosphate), le Fuc par le GDP (Guanidine diphosphate) et le Neu5Ac par le CMP (Cytidine monophosphate). On estime à plusieurs centaines le nombre de glycosyltransférases nécessaires à l'élaboration de l'ensemble des structures glucidiques d'un organisme. Ces enzymes sont pour la plupart localisées dans le réticulum endoplasmique et surtout dans l'appareil de Golgi.

5. La N-glycosylation des mucines

Les mucines, en plus d'être O-glycosylées, sont souvent N-glycosylées. Cette modification post-traductionnelle est moins abondante que la O-glycosylation mais elle est importante dans la localisation, le trafic et l'oligomérisation des protéines (Freeze, 2006). Ces chaînes N-glycosidiques se situent au niveau des extrémités N- et C- terminales de l'axe peptidique (Bell *et al.*, 2003).

L'addition des N-glycanes sur les mucines commence au niveau de la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique par un transfert de GlcNAc-P provenant d'un UDP-GlcNAc au dolichol phosphate (DOL-P) générant ainsi un Dol-P-P-GlcNAc sur lequel les sucres viennent se greffer en bloc. Ces sucres sont reliés à la protéine par une liaison N-glycosidique entre cette dernière et une asparagine (Asp). Tous les N-glycanes possèdent le même core constitué de $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}-\text{X}-$ où X est un acide aminé quelconque sauf la proline.

Il existe 3 types de N-glycanes (Figure 20): les oligomannoses, les complexes et les hybrides (Stanley *et al.*, 2009). Les antennes N-acétyllactosaminiques peuvent être substituées par de l'acide sialique en $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$ sur des résidus de Gal terminaux, ou par des résidus de Fuc, aboutissant à la formation de déterminants de groupes A, B, H, ou Lewis.

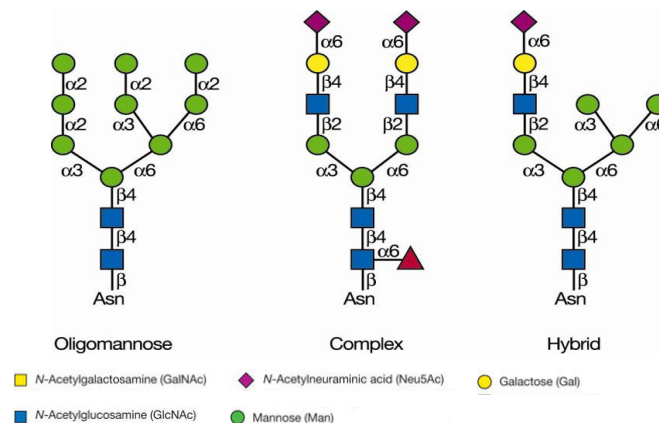


Figure 20. Les 3 types de N-glycanes

Des groupements sulfates ont été localisés sur certaines N-glycoprotéines, soit sur le C3 de résidus de Gal, soit sur le C6 de résidus de GlcNAc internes.

6. La C-mannosylation des mucines

C'est une modification post-traductionnelle qui lie un résidu α -mannopyranosyl et un tryptophane par une liaison carbone-carbone (Figure 21). Cette réaction est catalysée au niveau du réticulum endoplasmique grâce à une enzyme utilisant le dolichol-phosphomannose comme donneur de mannose et le motif Trp-X-X-Trp comme accepteur protéique. Cette glycosylation particulière a été initialement découverte en 1994 sur la ribonucléase 2 (Hofsteenge *et al.*, 1994). Elle a ensuite été caractérisée dans les domaines CYS de MUC5AC et MUC5B (Perez-Vilar *et al.*, 2004), contrairement aux domaines CYS de MUC2 (Ambort *et al.*, 2011). La C-mannosylation pourrait participer à la maturation des mucines en favorisant leur exportation dans l'appareil de Golgi, ou en participant à leur conformation.

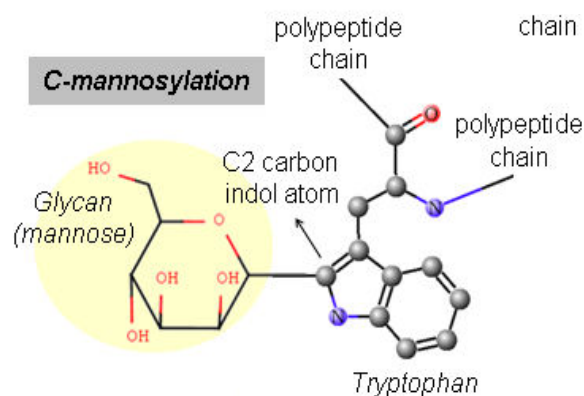


Figure 21. Représentation schématique d'une protéine C-mannosylée (d'après Mazola *et al.*, 2011).

III. Les mucines dans l'appareil respiratoire

1. L'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est constitué de différents organes permettant les échanges gazeux entre l'air extérieur et le sang, notamment en oxygénant les organes et en éliminant le dioxyde de carbone. L'air est inspiré au niveau des orifices nasaux, passe ensuite dans le pharynx, le larynx puis la trachée et arrive aux poumons où les échanges gazeux avec le sang se font dans les alvéoles pulmonaires.

L'appareil respiratoire se divise en 2 parties : les voies aériennes supérieures et les voies aériennes inférieures (Figure 22). Les voies supérieures comprennent la cavité buccale, la cavité nasale, le pharynx et le larynx. Leurs rôles sont la filtration, l'humidification et le réchauffement de l'air inspiré. Les voies aériennes inférieures comprennent la trachée, les bronches supérieures et les bronchioles. Elles ont un rôle de conduction de l'air, de réchauffement et de protection.

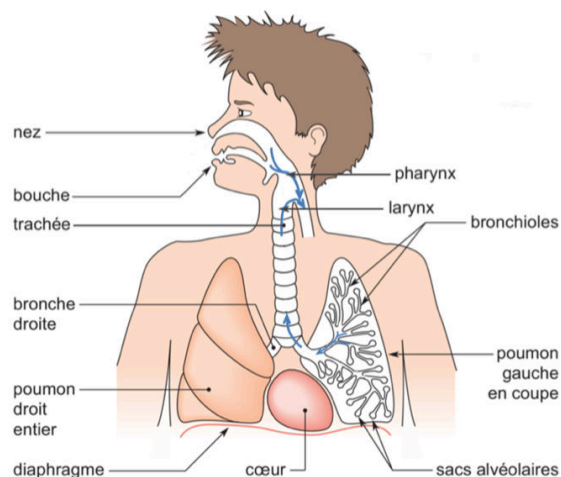


Figure 22. Schéma du système respiratoire

a) La trachée

La trachée est un organe tubulaire reliant le larynx aux bronches. Elle est constituée de deux segments: le segment cervical et le segment thoracique. Elle est en forme de demi-cercle dont la partie postérieure, presque plate, est faite de tissu mou constitué de la partie membraneuse. La partie antérieure de la trachée est constituée d'une alternance d'anneaux cartilagineux et de membrane (Allen, 2015) ce qui lui permet de ne pas se refermer et d'être maintenue lors de changement de pression. Le bas de la trachée se divise en deux axes de plus petits diamètres

appelés bronches primaires puis en 3 bronches pour le poumon droit et deux pour le poumon gauche permettant le transport de l'air. Ces bronches se ramifient ensuite en bronchioles pour terminer sur les alvéoles pulmonaires où se feront les échanges gazeux.

b) Le poumon

Les bronches secondaires se ramifient entre 23 et 25 fois dans le poumon humain de sorte à former une arborescence de conduits de plus en plus petits. Les bronches ont encore un aspect cylindrique constitué d'anneaux cartilagineux. Plus elles s'enfoncent dans le poumon plus elles deviennent lisses et perdent leurs anneaux. Elles deviennent alors des bronchioles. Ces dernières se ramifient également en diminuant de diamètre au fur et à mesure pour enfin former les alvéoles qui seront le site des échanges gazeux de part la finesse de leur paroi.

Ces ramifications sont entourées de vaisseaux sanguins et de capillaires ainsi que de tissus constituant les lobes. Le poumon droit est constitué de 3 lobes et le poumon gauche constitué de 2 lobes du fait de la place occupée par le cœur. Les lobes sont entourés par la cavité pleurale contenant du liquide et des cellules, facilitant le glissement des poumons dans la cavité thoracique.

c) L'épithélium trachéo-bronchique

L'épithélium trachéo-bronchique est constitué de 3 tuniques (Figure 23) :

- La muqueuse
- La sous-muqueuse contenant les glandes tubulo-acineuses et séro-muqueuses
- L'adventice contenant les vaisseaux et les nerfs.

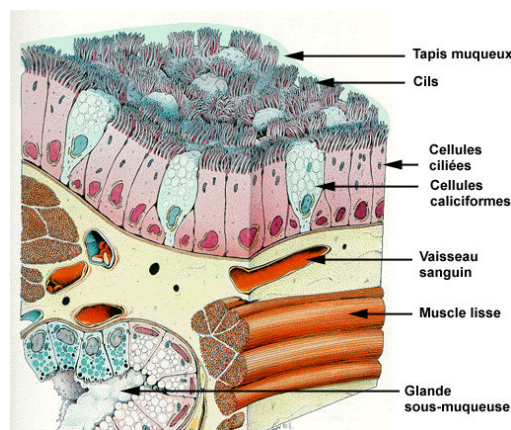


Figure 23. Représentation schématique de l'épithélium bronchique

L'épithélium des voies aériennes inférieures évolue d'un épithélium pseudostratifié dans la trachée vers un épithélium monocouche cuboïde au niveau des bronchioles terminales (Figure 24). Il est composé principalement de cellules basales, de cellules ciliées, de cellules caliciformes, de cellules neuroendocrines et de cellules Club (ou cellules de Clara).

Les cellules basales sont les seules à ne pas être en contact avec la lumière bronchique. Elles donnent à l'épithélium sa cohésion. Les cellules ciliées sont prismatiques. Leur pôle apical est recouvert de 200 à 300 cils, de 5 à 7 μm , qui battent de façon synchrone. Les cellules caliciformes ou cellules à mucus sont également prismatiques. Elles sécrètent les mucines dans la lumière de l'épithélium. Les cellules neuroendocrines, pyramidales, sont minoritaires. Elles ont un rôle de sécrétion (calcitonine, sérotonine), de chémorécepteurs sensibles à l'hypoxie et de niche de cellules souches pour la régénération et la néoplasie. Les cellules Club, cuboïdales, sécrètent les protéines du surfactant et servent de cellules progénitrices.

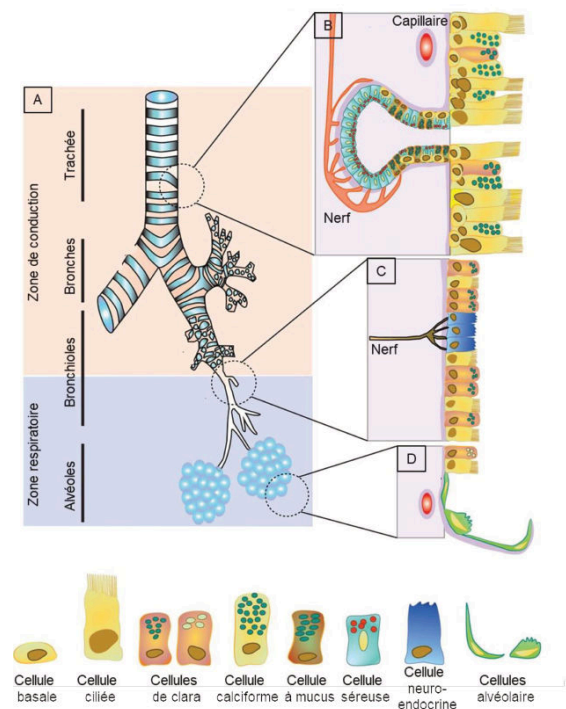


Figure 24. Organisation des voies aériennes inférieures et de l'épithélium associé (d'après Bustamante-Marín et Ostrowski, 2017). (A) L'épithélium de la trachée est un épithélium pseudo-stratifié comprenant des cellules ciliées et des glandes sous-muqueuses (B). L'épithélium des bronchioles est formé de cellules Club, de cellules ciliées et de cellules neuroendocrines (C). L'épithélium alvéolaire contient quelques cellules ciliées et des cellules alvéolaires (D).

Chez les individus sains, la protéine CFTR est exprimée dans l'ensemble des cellules épithéliales avec une expression beaucoup plus forte dans les cellules des glandes sous-

muqueuses (Trezise et Buchwald, 1991; Engelhardt *et al.*, 1992). Très récemment, il a été montré qu'une population très rare de cellules pulmonaires, les ionocytes, expriment très fortement CFTR et pourraient jouer un rôle majeur dans la régulation du pH luminal et par conséquent être un acteur clé dans la pathogénèse de la mucoviscidose (Plasschaert *et al.*, 2018 ; Montoro *et al.*, 2018).

d) La clairance muco-ciliaire

La clairance muco-ciliaire est un mécanisme de défense mécanique innée de l'appareil respiratoire, permettant l'évacuation des particules toxiques inhalées (polluants environnementaux, microorganismes, poussières...). L'air respiré est continuellement filtré le long de l'arbre trachéo-bronchique et les polluants aériens sont piégés dans la couche de mucus recouvrant les parois des voies aériennes. Grâce au battement ciliaire, le mucus est progressivement dirigé vers le pharynx où il sera avalé puis éliminé.

Deux éléments sont essentiels pour le fonctionnement de la clairance muco-ciliaire : le liquide de surface (ASL : airway surface layer) d'une épaisseur de 7 μm et le battement ciliaire. L'ASL se situe à la surface des cellules épithéliales, elle est formée de deux couches : le liquide périciliaire (PSL : periciliary surface layer) et le mucus (Davis et Lazarowski, 2008) (Figure 25).

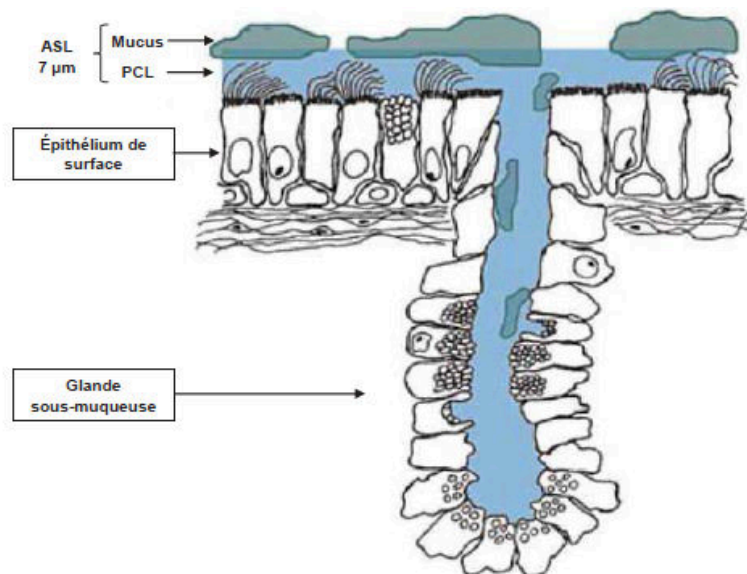


Figure 25. Clairance muco-ciliaire (d'après Frizzell et Hanrahan, 2012)

La composition exacte du PSL n'est pas encore totalement définie. C'est un fluide aqueux renfermant différentes molécules participant à la protection des voies aériennes telles que le lysozyme, la lactoferrine, et des molécules anti-oxydantes (glutathion, superoxyde dismutase...) (Cantin *et al.*, 1990 ; Loxham et Davies, 2017). Le liquide périciliaire contient aussi des protéines solubles sécrétées par les cellules séreuses et muqueuses des glandes sous-muqueuses qui participent à la protection de l'épithélium grâce à leurs propriétés antiprotéasiques, antibactériennes ou antioxydantes. Les cils baignent dans le PSL, ils sont présents sur les cellules ciliées et permettent l'évacuation des poussières et micro-organismes en les évacuant vers le pharynx à une vitesse d'environ 10 à 20 battements par seconde.

Le mucus est quant à lui composé de sels, de glycoprotéines dont les majoritaires sont MUC5AC et MUC5B et d'eau (Ma *et al.*, 2018). Il est produit par les cellules caliciformes dans la trachée et les bronches, et par les cellules de Clara au niveau des bronchioles. Le mucus piège les particules et les évacue grâce au battement ciliaire.

Chez les patients atteints de mucoviscidose, le dysfonctionnement du canal CFTR entraîne un déséquilibre entre le transport du Na^+ et du Cl^- ainsi qu'une diminution de la sécrétion de liquide (Figure 26). Ainsi le volume du liquide périciliaire est fortement diminué, ce qui a pour conséquence d'affecter la clairance muco-ciliaire qui devient inefficace et incapable d'éliminer le mucus déshydraté, épaissi et visqueux. De plus, l'hyperplasie des cellules à gobelet cause une surproduction de mucines et une accumulation du mucus obstruant progressivement les voies aériennes.

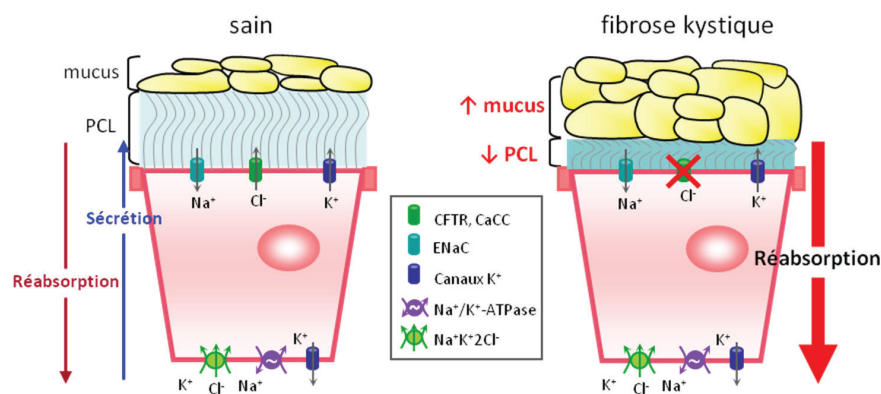


Figure 26. Schéma du transport ionique des voies aériennes chez les individus sains et les patients CF. La dysfonction du canal CFTR entraîne un déséquilibre entre le transport des fluides et des ions Na^+ et Cl^- , ayant pour conséquence une diminution du volume périciliaire et la déshydratation de la couche de mucus.

Chez certains patients CF, il a également été décrit des anomalies au niveau des cellules ciliées conduisant à une diminution de la fonction ciliaire qui seraient liées aux cycles répétés d'infections et d'inflammations (Rao et Grigg, 2006). L'immobilité du mucus infecté, son accumulation et la création de zones hypoxiques sous ces plaques de mucus causent progressivement la détérioration de l'épithélium respiratoire chez les patients CF.

2. Les mucines sécrétées de l'appareil respiratoire

a) MUC5AC

La protéine MUC5AC est codée par le gène *muc5ac* localisé sur le chromosome 11 et s'étendant sur 150kb. L'apomucine a un poids moléculaire d'environ 641 kDa. La région centrale se compose de 3500 acides aminés et renferme 9 domaines CYS de 110 acides aminés chacun (Figure 27). Entre les 5 premiers domaines CYS s'intercalent des régions PTS sans tandem repeat alors que les 4 derniers domaines CYS sont entrecoupés par des domaines PTS et des tandem repeat riches en sites de O-glycosylation. La région N-terminale présente une grande homologie de séquence (environ 45%) avec celle de MUC2, elle est riche en cystéine permettant la formation de polymères par ponts disulfures et contient en plus un motif « leucine zipper » pour faciliter la dimérisation de MUC5AC. La région C-terminale renferme de nombreux sites de N-glycosylation, ainsi que les domaines D4, B, C du pré-pro facteur de von Willebrand et des domaines cystine knot.

Plusieurs facteurs sont capables d'induire la transcription de MUC5AC tels que les cytokines, les facteurs de croissance ou encore une infection bactérienne. C'est pour cela que son expression et/ou sa localisation sont souvent altérées dans différentes pathologies.

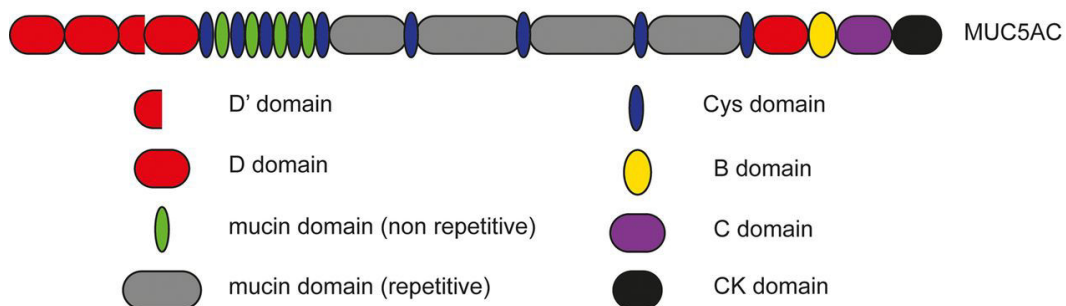


Figure 27 : Structure schématique de la mucine MUC5AC

MUC5AC est fortement exprimée au niveau du tractus respiratoire ainsi qu'au niveau du pancréas, de l'estomac et de la vésicule biliaire.

b) MUC5B

La mucine MUC5B est retrouvée dans de nombreux organes tels que les yeux, l'oreille interne, la cavité nasale, la trachée, les poumons. Elle est codée par le gène *muc5b* s'étendant sur plus de 36kb. Cette mucine a la capacité de former des dimères covalents, au niveau de son extrémité N-terminale, stockés dans les granules de sécrétion des cellules. Avec MUC5AC, elle est la mucine majoritaire du mucus pulmonaire et est produite au niveau des glandes sous-muqueuses (Davies *et al.*, 1999). Les régions N- et C-terminales sont constituées respectivement des domaines D1, D2, D', D3 similaires aux domaines du pré-pro facteur de von Willebrand et des domaines D4, B, C et CK. La région centrale est formée de séquences répétitives ou non riches en PTS et de 5 domaines CYS.

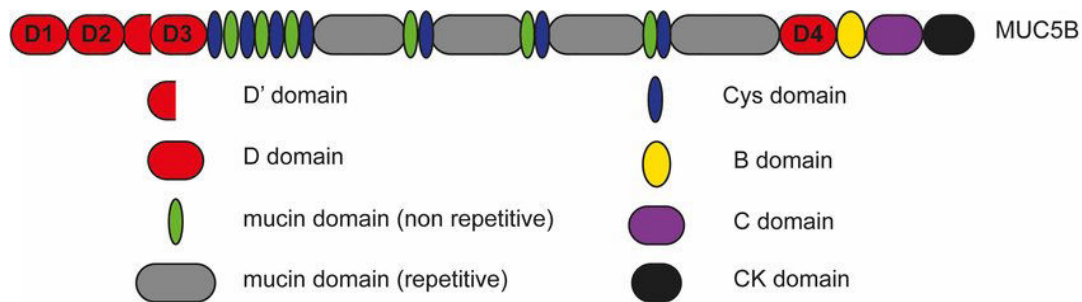


Figure 28. Représentation des domaines structuraux de la mucine MUC5B (d'après Ridley et Thornton, 2018).

Les profils de glycosylation de MUC5AC et MUC5B au niveau des voies aériennes ne sont pas identiques : même si certaines structures oligosaccharides sont portées par les deux types de mucines, il semblerait que MUC5AC soit plus fucosylée alors que MUC5B serait plus sialylée (Raclawska *et al.*, 2016). De plus le répertoire de glycosylation de MUC5AC semble préservé entre individus alors qu'il varie pour MUC5B (Kirkham *et al.*, 2002 ; Welsh *et al.*, 2017).

c) Le mucus respiratoire

L'organisation macromoléculaire de MUC5AC et de MUC5B dans le mucus respiratoire n'est pas encore totalement élucidée et ce, car la majorité des travaux a été réalisée à partir de mucines purifiées. Les marquages immunohistochimiques suggèrent que ces deux mucines sont spatialement séparées dans le mucus (Kesimer *et al.*, 2013 ; Lachowicz-Scroggins *et al.*, 2016 ; Bonser *et al.*, 2016). Des études récentes chez le porc ont démontré que MUC5B serait libérée à partir des canaux des glandes sous-muqueuses sous forme de faisceaux de mucines de 5 à 50 μm de diamètre et de plusieurs centaines de μm de long (Hoegger *et al.*, 2014a; Ermund *et al.*, 2017 ; Ostergaard *et al.*, 2017). Ces faisceaux seraient probablement dus à l'association de multimères de mucines (Figure 29). Au contraire, MUC5AC serait sécrétée à partir des cellules caliciformes et aurait l'apparence de fils de 1 à 4 μm de diamètre (Ostegaard *et al.*, 2017).

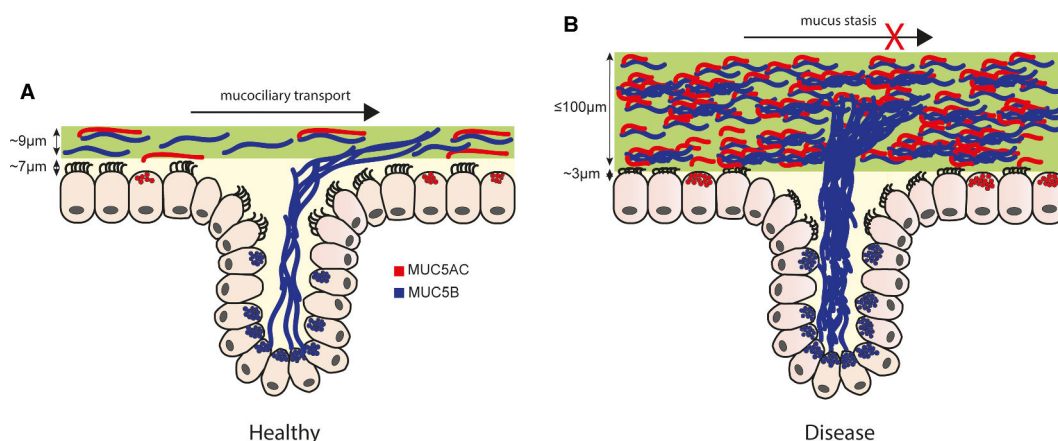


Figure 29. Les mucines sécrétées dans les voies aériennes saines et pathologiques (d'après Ridley et Thornton, 2018). (A) Dans les voies aériennes saines, la barrière de protection est formée majoritairement de MUC5B (en bleu) et en moindre quantité de MUC5AC (en rouge). Un faisceau de MUC5B émanant des glandes sous-muqueuses est représenté. L'hydratation optimale des voies aériennes permet le maintien des propriétés rhéologiques du mucus, facilitant la clairance muco-ciliaire. (B) Dans les pathologies respiratoires obstructives, la concentration des mucines augmente, ce qui obstrue le liquide périciliaire, comprime les cils et rend déficiente la clairance muco-ciliaire.

Une fois à la surface de l'épithélium, les faisceaux de MUC5B pourraient être partiellement recouverts de MUC5AC (Kesimer *et al.*, 2013 ; Hoegger *et al.*, 2014a ; Lachowicz-Scroggins *et al.*, 2016 ; Bonser *et al.*, 2016 ; Ermund *et al.*, 2017 ; Ostegaard *et al.*, 2017).

Aucune étude n'a encore permis de déterminer si le MUC5B produit par les cellules à gobelet et co-sécrété avec MUC5AC était capable de s'organiser et de s'associer pour former des faisceaux.

3. Pathologies respiratoires obstructives

a) Asthme

L'accumulation de mucus dans les voies respiratoires est une grande cause de mortalité chez les patients atteints d'asthme. Cette accumulation de mucus est due à une augmentation du nombre de cellules à gobelets présentes au niveau de l'épithélium bronchique chez ces patients entraînant par la même occasion une augmentation du nombre de vésicules stockant les mucines. Cette accumulation est associée à une surexpression de la mucine MUC5AC dans certaines formes d'asthme (Ordonez *et al.*, 2001).

b) COPD

La COPD ou Chronic Obstructive Pulmonary Disease est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par une obstruction des bronches par du mucus empêchant l'air de circuler correctement. Cette maladie fait suite à une exposition régulière à des gaz irritants ou particules et entraîne des difficultés respiratoires, une toux, une respiration sifflante et une forte production de mucus. Différents types d'obstruction sont connus comme l'emphysème ou encore les bronchites chroniques.

IV. Les mucines du tractus intestinal

1. Le tractus intestinal

a) Généralités

Le tractus intestinal débute à la sortie de l'estomac et se termine à l'anus. Il est divisé en deux parties appelées l'intestin grêle et le côlon (Figure 30). L'intestin grêle, de faible diamètre et d'une longueur de près de 7 mètres est constitué de trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. C'est lui qui réceptionne le bol alimentaire provenant de l'estomac au niveau du duodénum finissant la digestion grâce aux sels biliaires du foie et à l'acide pancréatique. Au niveau du jéjunum sont absorbés les glucides et les protéines pour atteindre la circulation sanguine. C'est ensuite dans l'iléon que la vitamine B12 et les sels biliaires intègrent la circulation sanguine. Le bol alimentaire, ne contenant plus de nutriments mais essentiellement des lipides atteint ensuite le côlon, par des mouvements contractiles appelés péristaltisme. Son diamètre est plus important que l'intestin mais il ne mesure que 1,50 mètres environ. Il est constitué de plusieurs parties : le côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde. C'est dans cette partie du tractus intestinal que l'eau et les électrolytes sont réabsorbés et les fèces concentrés jusqu'au rectum pour être éliminés au niveau de l'anus.

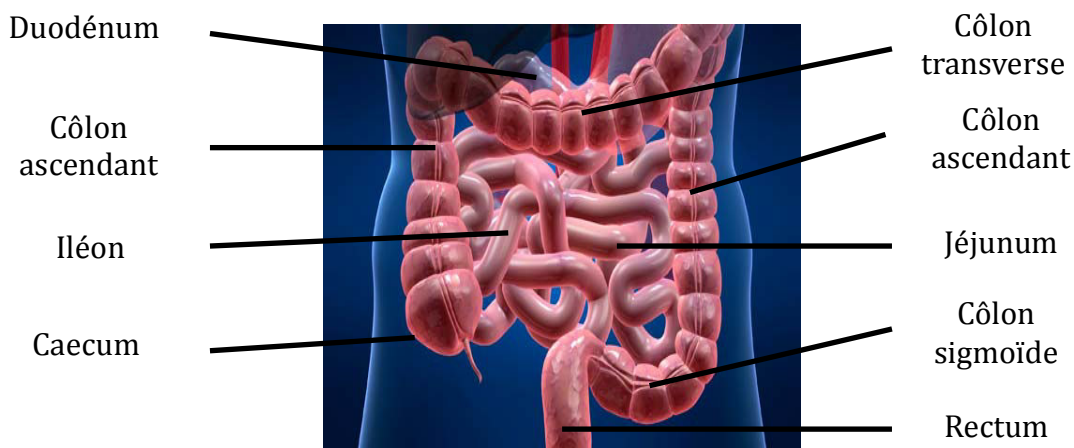


Figure 30 : Anatomie du tractus intestinal

b) Histologie du tractus intestinal

La paroi de l'intestin est constituée de 4 couches distinctes: la muqueuse, la sous-muqueuse,

la musculuse et la séreuse. La muqueuse est constituée d'un épithélium cylindrique polarisé, s'invaginant sous la forme de cryptes de Lieberkühn régulièrement espacées entre elles et reposant sur la musculaire muqueuse. Les cellules constituant l'épithélium sont de différents types : des entérocytes en grande majorité mais également des cellules entéro-endocrines, des cellules de Paneth, des cellules M et des cellules caliciformes produisant du mucus (Natividad et Verdu, 2013) (Figure 31).

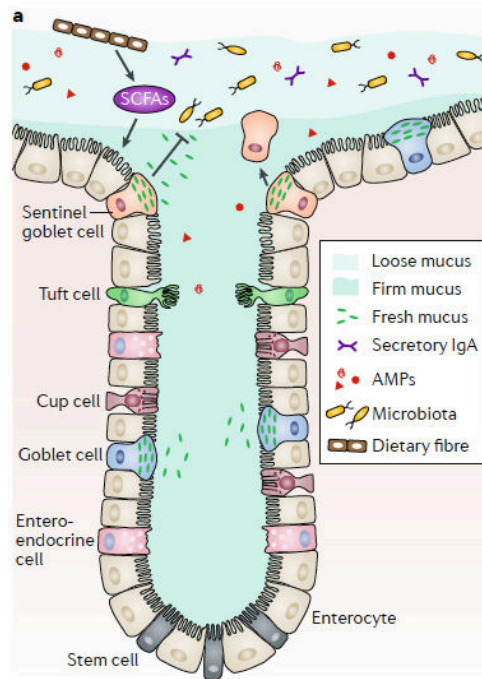


Figure 31 : Histologie du côlon (d'après Martens *et al.*, 2018). L'épithélium intestinal comprend des entérocytes, des cellules entéroendocrines, des cellules de Paneth, des cellules tuft, des cellules M, des cellules caliciformes et des cellules à gobelet sentinelles qui sont situées à l'entrée des cryptes et dont le rôle est d'empêcher la colonisation des cryptes par les bactéries. Le côlon est colonisé par des bactéries commensales capables de fermenter les fibres alimentaires en acides gras à chaîne courte (SCFAs), source d'énergie pour les entérocytes et les cellules caliciformes.

Il existe également des cellules « tuft » intestinales, dont la fonction de sentinelle muqueuse vient d'être récemment découverte (Gerbe et Jay, 2016 ; Von Moltke *et al.*, 2016 ; Howitt *et al.*, 2016). Ces cellules sont impliquées dans la réponse immunitaire de type-2, qui est une réaction immunitaire impliquée dans les réponses anti-parasitaires et les phénomènes d'allergie.

2. MUC2

MUC2 est une glycoprotéine dont l'apomucine a une masse moléculaire d'environ 540 kDa. La région centrale comporte deux tandem repeat (Figure 32). Le premier, délimité par deux domaines CYS, ne présente pas de polymorphisme de type VNTR contrairement au deuxième qui est formé de séquences répétitives variant de 50 à 100 acides aminés selon les individus. La région N-terminale possède les 4 domaines D (D1, D2, D' et D3) communs aux mucines sécrétées localisées sur le chromosome 11p15.5. La région C-terminale contient 18 sites potentiels de N-glycosylation et est formée des domaines D4, des domaines B et C des pré-pro facteurs de von Willebrand et d'un domaine cystine knot.

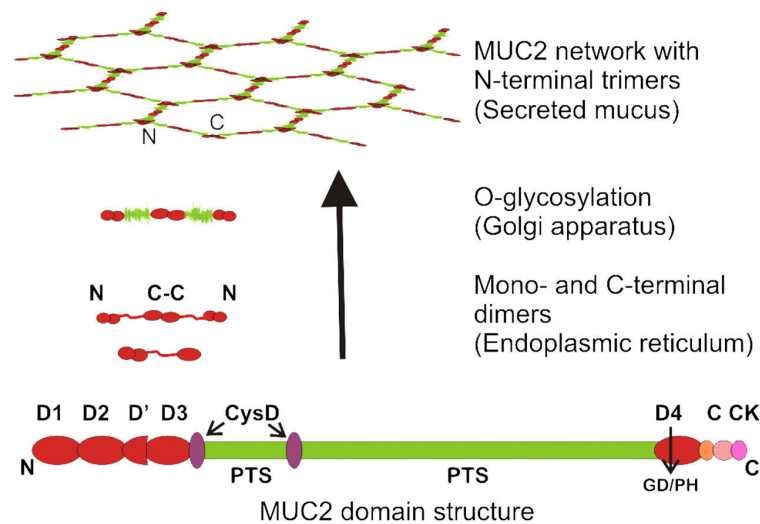


Figure 32 : Structure et biosynthèse de la mucine MUC2 (d'après Johansson *et al.*, 2011)

MUC2 est la principale constituante du mucus intestinal ; jouant principalement le rôle de protection de l'épithélium et de lubrifiant. Elle est retrouvée très tôt dans le tractus intestinal, dès 9 semaines d'aménorrhée dans l'iléon et dès 12 semaines d'aménorrhée dans le côlon.

Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique où elle est dimérisée au niveau de son extrémité C-terminale pour ensuite passer dans le réseau trans-golgien où elle sera trimérisée dans les vésicules de sécrétion (Godl *et al.*, 2002).

Outre son rôle de protection, MUC2 est également décrite comme une protéine prométastatique entraînant la formation et la progression de métastases lors de sa présence chez des souris après injection de métastases coliques (Sternberg, 1999). Ces deux propriétés diamétralement opposées de la mucine MUC2 seraient principalement dues à des défauts de

glycosylation, et notamment une augmentation de la sialylation et de la sulfatation dans le cas où la mucine est pro-métastatique (Byrd, 2004).

3. Le mucus intestinal

Dans l'intestin grêle, il n'y a qu'une seule couche de mucus hydrosoluble alors que dans le côlon, le mucus est constitué de deux couches : un mucus insoluble adhérent aux cellules épithéliales et un mucus hydrosoluble constamment renouvelé (Figure 33).

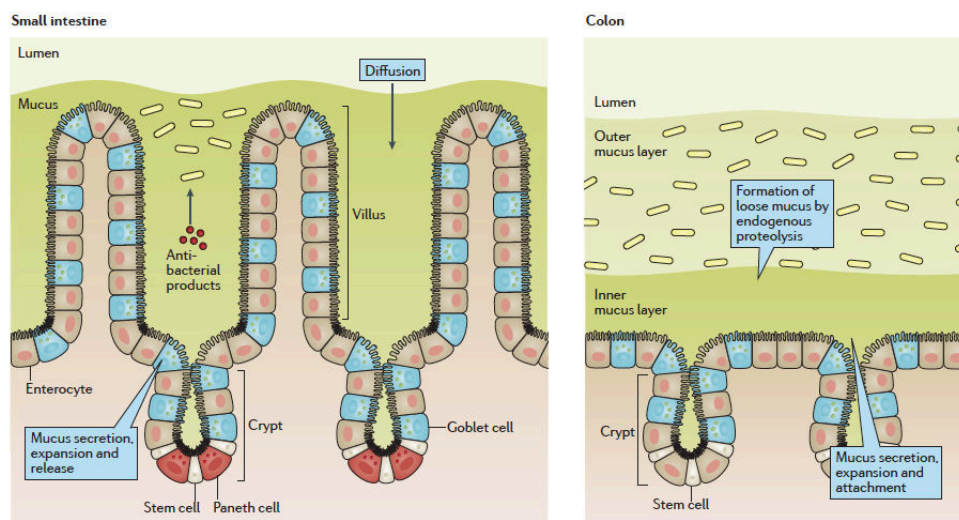


Figure 33. Organisation du mucus dans l'intestin grêle et le côlon (d'après Johansson et Hansson 2016).

Il n'existe pas de différence de composition protéique entre les 2 phases du mucus, elles sont toutes deux constituées principalement de MUC2, la mucine majoritairement sécrétée dans l'intestin. Le mucus adhérent est compact, fortement attaché à l'épithélium et dépourvu de bactéries alors que le mucus hydrosoluble est plus hydraté et volumineux, du fait de clivages protéolytiques de MUC2 et est colonisé par les bactéries.

Dans le tractus intestinal, le mucus forme une barrière physique continue entre le tissu sous-jacent et les microorganismes ainsi que les toxines qu'ils produisent, et les autres substances potentiellement nocives présentes dans la lumière intestinale. Tout au long de l'intestin, il constitue une protection efficace contre l'action délétère des radicaux libres et offre un microenvironnement stable à la surface de l'épithélium. Le mucus exerce également un rôle mécanique de lubrifiant et protège l'épithélium face aux forces mécaniques associées au processus de digestion et au passage du matériel fécal.

Bien que le mucus soit produit par l'hôte pour protéger la surface de l'épithélium gastro-intestinal, il peut aussi favoriser la colonisation par des microorganismes commensaux ou pathogènes en fonctionnant comme source de nutriments et comme matrice dans laquelle ils peuvent proliférer (Johansson *et al.*, 2010; Juge, 2012). Pour ce faire, les bactéries doivent produire des CAZymes (Carbohydre-Active enZYmes) et des protéases leur permettant de dégrader ces motifs spécifiques. Les CAZymes sont des enzymes qui catalysent la dégradation, la modification ou la création de liaisons glycosydiques des sucres complexes et des polysaccharides utilisés par les êtres vivants.

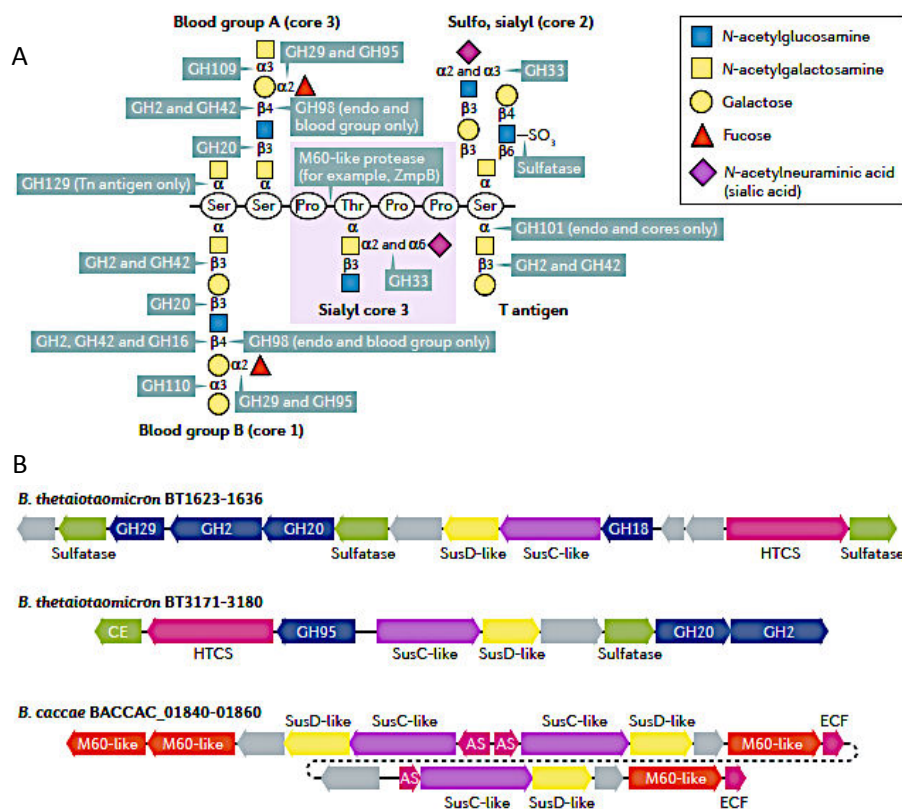


Figure 34. Voies microbiennes impliquées dans le métabolisme du mucus intestinal (d'après Martens *et al.*, 2018). (A) La très grande variété de O-glycanes portés par les mucines constitue une source de nutriments et des sites potentiels d'adhésion pour les bactéries. Les CAZymes produites par le microbiote sont capables de dégrader les O-glycanes. Les liaisons ciblées par différentes glycosylhydrolases, sulfatases et protéases de type M60 sont représentées sur la figure et illustrent la manière dont les bactéries dégradent les mucines. (B) Schéma de l'organisation des PULs (polysaccharide utilization loci) pour 3 groupes de gènes de *Bacteroides* impliqués dans la dégradation des O-glycanes des mucines. Les gènes sont colorés en vert, bleu ou rouge pour distinguer les activités de sulfatases et d'estérases, de protéases ou de glycosylhydrolases respectivement.

La figure 34 illustre certaines familles de CAZymes impliquées dans la dégradation des oligosaccharides portés par les mucines. Par exemple, le clivage de la partie protéique des

mucines par la famille des protéases de type M60 (également connue sous le nom de Pfam 13402) dépend du type de structures glycaniques présentes sur les chaînes latérales (Noach *et al.*, 2017). Les métalloprotéases à Zinc ZmpB de *Clostridium perfringens* vont cliver des glycanes à proximité des résidus de Ser/Thr, avec une préférence pour les glycanes de core 1 ou 3 et sialylés en α 2-3 ou en α 2-6. Au contraire, les protéases BT4244 de *Bacteroides thetaiotaomicron* préfèrent les structures simples de type antigène Tn. Récemment il a été montré que la *trans*-sialidase (RgNanH) de *Ruminococcus gnavus*, une bactérie commensale, était capable de cliver les résidus d'acide sialique sous forme de 2,7 anhydro-Neu5Ac et de les métaboliser ; ce qui lui permet d'adhérer au mucus intestinal (Crost *et al.*, 2016 ; Owen *et al.*, 2017).

Dans l'intestin normal, l'érosion de la couche de mucus du côté de la lumière est due à l'action d'enzymes et au frottement des matières en cours de digestion ; cette érosion doit être compensée par des sécrétions en provenance de la muqueuse pour garantir l'intégrité de la barrière. Les sécrétions de mucus en provenance de tout le tractus gastrointestinal sont des gels de faible viscosité, qui se déplacent lentement et se refusionnent s'ils sont sectionnés.

Comme dans les pathologies respiratoires, de profondes altérations de l'intégrité de la couche de mucus sont observées dans les pathologies intestinales inflammatoires, telles que la maladie de Crohn, dans laquelle l'épaisseur de la couche de mucus peut augmenter, et la colite ulcéreuse où une diminution de l'épaisseur du mucus est observée dans la partie enflammée du tissu (Pullan *et al.*, 1994).

V. L'infection à *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose

1. Présentation de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie gram négative sous forme de bacille appartenant à la famille des Pseudomonadaceae. Elle tient son nom *aeruginosa*, signifiant vert-de-gris en latin, de sa couleur verte caractéristique due à la sécrétion de certains pigments majoritairement vert comme la pyocyanine (bleu-vert) ou la pyoverdine (jaune-vert). C'est une bactérie ubiquitaire saprophyte vivant dans les sols, les milieux humides et à la surface des plantes. Elle se déplace à l'aide d'un flagelle unique et de nombreux pili et mesure en moyenne 2 µm de long et 0,6 µm de diamètre.

Le génome de la souche PAO1 de *P. aeruginosa* d'une taille de 6,3 millions de paires de base a été entièrement séquencé en 2000 et comprend 5570 cadres de lecture dont 8,4% codent pour des protéines impliquées dans des fonctions de régulation et métaboliques (Stover *et al.*, 2000). La comparaison des génomes de souches différentes de *P. aeruginosa* a montré un squelette commun et une partie variable constituée de régions appelées îlots génomiques représentant 10% du génome : le pangénome. Cette grande diversité génétique lui permet une grande capacité d'adaptation dans des environnements nutritifs assez pauvres et à des températures très variables.

Elle peut croître à des températures pouvant aller de 4°C à 42°C mais sa température optimale de croissance est de 37°C. Sa croissance est simple utilisant de nombreuses sources de carbone disponibles. La plupart des espèces utilisent un métabolisme oxydatif et sont aérobies strictes même si elles sont capables d'utiliser l'oxygène libéré par la transformation du nitrate en azote en conditions anaérobies pour se multiplier. Ces bactéries sont capables d'adhérer à des surfaces inertes tel que le plastique ce qui font d'elles des bactéries souvent retrouvées dans les infections suite à une intubation ou à la mise en place d'une prothèse.

C'est une bactérie pathogène opportuniste mais non virulente pour les personnes saines contrairement aux personnes immunodéprimées ou malades chez qui elle est responsable d'infections nosocomiales souvent mortelles.

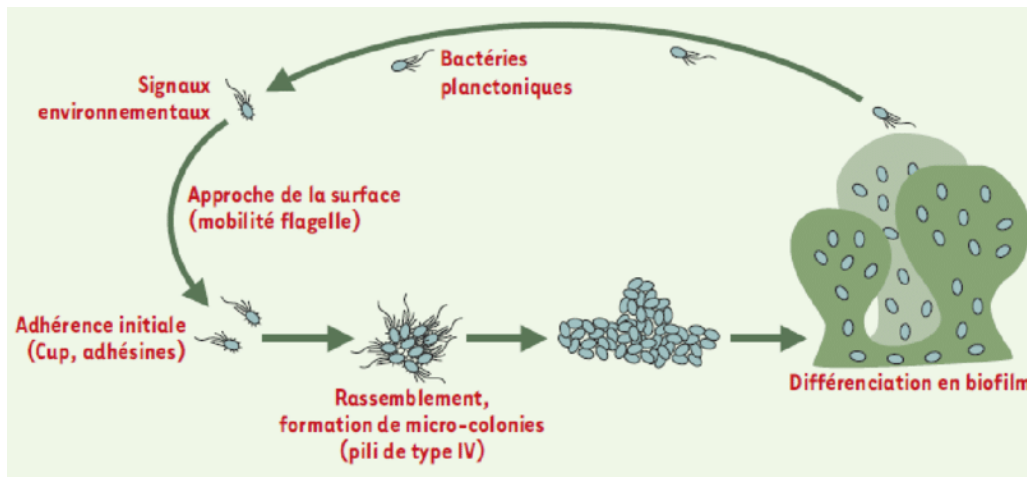


Figure 36 : Etapes de formation d'un biofilm (d'après Filloux et Vallet, 2003)

La formation du biofilm débute par le recrutement de bactéries mobiles vers le site d'attachement. Ceci est possible grâce au flagelle permettant la motilité de la bactérie à l'état planctonique. La bactérie se fixe ensuite à cette surface grâce à l'arsenal d'adhésines dont elle dispose. Vient ensuite l'association, avec d'autres bactéries grâce aux pili de type IV essentiellement. Celle-ci va entraîner la formation du biofilm impliquant la répression du flagelle FliC, du pili pilA, de CupA1 et la sécrétion par les bactéries d'exopolysaccharides, majoritairement de l'alginate pour *P. aeruginosa*. Cette matrice peut représenter jusqu'à 85% du volume total du biofilm (Filloux et Vallet, 2003). Les bactéries proches de la surface et enfouies dans le biofilm sont anaérobies alors que celle de la surface ont un accès plus facile à l'oxygène. Cependant des canaux aqueux présents dans la matrice permettent de véhiculer un minimum d'oxygène et de nutriments aux bactéries les plus profondes (DeBeer *et al.*, 1994). Sous cette forme, *P. aeruginosa* devient plus résistante aux défenses immunitaires et aux traitements antibiotiques.

Il existe 3 types d'exopolysaccharides sécrétés par *P. aeruginosa* : l'alginate, le Pel et le Psl.

- L'alginate

L'alginate est composé de résidus D-mannuronique intercalés de résidus d'acide L-guluronique liés entre eux par des liaisons osidiques de type β 1-4. Les résidus hydroxyle peuvent être O-acétylés au niveau des carbones 2 et 3 faisant de l'alginate une structure variable (Franklin *et al.*, 2011). L'alginate est l'EPS le plus sécrété chez les souches mucoïdes leur permettant de créer un biofilm plus épais et plus résistant face aux traitements

antibiotiques par rapport aux souches non mucoïdes (Hentzer *et al.*, 2001). La synthèse d'alginate est déclenchée principalement dans l'environnement pulmonaire des patients et plus rarement dans d'autres infections comme les infections après brûlures ou dans les voies urinaires (May et Chakrabarty, 1994). La production d'alginate par les bactéries entraîne une diminution de sécrétion d'autres facteurs de virulence telles que l'exotoxine A ou encore l'élastase (Ohman et Chakrabarty, 1982 ; Woods *et al.*, 1991)

Les souches non-mucoïdes ne produisent pas d'alginate mais d'autres EPS leur permettraient tout de même de former un biofilm ; tel est le cas des souches PA14 et PAO1 (Vasseur *et al.*, 2005).

- Les Psl

Le locus Psl (*Polysaccharide Synthesis Locus*) est un locus constitué de 12 gènes dont 11 de ses gènes sont nécessaires pour la synthèse et l'export de Psl. Il se compose essentiellement d'une répétition de pentasaccharose : le D-glucose, le D-mannose et le L-rhamnose (Byrd *et al.*, 2009). Il n'est pas retrouvé, ni exprimé de la même manière chez toutes les souches. Des études ont montré que Psl était indispensable au maintien du biofilm chez la souche PAO1 contrairement à la souche PA14 qui nécessite la production de Pel (Colvin *et al.*, 2012 ; Ghafoor *et al.*, 2011).

- Les Pel

Pel (*Polysaccharide Encoding Locus*) est un exopolysaccharide chargé positivement composé de N-acétylgalactosamine et de N-acétylglucosamine liées entre elles par des liaisons 1-4 (Jennings *et al.*, 2015). Le locus Pel est constitué de 7 gènes codant des protéines impliquées dans les fonctions de synthèse et d'exportation de polysaccharides. Il a été identifié comme étant à l'initiation et responsable du maintien des interactions cellules-cellules dans la formation du biofilm (Colvin *et al.*, 2011 ; Friedman *et al.*, 2004).

Les souches isolées de patients atteints de mucoviscidose sont dans la plupart des cas des souches mucoïdes rugueuses. Une étude récente de Gloag en 2018 a révélé des modifications de la viscosité et de l'élasticité du biofilm formé par ces souches, en fonction du temps. De plus, il a été démontré que dès les stades précoces de la formation du biofilm chez PAO1, Psl dominait, rendant le biofilm plus rigide alors qu'au fil du temps l'expression de Pel augmentait conférant une certaine malléabilité au biofilm (Gloag *et al.*, 2018).

La formation de biofilm par la bactérie lui permet une forte résistance aux antibiotiques d'autant plus que les biofilms formés semblent être différents selon les souches (Gagné-Thivierge *et al.*, 2018).

a-2. Le lipopolysaccharide (LPS)

C'est un composant lipidique majeur de la membrane externe des bactéries gram négatif. Il est ancré à la membrane par sa partie lipidique appelé lipide A et est constitué d'un coeur polysaccharidique et d'une autre partie polysaccharidique antigénique, l'antigène O (Figure 36). Cette dernière est la région la plus variable du LPS. Elle peut même être absente dans certaines souches de *P. aeruginosa* où il existe 20 variants d'antigène O. La partie lipide A est également variable, elle peut être acylée de différentes manières activant ainsi différemment l'immunité de l'hôte par liaison au Toll-like récepteur (TLR).

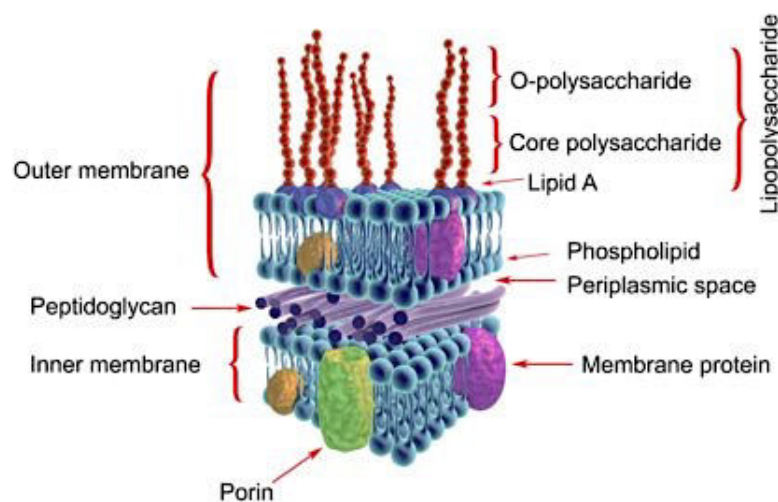


Figure 37 : Schéma de la membrane des bactéries gram négatif

La capacité d'interaction des différentes formes de LPS avec la protéine CFTR joue un rôle fondamental dans la pathogénie de la bactérie chez les personnes atteintes de mucoviscidose. Les LPS entraînent également la production de cytokines en activant la réponse inflammatoire via une interaction avec le TLR4 (Kipnis *et al.*, 2006).

a-3. Le flagelle

Le flagelle est un appendice extracellulaire qui joue un rôle primordial dans l'infection. Il confère à la bactérie la capacité de nager dans un environnement aqueux ou contenant une faible quantité d'agar (<0,4%), on parle de mobilité de type « swimming ». Il permet

également la mobilité de type « swarming » qui consiste au déplacement de la bactérie sur des surfaces semi-solides. Outre son rôle dans la motilité bactérienne, le flagelle est impliqué dans l'adhérence, notamment aux mucines respiratoires humaines (Arora *et al.*, 1998) et dans la virulence bactérienne (Moens et Vanderleyden, 1996). Des mutants Fla de la souche *P. aeruginosa* M2, caractérisée chez un modèle de souris brûlées, ont montré une perte de la virulence chez ce modèle (Montie *et al.*, 1982).

P. aeruginosa est une bactérie monotriche, ce qui signifie qu'elle ne possède qu'un seul flagelle polaire. Ce flagelle est formé de 3 sous-unités : le corps basal ancré dans la membrane jouant le rôle de moteur, le crochet et le filament composés de monomères de protéines FliC et d'une coiffe composée de protéines FliD (Figure 38). Ces 2 parties ont des rôles différents selon les souches, l'adhésion de PAK ne fait intervenir que la coiffe FliD sans implication de FliC contrairement à la souche PAO1 qui utilise la coiffe et la flagelline pour l'adhésion (Scharfman *et al.*, 2001).

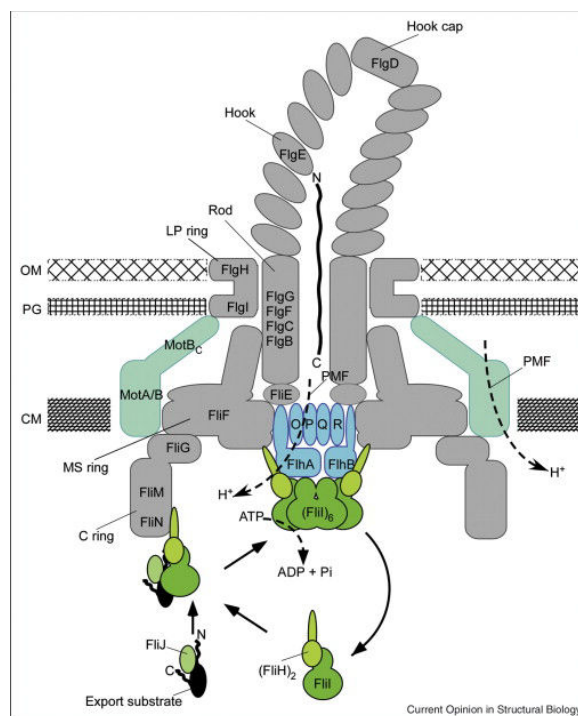


Figure 38 : Structure du flagelle (d'après Minamino, 2008).

D'une longueur allant de 15 à 20µm, plus de 40 gènes sont engagés dans l'expression du flagelle. Ces gènes codent pour des protéines régulatrices, des composants d'assemblage ou encore des protéines impliquées dans la force motrice du flagelle (Dasgupta *et al.*, 2003).

La flagelline de *P. aeruginosa* est classée en 2 types a et b. La masse moléculaire de la flagelline de type a varie de 45 à 52 kDa (Arora *et al.*, 2004) contrairement au type b qui est de 53kDa (Brimer et Montie, 1998). La flagelline de type a est glycosylée sur une sérine en position 189 et sur une thréonine en position 260 et peut comporter jusqu'à 11 monosaccharides attachés par un rhamnose sur le peptide (Shirm *et al.*, 2004). Chez la souche PAK il a été démontré que 14 gènes étaient impliqués dans la glycosylation de cette flagelline de type a (Arora *et al.*, 2001).

La flagelline de type b de PAO1 est également glycosylée sur deux résidus sérine en position 191 et 195. Cette glycosylation est beaucoup moins importante que sur la flagelline de type a et ne fait intervenir que 4 gènes (Verma *et al.*, 2006).

Le flagelle a un rôle important dans la réaction de l'hôte en réponse à l'infection. Il participe à la réponse inflammatoire NFκB-dépendante en activant les TLR2 et 5 et les canaux calciques qui induisent la production d'interleukine IL8 (Adamo *et al.*, 2004). Il active aussi la phagocytose par les cellules de l'immunité innée. Lors d'infections chroniques, *P. aeruginosa* est capable de s'adapter en arrêtant la production de flagelle afin de limiter la réponse de l'hôte (Mahenthiralingam *et al.*, 1994). En conclusion, le flagelle est primordial pour l'établissement de la virulence mais il est rapidement éliminé par la bactérie afin de lui permettre de persister dans l'organisme et d'échapper aux défenses immunitaires.

a-4. Les pili de type IV

Les pili de type IV, appelés aussi fimbriae, sont des appendices filamenteux de surface (Figure 39). Il existe 3 types de pili de type IV (type Iva, type IVb et Tad) retrouvés chez *P. aeruginosa*, le type IVa étant le pili majoritairement exprimé. Tous les pili de type IV sont formés de différents complexes : PilA, PilS2 et Flp sont les sous-unités majeures de la piline ; PilQ, PilN2 et RcpA sont les sécrétines ; PilF et TadD sont des pilotines putatives ; PilB, PilQ2 et TadA sont des ATPases impliquées dans la polymérisation du pilus ; PilT, PilU et PilT2 sont impliquées dans la dépolymérisation des pili.

SST3 ayant une forme d'aiguille présente sur la paroi de *P. aeruginosa* (Hauser, 2009). Ces toxines ont différentes actions, notamment sur le cytosquelette, sur la quantité d'AMPc intracellulaire et sur la dégradation de la membrane plasmique.

Les **élastases** sont des protéases responsables de la destruction des tissus en clivant l'élastine et le collagène. Il existe deux types d'élastase : l'élastase LasA (staphylolysine) et la LasB (pseudolysine). Elles sont synthétisées dans le cytoplasme de la bactérie puis la séquence signal de la préproforme de l'élastase est clivée lors de son passage dans le périplasme. La séparation du propeptide de la protéine mature ne se fait que juste avant la sortie à l'extérieur de celle-ci (Galloway *et al.*, 1991). Elles ont la capacité de moduler les défenses immunitaires de l'hôte rendant la réparation tissulaire difficile (Heck *et al.*, 1990 ; Estrellas *et al.*, 2000).

Les **rhamnolipides** sont des glycolipides considérés comme des facteurs de virulence sécrétés par *P. aeruginosa*. Ils affectent la structure de l'épithélium des voies respiratoires humaines aux premiers stades de l'infection en perturbant les jonctions serrées par intégration aux membranes cellulaires. Ils favorisent ainsi l'invasion paracellulaire de la bactérie (Zulianello *et al.*, 2006). Ils sont également capables d'inhiber la phagocytose et de détruire les macrophages et les leucocytes polymorphonucléaires (Jensen *et al.*, 2007 ; McClure et Schiller, 1996).

Les souches de *P. aeruginosa* sécrètent des pigments leur conférant cette couleur vert émeraude reconnaissable. Ces pigments ne sont pas une coquetterie de la part de la bactérie mais une de ses nombreuses armes de virulence (Lau *et al.*, 2004). Cette **pyocyanine**, métabolite toxique de la phénazine, supprime la réponse inflammatoire aiguë par apoptose des neutrophiles et nécrose des tissus respiratoires (Allen *et al.*, 2005).

P. aeruginosa sécrète également des **phospholipases** de type C (PLC) dont certaines ont une activité hémolytique (PlcN et PlcH) et peuvent jouer un rôle dans la mobilité de type « twitching » (PlcB) (Barker *et al.*, 2004).

3. Altérations du mucus respiratoire dans la mucoviscidose et infections par *Pseudomonas aeruginosa*

Chez le patient mucoviscidosique, le mucus, extrêmement visqueux, diminue l'efficacité du processus de clairance muco-ciliaire et l'adhésion de *P. aeruginosa* au mucus facilite la

colonisation du système respiratoire (Welsh *et al.*, 2001 ; Gibson *et al.*, 2003). De multiples modifications de glycosylation des mucines bronchiques préparées à partir de poumons de patients mucoviscidosiques ont été rapportées. Ainsi, les mucines bronchiques sécrétées par les patients atteints de mucoviscidose sont-elles davantage sulfatées et sialylées que celles d'individus sains (Roussel *et al.*, 1975 ; Boat *et al.*, 1976 ; Lamblin *et al.*, 1977 ; Chace *et al.*, 1983 ; Carnoy *et al.*, 1993 ; Lazatin *et al.*, 1994). Plus spécifiquement, il a été montré que les motifs sialyl-Lewis^x et 6-sulfo-sialyl-Lewis^x étaient surexprimés dans des mucines bronchiques de patients mucoviscidosiques très infectés (Lo-Guidice *et al.*, 1994 ; Davril *et al.*, 1999).

Il a été montré que le niveau d'expression des enzymes core 2/core 4 beta 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase (C2/4GnT) et α 2,3 sialyltransférase IV (ST3Gal IV), indispensables pour la synthèse du sialyl-Lewis^x, était fortement augmenté dans les réactions inflammatoires des poumons de patients CF et que l'exposition des tissus à du TNF α , de l'IL-6 ou de l'IL-8 accroissait la quantité de motifs sialyl-Lewis^x portés par les mucines (Delmotte *et al.*, 2001 ; Delmotte *et al.*, 2002 ; Muhlebach et Noah, 2002 ; Ishibashi *et al.*, 2005 ; Groux-Degroote *et al.*, 2008 ; Colomb *et al.*, 2012).

Par ailleurs, des analyses en cytométrie en flux ont indiqué que la coiffe FliD de *P. aeruginosa* était capable de reconnaître les glycoprotéines portant les motifs Le^x ou sialyl Le^x alors que la flagelline FliC ne reconnaissait que le motif Le^x (Carnoy *et al.*, 1993 ; Carnoy *et al.*, 1994 ; Scharfman *et al.*, 1999 ; Colomb *et al.*, 2014). Dans la mesure où le motif sialyl-Lewis^x est un ligand préférentiel pour *P. aeruginosa* (Xia *et al.*, 2007), ce motif pourrait donc bien favoriser la primo-colonisation et l'infection par ce pathogène.

L'origine de ces altérations de glycosylation des mucines retrouvées dans les poumons de patients CF est à l'heure actuelle encore très controversée. S'il est clairement admis que ces motifs sialyl-Lewis^x peuvent apparaître en réponse à une inflammation, il a également été démontré que la pyocyanine de *P. aeruginosa*, et dans une moindre mesure d'autres facteurs de virulence tels que le LPS, l'alginate et le flagelle de *P. aeruginosa*, étaient capable d'induire l'expression de ces motifs sialylés (Figure 40) (Jeffries *et al.*, 2016).

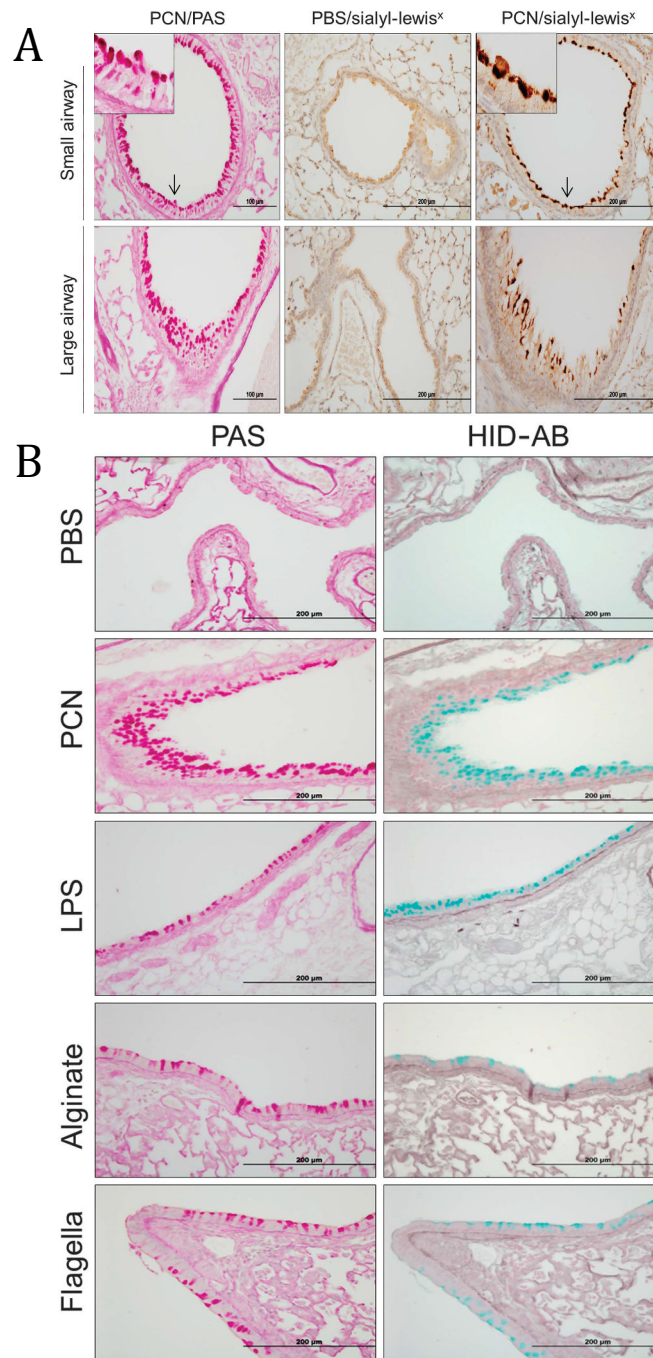


Figure 40. La pyocyanine de *P. aeruginosa* est capable d'induire l'expression de mucines sialylées et de sialyl-Lewis^x (d'après Jeffries *et al.*, 2016). (A) Les analyses immunohistochimiques de coupes de poumons de souris exposées à la pyocyanine ou au PBS montrent une augmentation de l'expression de motifs sialyl-Lewis^x après exposition chronique à la pyocyanine. Les coupes sériées colorées au PAS montrent des cellules en gobelet hyperplasiques et métaplasiques. (B) Les colorations Bleu Alcian/ HID et PAS de coupes de poumons de souris exposées à la pyocyanine, au LPS, à l'alginate et au flagelle purifiés de *P. aeruginosa* montrent une forte augmentation de l'expression des sialomucines dans les poumons de souris exposées aux glycoconjugués bactériens, par comparaison au PBS.

VI. Les modèles animaux d'étude de la mucoviscidose

L'utilisation de modèles animaux est devenue essentielle pour la compréhension de la pathogénèse de la mucoviscidose et pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Sachant que la mucoviscidose est une maladie qui affecte de nombreux organes, il est important d'avoir à disposition des modèles animaux capables de reproduire l'ensemble des manifestations respiratoires et intestinales.

De nombreux modèles ont été développés ayant chacun des avantages mais également des limites (Figure 41). Même si les modèles de souris CF ne présentent pas de phénotype respiratoire similaire à la pathologie humaine, ils sont d'une grande utilité pour la compréhension de la physiopathologie des atteintes intestinales. Les modèles de furets CF et de porcs CF reproduisent l'ensemble des phénotypes observés chez les patients CF ; des manifestations inflammatoires et infectieuses dans les poumons à la formation d'un iléus méconial *in utero* et au développement du diabète associé à la mucoviscidose. Cependant ce sont des modèles très coûteux à entretenir.

Troubles	Homme	Porc	Furet	Lapin	Rat	Souris
Infection spontanée des poumons	✓	✓	✓	?	X	X
Retard de croissance	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Intestinaux	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Pancréatiques (fonction exocrine)	✓	✓	✓	?	X	X
Pancréatiques (fonction endocrine)	✓	✓	✓	?	?	X
Hépatiques	✓	✓	✓	?	?	X
Au niveau de la vésicule biliaire	✓	✓	✓	?	NA	X

Figure 41. Organes affectés dans différents modèles animaux KO pour le CFTR (d'après Rosen *et al.*, 2018). Les points d'interrogation indiquent que le phénotype n'a pas encore été déterminé dans l'organe en question ; les croix indiquent l'absence de phénotype. NA : non applicable au rat qui ne possède pas de vésicule biliaire.

1. Le modèle de souris CF

Le modèle murin CF « knock-out » a été le premier à être développé et ce, dès 1992 (Clark *et al.*, 1992 ; Snouwaert *et al.*, 1992). Depuis, au moins 15 modèles de souris CF ont été rapportés, avec des souris dont la modification génétique entraîne soit une absence d'expression de CFTR soit l'expression d'un CFTR muté comme par exemple les souris homozygotes pour $\Delta F508$ ou G551D (Wilke *et al.*, 2011). Ces souris présentent un iléus méconial, une obstruction des canaux biliaires, une stérilité et un phénotype intestinal très similaire à celui des patients CF. Les lésions pancréatiques chez le modèle murin sont quasiment inexistantes (Davidson et Rolfe, 2001). Cependant, ces souris dépassent rarement quelques semaines d'espérance de vie ; l'atteinte digestive est souvent fatale du fait d'obstruction intestinale précoce.

Les premiers travaux de caractérisation des modèles de souris CF avaient conclu à une absence de phénotype respiratoire (Snouwaert *et al.*, 1992) mais des études plus récentes ont permis de démontrer que les souris CF présentaient des atteintes pulmonaires, même si elles ne sont pas aussi sévères que chez l'homme (Craig Cohen *et al.*, 2004 ; Darrah *et al.*, 2013 ; Darrah *et al.*, 2016). Les poumons des souris CF subissent des remodelages morphologiques en cas d'expositions répétées à des molécules pro-inflammatoires et acquièrent spontanément des infections pulmonaires à *Bordetella* par exemple (Bruscia *et al.*, 2016 ; Darrah *et al.*, 2017). Mais ces souris ne présentent pas d'infections respiratoires chroniques, de bouchons de mucus ou encore de bronchiectasies. L'absence de lésions pulmonaires sévères peut s'expliquer au moins partiellement par le fait que les cellules épithéliales pulmonaires de la souris sont différentes des cellules humaines, avec plus de 50% de cellules de Clara, une faible proportion de glandes sous muqueuses et moins de cellules ciliées (Pack *et al.*, 1981 ; Grubb et Boucher, 1999). De plus, l'absence d'activité du canal CFTR semble être partiellement corrigée par la surexpression de canaux CACC (calcium-activated chloride channel) qui régulent le transport des ions Cl⁻ (Grubb *et al.*, 1994).

Le phénotype observé dans la trachée et les voies aériennes supérieures des souris CF se rapproche de celui des patients CF avec une hyperplasie des cellules à gobelet, des glandes sous-muqueuses hyperplasiques, un volume de liquide périciliaire réduit et une clairance muco-ciliaire moins efficace (Kent *et al.*, 1996 ; Tarran *et al.*, 2001 ; Bonvin *et al.*, 2008).

Les modèles de souris CF s'avèrent pertinents pour étudier les susceptibilités à l'infection par différents pathogènes fréquemment retrouvés dans les poumons des patients CF. Par exemple, les souris CF infectées de façon chronique par *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* ou *B. cenocepacia* ont été très utiles pour investiguer les mécanismes d'interactions hôte-pathogène dans la mucoviscidose (Cigana *et al.*, 2016 ; Bragonzi *et al.*, 2017).

2. Le modèle de rat CF

Tout comme la souris, le modèle de rat présente le double avantage d'une gestation courte et de coûts réduits en animalerie. Contrairement aux souris, les rats possèdent de très nombreuses glandes sous-muqueuses réparties aussi bien dans la trachée que dans les poumons, comme chez l'homme. La trachée des rats CF se développe de façon anormale avec des anneaux de cartilage fragilisés et une surface de glandes réduite. Le volume du liquide périciliaire est diminué, le pH de surface est hyperacide, de façon similaire à ce qui est observé chez l'homme (Tuggle *et al.*, 2014 ; Birket *et al.*, 2016).

Cependant le modèle de rats CF ne semble pas être un bon modèle pour caractériser les étapes d'initiation et les premières altérations biochimiques du mucus CF. Le transport muco-ciliaire ne semble pas affecté chez les jeunes rats. Il faut attendre 6 mois pour observer cette déficience muco-ciliaire ainsi que la formation de bouchons de mucus (Tuggle *et al.*, 2014 ; Birket *et al.*, 2018). L'infection et l'inflammation spontanées ne sont pas non plus retrouvées chez les rats CF, même si les rats CF sont moins efficaces dans la lutte contre l'infection induite à *P. aeruginosa* (Birket *et al.*, 2015).

3. Le modèle de furet CF

Les cellules pulmonaires de furet présentent de très fortes homologues en terme de biologie et d'anatomie avec l'homme. C'est pourquoi le furet est très utilisé pour étudier les mécanismes d'infections pulmonaires telles que le virus de la grippe ou le syndrome respiratoire aigu sévère (Darnell *et al.*, 2007 ; Krammer *et al.*, 2014). Les furets possèdent comme l'homme de très nombreuses glandes sous-muqueuses réparties dans la trachée et les bronches et exprimant fortement la protéine CFTR ainsi que de nombreuses cellules à gobelet (Robinson *et al.*, 1986 ; Engelhardt *et al.*, 1992 ; Sehgal *et al.*, 1996).

Le modèle de furet CF a été développé par Engelhardt et son équipe (Keiser et Engelhardt, 2011). Les furets CF nouveaux-nés présentent une atteinte digestive similaire à celle qui est observée chez les patients CF, des lésions pancréatiques et hépatiques, une malnutrition, ainsi qu'une forte prévalence d'iléus méconial (75%) souvent fatal. Pour que le modèle soit viable, un modèle transgénique corrigé au niveau intestinal a été développé afin d'éviter tout risque de décès prématuré dû à une occlusion intestinale (Sun *et al.*, 2010).

Les furets CF présentent un phénotype respiratoire sévère, qui peut être hétérogène selon les individus. Les bouchons de mucus sont observés dans les voies aériennes inférieures et supérieures. La dilatation des glandes sous-muqueuses et des canaux glandulaires, l'hyperplasie des cellules à gobelet, la présence de cellules inflammatoires et la colonisation du mucus par des bactéries pathogènes sont retrouvées chez tous les furets CF. La clairance muco-ciliaire est très affectée chez les furets CF. De plus, les furets CF présentent une très forte susceptibilité à l'infection qui nécessite de les traiter par antibiotiques dès la naissance pour garantir leur survie. Les furets CF sont un des rares modèles à exhiber une infection pulmonaire spontanée, facteur crucial dans la pathogénèse pulmonaire de la mucoviscidose. Cependant les manifestations cliniques sont très rapides et sévères, contrairement à la progression plus lente observée dans les infections chroniques humaines.

4. Le modèle de porc CF

Les caractéristiques anatomiques, physiologiques, biochimiques et génétiques du porc sont comparables à l'homme et font de lui un modèle animal intéressant. Il est utilisé depuis quelques années pour la recherche biomédicale pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la taille des organes du porc tels que le cœur, les reins ou encore le foie est quasi similaire à la taille des organes humains. Le porc est utilisé en médecine pour l'apprentissage des points de suture car la texture de leur peau est semblable à celle de la peau humaine. Son anatomie cardio-vasculaire, son fonctionnement rénal, son système urinaire sont reconnus pour être similaire à l'homme et font de lui un modèle de choix pour plusieurs sujets de recherche.

En ce qui concerne l'appareil respiratoire du porc, la distribution des glandes sous-muqueuses dans les voies respiratoires est très semblable à celle de l'homme, de même que la présence de cellules ciliées et de cellules à gobelets au niveau de l'épithélium respiratoire. La protéine CFTR est quant à elle fortement exprimée au niveau des cellules ciliées et des cellules à gobelets constituant l'épithélium nasal, trachéal et bronchique contrairement aux glandes

sous-muqueuses où le transcrit est présent mais pas la protéine (Plog *et al.*, 2010). Dans le tractus intestinal et le pancréas du porc la protéine CFTR est également détectée, ce qui expliquerait la présence chez les porcelets CF, comme chez les nourrissons CF, d'une insuffisance hépatique et d'un iléus méconial (Plog *et al.*, 2010).

Plusieurs modèles de porcs CF ont été développés par une équipe américaine au cours de cette dernière décennie, conduisant à une absence d'expression de CFTR ou à un CFTR muté ($\Delta F508$) (Rogers *et al.*, 2008 ; Ostedgaard *et al.*, 2011). Plus récemment l'équipe de Nicolai Klymiuk a développé un autre modèle de porcelets CF en utilisant une approche alternative impliquant le ciblage de CFTR par un vecteur de clonage « Bacterial Artificial Chromosome » (BAC) modifié (Figure 42). C'est ce modèle que nous avons caractérisé au cours de la thèse.

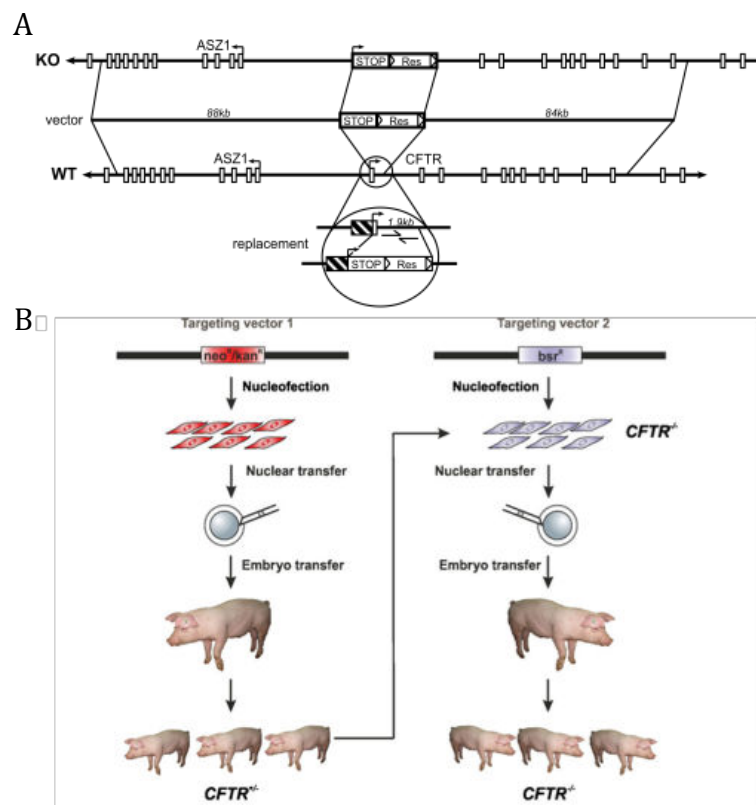


Figure 42. Développement et caractérisation moléculaire des porcs knock-out CFTR. (A) Remplacement de la séquence CFTR dans l'exon 1 par un codon STOP. (B) Production de porc CF par ciblage séquentiel (d'après Klymiuk *et al.*, 2012).

Tous les porcs CF nouveaux-nés présentent un iléus méconial qui nécessite le recours à la chirurgie quelques heures à peine après la naissance pour garantir leur survie. Les porcs CF présentent également une insuffisance pancréatique et un phénotype intestinal sévère

nécessitant des suppléments vitaminés pour prévenir la malnutrition, des laxatifs pour prévenir l'obstruction intestinale et des inhibiteurs de pompes à proton pour contrôler l'acidité gastrique (Ostedgaard *et al.*, 2011).

Les porcs CF développent spontanément toutes les atteintes respiratoires observées chez les patients CF, à savoir l'inflammation, l'infection, le remodelage du tissu pulmonaire, l'accumulation de mucus et l'obstruction des bronches (Stoltz *et al.*, 2010). Les porcelets CF n'arrivent pas à éradiquer aussi efficacement que les WT les bactéries pathogènes telles que *S. aureus* et ceci serait dû à une diminution du pH de surface corrélée à une diminution des défenses antimicrobiennes de l'ASL (Stoltz *et al.*, 2010; Pezzulo *et al.*, 2012). La clairance muco-ciliaire est affectée dès la naissance même si le volume du liquide périciliaire n'est pas diminué (Hoegger *et al.*, 2014b).

En conclusion, le modèle de porc CF semble très prometteur pour explorer les mécanismes à l'origine des processus inflammatoires et infectieux des poumons CF et pour évaluer l'efficacité de nouveaux traitements tels que des modulateurs de CFTR.

CHAPITRE

Matériels et méthodes

I. Matériel biologique

1. Le modèle de porcelets CF

Les expériences ont été menées conformément aux directives du Comité institutionnel de protection et d'utilisation des animaux de l'INRA. Le protocole a été approuvé par le ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche (n°1166-2015071615392426).

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé comme modèle animal d'étude de la mucoviscidose le modèle européen de porcelets KO pour le gène CFTR, développé par Klymiuk *et al.* Des verrats et truies hétérozygotes CFTR^{+/-} ont été fournis par l'équipe de Klymiuk et envoyés à l'INRA de Nouzilly. C'est l'équipe du docteur Caballero-Posadas à l'INRA de Nouzilly qui s'est ensuite chargée d'entretenir le modèle.

Des verrats et truies hétérozygotes CFTR^{+/-} ont été croisés pour générer des porcelets CFTR^{+/+}, CFTR^{+/-} et CFTR^{-/-}. Dès la naissance, les portées ont été analysées par PCR multiplex pour en déterminer le génotype. Les porcelets ont tous été sacrifiés dans les 12 heures suivant la naissance. Les porcelets nouveau-nés non infectés ont été sacrifiés par électronarcose puis exsanguinés. Les porcelets nouveau-nés infectés par *P. aeruginosa* ont été sacrifiés par une overdose de pentobarbital administré en intraveineuse (Dolethal, Vétquinol, France) puis exsanguinés avant le prélèvement d'échantillons.

Des échantillons des poumons, trachées, côlons, iléons et lavages broncho-alvéolaires ont été prélevés pour les analyses ultérieures. Une partie des tissus a été directement congelée dans l'azote liquide et conservée à -80°C pour l'analyse des ARN et des protéines. Une autre partie des tissus a été fixée dans une solution de Carnoy pour les analyses immunohistochimiques et histologiques. Les lavages broncho-alvéolaires ont été réalisés en instillant et en ré-aspirant

deux fois 15 ml de PBS stérile avec une sonde œsophagienne insérée par intubation trachéale dans les poumons excisés.

2. Développement d'un modèle 3D de culture primaire de cellules épithéliales bronchiques de porcelets nouveau-nés CF et WT

Les cellules épithéliales ont été disséquées à partir des bronches par digestion enzymatique (0,1% de mélange de protéases et 0,01% de désoxyribonucléase I) pendant 24h à 4°C. La digestion enzymatique a été stoppée par l'addition d'un volume de 10% de sérum fœtal bovin et les cellules ont été récupérées etensemencées sur des membranes semi-perméables de 0,4µm (Greiner bio-one) traitées au collagène de type 1. Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence dans le milieu DMEM/F12 supplémenté avec du SupplementMix (PromoCell C-39165), de la glutamine (2mM) et de la pénicilline/streptomycine (100U/µg/ml) puis cultivées en interface air-liquide (ALI). La différenciation de l'épithélium a été évaluée par mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) et par la présence de cils et de cellules à gobelets en utilisant les anticorps anti-β-Tubuline-Cy3 (Sigma, clone TUB 2.1) et anti-MUC5AC (Sigma, clone 45M1). Les jonctions serrées ont été colorées avec un anticorps monoclonal purifié anti-ZO-1 (BD Biosciences, Rungis, France). Un anticorps anti-cytokératine (DAKO, clone AE1/AE M3515) a été utilisé pour vérifier si l'épithélium n'était pas contaminé par d'autres cellules d'origine différente.

3. Culture d'explants bronchiques de porcelets nouveau-nés CF et WT

Des porcelets nouveau-nés ont été sacrifiés à la naissance pour recueillir les explants trachéaux. Les voies aériennes ont été extraites et transportées au laboratoire, immergées dans un tampon froid de Krebs-glucose (NaCl 116 mM, CaCl₂ 1,3 mM, KCl 3,6 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, NaHCO₃ 23 mM et MgSO₄ 1,2 mM, D-glucose 10 mM, 5,7 mM de pyruvate, 5,1 mM de glutamate, pH 7,4) dans les 2h suivant le sacrifice. Tous les tissus conjonctifs et pulmonaires ont été enlevés.

II. Infections à *Pseudomonas aeruginosa*

1. Infections expérimentales à *Pseudomonas aeruginosa in vivo*

Les porcelets ont été anesthésiés avec du Vetflurane®. La trachée de chaque porc a été intubée et ventilée avec un Ventilateur Fabius® Tiro® (Dräger, Telford, USA). Les paramètres du ventilateur étaient les suivants: en mode volume contrôlé, volume courant = 8-10 ml/kg, pression expiratoire positive = 5 cmH₂O, fréquence respiratoire = 15 respiration/min, rapport inspiratoire/expiratoire = 0,5, 50% d'oxygène. La carène des porcelets a été inoculée avec 2 ml de suspension lumineuse de la souche PAKlux de *P. aeruginosa* (5×10^6 cfu/ml) en utilisant une sonde œsophagienne. Les porcelets ont été ventilés mécaniquement et sacrifiés 6 heures après l'infection.

2. Suivi de la colonisation des tissus par *Pseudomonas aeruginosa ex vivo*

Les poumons ont été prélevés et immédiatement imagés par un IVIS Spectrum (PerkinElmer, Waltham MA). Les côtés antérieurs et postérieurs des poumons ont été exposés à la caméra, et des images bioluminescentes ont été capturées. Une coupe sagittale de la tête a été réalisée pour exposer les deux moitiés. Les régions d'intérêt ont été placées sur un imageur bioluminescent 2D pour intégrer les signaux lumineux et l'analyse a été réalisée en utilisant le logiciel d'analyse Living Image 4.3.1.

3. Evaluation de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* sur culture primaire de cellules épithéliales bronchiques CF et WT

Des cellules épithéliales bronchiques provenant de 3 porcelets CFTR^{-/-} et 3 CFTR^{+/+} ont été cultivées à l'interface air-liquide et incubées avec la souche PAKlux de *P. aeruginosa* (MOI=0,1) pendant 6h à 37°C, dans la station d'imagerie IVIS Spectrum (PerkinElmer, Waltham MA). La croissance de *P. aeruginosa* sur cellules bronchiques différenciées CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} a été déterminée en mesurant l'intensité du signal bioluminescent provenant de la souche PAKlux. La bioluminescence a été capturée toutes les 15 min avec des temps d'intégration allant de quelques secondes à 5 min en fonction de l'intensité des signaux. Les régions d'intérêt (ROIs) ont été placées sur l'image bioluminescente 2D pour englober les signaux lumineux. L'analyse a été réalisée en utilisant le logiciel d'analyse Living Image 4.3.1. Pour analyser les différences de croissance de *P. aeruginosa* sur cellules

CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}, les courbes ont été ajustées à l'aide d'un modèle de croissance exponentielle non linéaire (Graphpad Prism 5.0) en utilisant le test F de la somme des carrés.

III. Analyse de la O-glycosylation des mucines

1. Extraction et purification des mucines

Les différents tissus et le méconium ont été incubés dans un tampon d'extraction contenant du chlorure de guanidine 4M et des inhibiteurs de protéases (EDTA 5 mM, benzamidine 10 mM, N-éthylmaléimide 5mM, soy bean trypsin inhibitor 0.1mg/ml, PMSF 1 mM, dithiothréitol 10 mM, azide de sodium 0.02%) durant une nuit. La densité du tampon a ensuite été ajustée à 1,4 g/ml par ajout de chlorure de césium. Les échantillons ont été transférés dans des tubes Quick seal polyallomer de 13 ml (Beckman Coulter) qui sont scellés par chauffage. L'ultracentrifugation a été réalisée à 308 400 g pendant 48 à 72 heures à température ambiante avec un rotor 70.1 Ti (Optima XE-90 ultracentrifuge, Beckman Coulter, Fullerton, California).

La récupération des fractions a été faite à l'aide d'un collecteur et d'une pompe péristaltique réglée à un débit de 500 µl/min. La densité de chaque fraction a été mesurée par pesée, les tubes contenant les mucines ayant une densité comprise entre 1,35 et 1,45 g/ml.

2. Détection des mucines

Vingt microlitres de chaque fraction ont été déposés sur membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil à slot-blot (BIO DOT SF, Biorad). La membrane a ensuite été colorée par une coloration au Periodic Acid Schiff (PAS) permettant de colorer les glycoprotéines neutres en rose/magenta. L'oxydation a été réalisée en incubant la membrane dans une solution d'acide periodique à 1% dans 3% d'acide acétique pendant 5 minutes, suivie de 3 lavages dans l'eau distillée durant 3 minutes. La membrane a ensuite été incubée dans du réactif de Schiff pendant 15 minutes puis elle a été décolorée pendant 10 minutes dans une solution de metabisulfite de sodium 0,1% dans de l'HCl 0,1mM. Les fractions répondant positivement à cette coloration ont alors été dialysées contre de l'eau durant 3 jours avec un changement de bain 2 fois par jour, dans des boudins de dialyse avec un seuil de 14 000 Daltons (MWCO : 14 000) puis les échantillons ont été congelés et lyophilisés.

3. Libération chimique des oligosaccharides par β -élimination en milieu réducteur

Les mucines purifiées ont été incubées au bain-marie à 45°C durant 20h dans une solution de NaOH 0,1M contenant du borohydrure de sodium (NaBH_4) 1M. La réaction de β -élimination a été stoppée, à 4°C, par l'ajout d'une résine échangeuse de cations (Dowex 50x8, 20-50 mesh, forme H^+) jusqu'à l'arrêt de dégagement gazeux. L'échantillon a ensuite été filtré puis évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Buchi à 45°C. Cette évaporation a été suivie par des co-évaporations au méthanol permettant d'éliminer les sels de borate formés. Les glycanes sont, à cette étape, sous forme d'oligosaccharide-alditols.

L'échantillon a ensuite été repris dans de l'eau milliQ et passé au travers d'une colonne échangeuse de cations (Dowex 50x2, 200-400 mesh, forme H^+). Les oligosaccharides ont été élués avec de l'eau milliQ alors que les peptides restent piégés sur la résine. L'échantillon a été concentré par évaporation et repris par 3 ml d'eau milliQ, congelé et lyophilisé.

4. Perméthylation des oligosaccharides

Les oligosaccharides-alditols ont été repris dans une solution contenant 200 μl de diméthylsulfoxyde (DMSO), 1g de NaOH en poudre et 300 μl de iodométhane (ICH_3). Les tubes ont été mis sous argon pour respecter les conditions anhydres et mis sous agitation durant 2h. La réaction a été arrêtée par ajout de 1 ml d'acide acétique 5%. Les sucres perméthylés ont été purifiés sur colonne Oasis HLB® (Waters, Milford, MA), préalablement activée avec du méthanol 100% et équilibrée avec de l'eau milliQ. Après passage de l'échantillon sur la colonne, celle-ci a été rincée avec une solution d'eau/méthanol (95/5) puis les O-glycanes perméthylés ont été élués par du méthanol 100%. Les échantillons ont été séchés sous un flux d'azote jusqu'à complète évaporation.

5. Analyse des O-glycanes par spectrométrie de masse

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées sur un spectromètre de masse de géométrie MALDI-TOF-TOF de type Analyzer 4800 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, Canada) à ionisation par désorption laser en mode positif $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Les échantillons ont été dissous dans un solvant méthanol/eau (50:50, v/v) à différentes dilutions et déposés sur une cible MALDI en addition avec une matrice DHB (acide 2,5-dihydroxybenzoïque) à une dilution volume/volume. La puissance du laser appliquée sur la cible est de 2500 V. La quantification du pourcentage relatif de chaque oligosaccharide a été calculée sur la base de

l'intégration des pics sur les spectres MS. Pour chaque structure d'intérêt, l'intensité de 10 pics d'expériences indépendantes a été mesurée. La moyenne de ces intensités a été calculée.

IV. Analyses histologiques et immunohistochimiques

1. Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE)

Les coupes de 4µm de tissus fixées en paraffine provenant de poumons, trachées, côlons et iléons de porcelets CFTR^{-/-} ou WT, infectés ou non par *P. aeruginosa*, ont été déparaffinées dans des bains successifs de toluène (20 min), d'éthanol 100 % (5 min), d'éthanol 95 % (5 min) et d'eau (5 min). Les lames ont été recouvertes d'hématoxyline de Harris pendant 4 minutes puis rincées avec de l'eau distillée pendant 5 minutes. Elles ont ensuite été plongées dans un bain d'éosine pendant 1 min puis dans cinq bains successifs d'éthanol à 70% et 10 bains successifs d'éthanol à 85%. Les lames ont alors été immergées dans un bain d'éthanol 100% pendant 2 minutes puis lavées dans deux bains successifs de xylène pendant 2 minutes chacun. Elles ont été finalisées en déposant 10µl de Mowiol sur les tissus puis les lamelles. Les coupes ont été examinées sous un microscope optique (Leica). Les images ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ.

2. Immunohistochimie des mucines MUC2, MUC5AC et MUC5B

Les tissus ont été déparaffinés et réhydratés dans des bains successifs de toluène durant 20 minutes, suivis d'éthanol 100% pendant 5 minutes, d'éthanol 95% 5 minutes et enfin 5 minutes dans l'eau du robinet. Les sites antigéniques ont ensuite été démasqués par un traitement citrate pH6 0,1M à 95°C durant 20 min. L'étape de saturation a été réalisée en incubant pendant 45 min les coupes dans une solution de gélatine de poisson à 1,2% dans du PBS. Le tissu a ensuite été incubé à 4°C durant une nuit avec les anticorps primaires anti-MUC2 (1:100; sc15334; H-300), anti-MUC5AC (1:150; clone 45M1) et anti-MUC5B (1:150 ; Santa Cruz Biotechnology) dilués dans la solution de saturation. Les lames ont ensuite été rincées dans une solution de PBS-tween 20 0,1% et incubées avec les anticorps secondaires Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (H+L ; 1:1000 ; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (H+L ; 1:1000 ; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1h à l'obscurité. Après plusieurs rinçages dans le PBS-Tween 20 0,1%, la lame est montée

avec du Mowiol et examinée sous un microscope confocal (Zeiss LSM 510). La coloration des noyaux a été réalisée avant le montage avec une solution de DAPI pendant 30 secondes.

3. Immunohistochimie avec les lectines SNA, UEA-1 et jacaline

Le même protocole que celui suivi pour le marquage des mucines MUC2, MUC5AC et MUC5B a été effectué pour marquer les coupes de tissus avec les lectines couplées à la fluorescéine Sambucus Nigra (SNA ; 1:80 ; FL-1301), Ulex Europaeus (UEA1 ; 1 :80; L9006 ; Sigma Aldrich) et la jacaline (1:3500 ; FL-1151 ; Clinisciences).

4. Coloration des mucines par PAS-Bleu Alcian

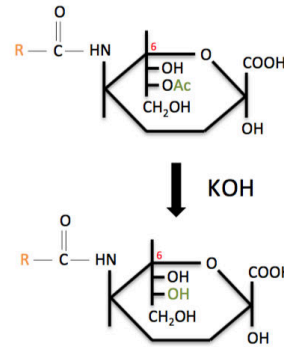
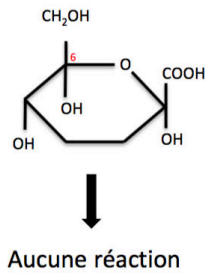
Cette coloration a été faite en réalisant au préalable une oxydation ménagée des acides sialiques (Gilks *et al.* 1988).

Après déparaffinage, les lames ont été rincées dans une solution d'éthanol à 70% (v/v). Une réaction de saponification a été effectuée sur ces lames en les incubant dans une solution d'hydroxyde de potassium 0,5% (w/v) dans 70% d'éthanol durant 15 minutes. Après rinçage à l'eau du robinet durant 10 minutes les lames ont été refroidies à 4°C et oxydées 1h avec une solution froide de 0,4mM d'acide periodique dans 1M d'HCl. Elles ont ensuite été rincées dans l'eau du robinet durant 10 minutes. Les lames ont été traitées avec une solution contenant 0,1% de borohydrure de sodium dans 1% de phosphate de sodium dibasique durant 20 minutes à température ambiante. Après rinçage pendant 10 minutes dans l'eau du robinet, les lames ont été colorées dans une solution de 0,3% d'Alcian blue (8GX) et 3% d'acide acétique pH 2,5 pendant 20 minutes à température ambiante. Les lames ont de nouveau été rincées 10 minutes à l'eau du robinet avant d'être oxydées 1h avec une solution d'acide periodique 1% (v/w) à température ambiante. Elles ont ensuite été rincées 10 min à l'eau du robinet avant d'être colorées avec une solution de réactif de Schiff 10-15 minutes, rincées à l'eau du robinet 10 minutes et montées entre lame et lamelles au Mowiol®. Les étapes des différentes réactions sont décrites dans la figure 43.

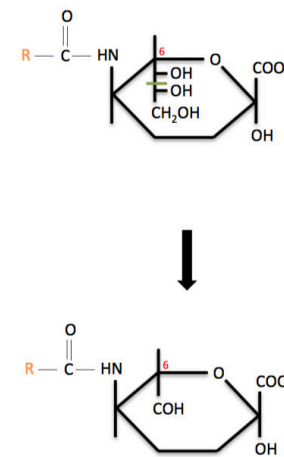
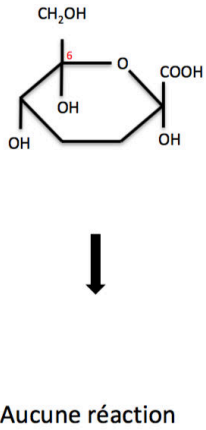
Sucres neutres

Sucres sialylés

1) Saponification

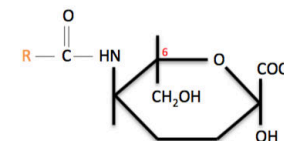


2) Oxydation périodique ménagée



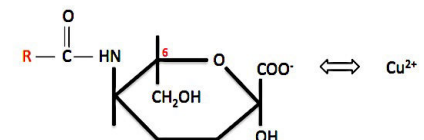
3) Bêta-élimination

Aucune réaction

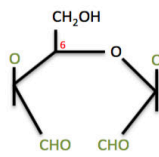


4) Coloration bleu alcian

Aucune réaction

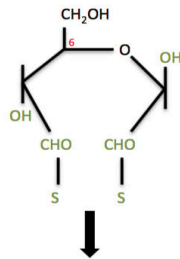


5) Oxydation périodique



Aucune réaction

6) Coloration Periodic Acid Schiff



Aucune réaction

Coloration Magenta

Figure 43. Etapes de la coloration PAS/BA avec oxydation ménagée des acides sialiques

5. Coloration des mucines par High Iron Diamin (HID)-Bleu Alcian

Une solution de 50 ml contenant 120 mg de N,N diméthyl-méta-phénylènediamine-dihydrochloride et de 20 mg de N,N diméthyl-para-phénylènediamine-dihydrochloride a été préparée et 1,4 ml d'une solution de fer à 30%, préalablement filtrée sur filtre de 0,22µm, a été ajoutée extemporanément.

Les lames ont été déparaffinées, rincées à l'eau désionisée puis incubées avec cette solution durant 16h. Les lames ont ensuite été rincées à l'eau du robinet et incubées dans une solution de bleu alcian/acide acétique pH2 durant 30 minutes. Les lames ont été rincées à l'eau du robinet puis montées entre lame et lamelle.

V. Analyse de l'inflammation des tissus

L'état d'inflammation des trachées et des poumons de porcelets à la naissance a été évalué en combinant la quantification de l'expression de gènes pro- et anti-inflammatoires par qPCR, l'évaluation du niveau d'expression des cytokines et des chimiokines dans les BAL par ELISA ainsi que la coloration HE des coupes des tissus.

1. Extraction d'ARNs, synthèse d'ADNc et analyse par PCR quantitative

La technique de RT-qPCR a été utilisée pour mesurer l'expression des gènes TLR2, TLR4, TLR5, NFκB1, NFκBIA, IL-8 et IL-10 de porcelets infectés et non infectés CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+}. Les ARN totaux des cellules provenant de l'épithélium de la carène trachéale ont été isolés en utilisant le kit Nucleospin® RNA (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon le protocole du fabricant. L'ADNc du premier brin a été synthétisé en utilisant le Supermix iSCRIPT™ (Bio-Rad). La qualité et l'intégrité de l'ARN ont été évaluées en calculant le ratio OD260/OD280 sur un spectrophotomètre NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) et par électrophorèse capillaire (Bioanalyzer Agilent 2100, Agilent Technologies, Inc., Santa-Clara, USA). La reverse-transcription a été réalisée à partir d'1µg d'ARN en présence d'un ratio 1:1 d'oligo-dT et d'amorces hexamériques aléatoires grâce au kit AffinityScript™ qPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene, Santa Clara, USA) dans un volume final de 20µl.

Tableau 6. Séquences des amorces, température d'hybridation des amorces (°C), tailles de fragments de PCR attendues (pb) et numéro d'accession dans PubMed. Les gènes de ménage utilisés dans cette étude sont soulignés.

GENE	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Ann. Temp (°C)	Length (bp)	Accession n°
TLR2	ACGGACTGTGGTGCATGAAG	GGACACGAAAGCGTCATAGC	62	101	NM_213761.1
TLR4	TGTGCGTGTGAACACCAGAC	AGGTGGCGTTCCTGAAACTC	62	136	NM_001293316.1
TLR5	CCTTCCTGCTTCTTGATGG	CTGTGACCGTCCTGATGTAG	61	124	NM_001123202.1
NFKB1	CGTGTCTGCTGCTGCTGATG	CCGCCAAGGAGATGTTGTCG	62	111	NM_001048232.1
NFKBIA	TGGCTACCTGGGCATTGTG	TAGCCCTGGTAGGTGACTCTG	60	174	NM_001005150.1
IL-8	TCCTGCTTCTGCAGCTCTC	GGGTGGAAAGGTGTGGAATG	62	100	NM_213867.1
IL-10	GGTTGCCAAGCCTTGTCAG	AGGCACTCTTACCTCCTC	60	202	NM_214041.1
B2M	CAAGATAGTTAAGTGGGATCGAGAC	TGGTAACATCAATACGATTTCTGA	58	161	NM_213978.1
RPL19	AACTCCCGTCAGCAGATCC	AGTACCCTCCGCTTACCG	60	147	XM_003131509.4
HMBS	AGGATGGGCAACTCTACCTG	GATGGTGGCCTGCATAGTCT	58	83	NM_001097412.1

La RT-qPCR a été effectuée sur un appareil LightCycler® 480 II (Roche) en utilisant le mélange iTaq Universal SYBR Green (Bio-Rad). Les séquences d'amorces, la température d'hybridation et la longueur des amplicons sont décrites dans le tableau 6. Les conditions du cycle étaient de 95°C pendant 5 min, suivies de 38 cycles avec une étape de dénaturation à

95°C pendant 15s et l'élongation pendant 45s. Chaque réaction a été effectuée en triple. Les données quantitatives de RT-PCR ont été analysées en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$, où la quantité de la zone ciblée, normalisée à 3 gènes de référence endogènes et relative à un contrôle expérimental, est donnée par $2^{-\Delta\Delta t}$.

2. Détermination du niveau d'expression des cytokines et des chimiokines dans les BAL

Le facteur de nécrose tumorale TNF- α , les interleukines IL-6, IL-8 et IL-10 ont été analysés dans le surnageant des BAL en utilisant des kits spécifiques ELISA Pig (Abcam®, Paris, France) selon les instructions du fabricant.

VI. Analyse du transcriptome pulmonaire des porcelets nouveau-nés

Quatre groupes d'animaux ont été analysés au niveau de l'ARNm. L'ARN total a été extrait à partir de 9 carènes trachéales de porcelets CFTR^{+/+} et 10 CFTR^{-/-}, en utilisant des colonnes d'ARN (miRNeasy, Qiagen). Le plan expérimental a été choisi pour équilibrer le sexe, l'infection et le génotype dans des groupes comparables. Il y avait deux femelles et trois mâles dans chaque groupe expérimental (c'est-à-dire "-/- infecté", "-/- non infecté", "+/+ infecté", "+/+ non infecté"), sauf dans le groupe "+/+ infecté" où il y avait seulement 2 mâles. L'intégrité de l'ARN a été vérifiée avec le kit Bioanalyzer RNA 6000 Nano (Agilent Technologies). Pour l'analyse de l'ARNm, des banques d'ADNc ont été générées à partir de 500 ng d'ARN total en utilisant le kit d'ARN total brin Truseq (Illumina), dans lequel les ARN ont été transcrits de manière inverse après une déplétion ribosomale. Les banques, avec des tailles finales d'environ 290 pb, ont été quantifiées avec le kit de quantification de bibliothèque KAPA (Kapa Biosystems). Deux pools de 10 et 9 bibliothèques ont été préparés. Après dilution à une concentration de 4 nM pour chaque pool, 5 pi (20 femtomoles) ont été chargés sur deux cellules de débit à haute sortie séparées sur la plateforme Nextseq 500. Le séquençage a été effectué sur une plate-forme NextSeq 500 (Illumina) avec une composition chimique appariée de 2 x 75 pb.

VII. Analyse de l'expression des sialyltransférases par PCR quantitative

La transcription inverse a été réalisée sur 1µg d'ARN total à l'aide du kit Maxima[®] First Strand cDNA synthesis dans un volume final de 20µl (4µl de mix de réaction 5X, 2µl de Mix enzymatique et 16µl d'eau stérile). Le mélange a été incubé pendant 10 minutes à 25°C, puis 15 minutes à 50°C et 5 minutes à 85°C.

L'expression des gènes de sialyltransférases (*ST3GAL1* et *ST6GALNAC1*) a été analysée par PCR quantitative. Les amorces sont données dans le tableau 7. Les analyses par PCR quantitative ont été réalisées sur l'appareil Mx3005p Quantitative System (Stratagene, La Jolla, CA, USA). La réaction de PCR (25µl) a été réalisée avec 12,5µl de 2X Brilliant[®] SYBR[®] Green qPCR Mastermix (Stratagene), 300 nM d'amorces et 4µl d'ADNc (1/40). Le profil thermal est le suivant: la dénaturation initiale a été faite à 95°C pendant 10 minutes, l'amplification a été réalisée en 40 cycles (dénaturation à 95°C pendant 30s, hybridation à 60°C pendant 1 min puis élongation à 72°C pendant 30s) et le dernier cycle a été effectué à 72°C pendant 5 min. La fluorescence est mesurée à chaque cycle. L'analyse a été réalisée grâce au logiciel Mx3005p. Pour chaque paire d'amorces, la spécificité de l'amplification a été vérifiée par le contrôle des courbes de dissociation, l'analyse sur gel des produits d'amplification et leur séquençage. L'efficacité s'est avérée être entre 99,5% et 101,4%.

Le gène de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (*HPRT*) a été utilisé pour normaliser l'expression des gènes d'intérêt.

Tableau 7. Séquences nucléotidiques des amorces de q-PCR

Amorces	Séquence (5' - 3')
HPRT sens	GGA-CTT-GAA-TCA-TGT-TTG-TG
HPRT anti-sens	CAG-ATG-TTT-CCA-AAC-TCA-AC
ST6GalNAc1 sens	AGG-ACC-AGG-GGA-CAA-GAA-CT
ST6GalNAc1 anti-sens	GTG-GTG-GCT-CCT-GTG-AGT-CT
ST3Gal1 sens	GCA-TCC-TCT-CCG-TGA-TCT-TC
ST3Gal1 anti-sens	CAA-GAT-GGT-TGT-CAC-GTT-GG

VIII. Adhésion de *Pseudomonas aeruginosa* sur mucines purifiées

Dix microgrammes de mucines purifiées à partir de BAL ou de tissus de porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} ont été déposées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a ensuite été saturée avec du PFBB (Protein Free Blocking Buffer ; Thermo-Scientific) pendant 1 heure. Des bactéries (10⁹ UFC/mL dans une solution de PBS) ont été marquées au DAPI pendant 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité. Les bactéries marquées ont été centrifugées à 6 400 g pendant 5 minutes, lavées trois fois dans du PBS, remises en suspension dans 1 ml de tampon de blocage et déposées sur la membrane. Après incubation pendant 1h à température ambiante dans l'obscurité, suivie de trois lavages dans du PBS contenant 0,5% de Tween 20, la fluorescence des bactéries adhérentes a été détectée par un système d'imagerie ChemiGenius 2 (Syngene).

Afin d'évaluer le rôle de l'acide sialique dans l'adhésion des bactéries aux mucines purifiées, les mucines ont également été préalablement désialylées chimiquement pendant 1 heure à 80°C dans une solution de TFA à 0,05 M avant d'être déposées sur membrane de nitrocellulose.

IX. Modulation de l'activité du canal CFTR sur des explants de trachées de porcelets CFTR^{+/+}

Les explants de trachées de porcelets nouveau-nés ont été immergés dans un tampon froid de Krebs-glucose (NaCl 116 mM, CaCl₂ 1,3 mM, KCl 3,6 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, NaHCO₃ 23 mM et MgSO₄ 1,2 mM, D-glucose 10 mM, 5,7 mM de pyruvate, 5,1 mM de glutamate, pH 7,4) dans les 2h suivant le sacrifice. Les tissus ont été chauffés progressivement et incubés pendant 24h dans un tampon de glucose Krebs-oxygéné additionné de 100µM de GlyH101, ou de CFTR_{inhib172} ou sans inhibiteur (témoin) à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Le tissu muqueux a été séparé de la partie sous muqueuse et les deux parties ont été congelées dans de l'azote liquide pour l'analyse des O-glycanes.

X. Culture des cellules épithéliales cancéreuses de côlon HT29-5M21

Les cellules HT29-5M21 ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal, 1% de glucose et 1% d'une solution de pénicilline-streptomycine. Après décongélation en T25, les cellules ont été incubées à 37°C sous 5% de CO₂. Le milieu a été renouvelé tous les 2 jours.

Pour collecter le mucus produit par les HT29-5M21, les cellules ont été cultivées pendant 21 jours sans repiquage avec changement de milieu tous les 2 jours et quotidiennement à partir de J14. Au bout de 21 jours, le milieu de culture contenant le mucus a été récupéré puis dilué (v/v) dans du tampon d'extraction des mucines contenant du chlorure de guanidine 8M et des inhibiteurs de protéases (v/v).

XI. Purification des O-glycanes de mucines produites par les cellules HT29-5M21

1. Séparation des oligosaccharides par chromatographie HPLC

Les mucines produites par les cellules HT29-5M21 ont été collectées, purifiées et les oligosaccharides ont été libérés par bêta-élimination en milieu réducteur comme décrit précédemment. Le mélange d'oligosaccharides alditols libérés a été soumis à un fractionnement par HPLC (Dionex Chromeleon System, Sunnyvale, CA) sur une colonne de silice greffée avec des groupements amine primaire (Supelcosyl, LC-NH₂, 4,6 x 250 mm, Supelco, Bellefonte, CA). La présence simultanée de glycanes neutres et acides rend nécessaire l'utilisation d'un gradient ternaire acétonitrile/eau/KH₂PO₄ (30 mM) : temps 0, CH₃CN/H₂O/ KH₂PO₄ (80 :20 :0%) ; temps 60 (70 :0 :30%) ; temps 90 (50 :0 :50%) ; temps 100 (50 :0 :50%) ; temps 105 (80 :20 :0%) avec un débit de 1 ml/min. Les oligosaccharides ont été détectés par spectroscopie UV à 200 nm en utilisant un détecteur UVD 170U (Dionex Chromeleon System).

2. Dessalage des oligosaccharides par chromatographie sur colonne de charbon

Les oligosaccharides séparés par HPLC ont été dessalés sur colonne de charbon (150 mg, 3 ml ; Carbograph SPE, Alltech). La colonne a été activée avec 10 ml de méthanol, puis équilibrée par 10 ml d'une solution d'acide trifluoroacétique 0,1%. Après passage de l'échantillon, la colonne a été lavée avec une solution de TFA 0,1% pour éliminer les sels. Les O-glycanes ont ensuite été élués par 1 ml d'une solution d'acétonitrile (ACN)/TFA 25%, puis 1 ml d'ACN/TFA 50% et enfin 2 ml d'ACN/TFA 80%. L'éluât est évaporé et lyophilisé.

XII. Purification du flagelle de la souche PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*

La purification du flagelle a été faite selon le protocole de Bucior *et al.* en 2012 en utilisant une souche mutante de *P. aeruginosa* délétée pour le pili (*pilA*).

Les bactéries ont été mises en culture toute la nuit dans un milieu LB à 37°C. Le lendemain, 100µl de cette culture ont été déposés sur LB-agar 1,5% et incubés à 37°C durant 16h. Les bactéries ont ensuite été grattées et diluées dans 5 ml de PBS. Un volume de suspension bactérienne équivalent à une densité optique de 20, à 600 nm, a été prélevé et resuspendu dans 1 ml de PBS. Cet échantillon a été vortexé durant 30 minutes à température ambiante pour « décrocher » le flagelle. Puis la suspension a été centrifugée à 20 000xg durant 10 min à 4°C, le surnageant récupéré et centrifugé une seconde fois pour éliminer toutes traces de débris cellulaires.

Le surnageant a été dialysé contre du PBS toute la nuit à 4°C et centrifugé à 20 000xg durant 20 min à 4°C pour éliminer les protéines insolubles. Après cela, 100 mM de MgCl₂ ont été ajoutés au surnageant toute la nuit à 4°C afin de précipiter le flagelle.

Les étapes de dialyse, de centrifugation et de précipitation ont été répétées 2 fois minimum afin d'obtenir un flagelle purifié. La pureté du flagelle a été vérifiée sur gel SDS-PAGE à 12,5%.

XIII. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des versions GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA) ou du logiciel statistique R version 3.3.3. Les différences

de niveau d'expression des O-glycanes, d'adhérence de *P. aeruginosa* aux mucines, d'expression génique et de taux de cytokines entre les porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} ont été analysées à l'aide d'un test de Mann-Whitney-Wilcoxon. Le taux de croissance de *P. aeruginosa* dans l'épithélium des voies respiratoires CFTR^{-/-} ou CFTR^{+/+} a été ajusté en utilisant un modèle de croissance exponentielle non linéaire (Graphpad Prism 5.0). Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

CHAPITRE

Contexte de la thèse

CHAPITRE 3

La mucoviscidose est la maladie génétique héréditaire la plus fréquente dans les populations caucasiennes. Elle touche principalement les fonctions digestives et respiratoires. Les atteintes du tractus respiratoire restent encore aujourd'hui la première cause de morbidité et de mortalité chez les patients CF. Les mutations du gène codant pour la protéine CFTR affectent la rhéologie des sécrétions, réduisant l'hydratation et augmentant la viscosité du mucus. L'hyperviscosité du mucus diminue la clairance muco-ciliaire. Le mucus stagne dans les voies aériennes et constitue ainsi un terrain favorable pour le développement de bactéries, virus et champignons conduisant le plus souvent à des cycles d'infections chroniques associées à des réactions inflammatoires exacerbées provoquant la destruction progressive des tissus pulmonaires.

Les modèles animaux de mucoviscidose sont essentiels pour mieux appréhender la pathogénie de la maladie et pour pouvoir développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Au cours des deux dernières décennies, ce sont les modèles murins de mucoviscidose qui ont été les plus utilisés, aussi bien pour la recherche fondamentale que pour la recherche clinique. Ces modèles de souris KO pour le gène CFTR ou portant la mutation $\Delta F508$ se sont révélés très utiles pour la compréhension de la physiopathologie des atteintes intestinales et pour l'étude de la susceptibilité à l'infection par différents pathogènes pulmonaires. Cependant, le phénotype respiratoire des souris CF reste très éloigné de celui des patients atteints de mucoviscidose. Il est donc impératif de disposer de modèles animaux capables de reproduire l'ensemble des manifestations cliniques pulmonaires humaines telles que l'obstruction des bronches par un mucus visqueux et déshydraté, l'inflammation persistante et les infections bactériennes chroniques afin de pouvoir identifier des cibles potentielles de traitement et tester de nouvelles thérapies expérimentales. Dans ce contexte, l'équipe de Nikolai Klymiuk à Munich a développé un modèle de porc en utilisant une approche impliquant le ciblage de CFTR par un vecteur de clonage « Bacterial Artificial Chromosome » (BAC) modifié. Ce modèle de porc CF a ensuite été transféré à l'INRA de Nouzilly qui a en charge la production et le maintien du modèle.

Afin de s'assurer que ce modèle reproduit le plus finement possible le phénotype respiratoire des patients atteints de mucoviscidose, il est nécessaire de caractériser le mucus respiratoire de ces porcelets CFTR^{-/-}. Pour ce faire, un consortium a été créé regroupant différentes équipes : l'équipe du Dr Barbry (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Sophia Antipolis) chargée de l'analyse transcriptomique des poumons de porcelets ; l'équipe des Dr Ignacio Caballero et Mustapha Si-Tahar (Infectiologie Santé Publique, INRA de Nouzilly et Centre d'étude des pathologies respiratoires, Tours) chargée de la production du modèle et des infections *in vivo* par *P. aeruginosa* et notre équipe chargée de la caractérisation biochimique du mucus. Ce consortium a été financé par les associations Vaincre la Mucoviscidose et Grégory Lemarchal dans le cadre d'un projet visant à mieux comprendre les mécanismes de régulation aboutissant à des altérations de la glycosylation des mucines bronchiques des porcelets CFTR^{-/-}. Ma thèse, financée par l'association Vaincre la Mucoviscidose, s'inscrit directement dans ce projet.

Des travaux préliminaires réalisés dans l'équipe avant le début de la thèse avaient mis en évidence une augmentation de la sialylation des mucines respiratoires des porcelets CFTR^{-/-}. De nombreuses études ont montré une augmentation de la sialylation et de la sulfatation des mucines chez les patients CF, en lien avec la sévérité de la maladie sans pouvoir conclure ni sur l'origine de ces modifications ni sur l'impact de ces changements de glycosylation quant à la capacité des bactéries pathogènes à coloniser le mucus. Les objectifs de ma thèse ont donc été :

- de conforter les résultats préliminaires d'augmentation de la sialylation des mucines bronchiques des porcelets CFTR^{-/-} en analysant un plus grand nombre d'échantillons ;
- de caractériser d'éventuelles autres altérations de la composition biochimique des mucines dès la naissance;
- d'identifier les mécanismes moléculaires responsables de ces altérations ;
- et d'évaluer l'impact de ces altérations sur la colonisation par *P. aeruginosa*.

CHAPITRE 4

Résultats

Caractérisation phénotypique et physiologique du tractus respiratoire des porcelets CFTR^{-/-} à la naissance

De nombreuses études ont montré une augmentation de la sialylation et de la sulfatation des mucines pulmonaires chez les patients CF en lien avec la sévérité de la maladie, sans pouvoir conclure sur l'origine de ces modifications. En 2012, Klymiuk *et al.* ont développé un nouveau modèle porcin de mucoviscidose caractérisé par l'absence d'expression de protéines CFTR. Dans le cadre d'une collaboration entre son équipe et notre consortium, nous avons conjointement décidé de caractériser ce modèle porcin afin d'évaluer la pertinence de ce modèle dans le contexte de la mucoviscidose.

Nous nous sommes plus particulièrement attachés à la caractérisation des altérations biochimiques du mucus respiratoire à la naissance des porcelets CFTR^{-/-}, c'est à dire à la détermination des modifications de glycosylation et/ou d'expression des mucines. Nous avons également analysé l'état infectieux et inflammatoire du tractus respiratoire des porcelets à la naissance afin de déterminer si ces altérations du mucus pouvaient être la conséquence d'un processus inflammatoire. En parallèle, nous avons évalué l'efficacité de la clairance mucociliaire à éliminer des souches luminescentes de *P. aeruginosa in vivo*.

I. Altérations de la glycosylation des mucines respiratoires

1. Analyse de la glycosylation des mucines à partir des lavages broncho-alvéolaires

Dans cette étude, nous avons tout d'abord comparé les profils de glycosylation des mucines extraites et purifiées à partir de lavages broncho-alvéolaires provenant de porcelets CFTR^{-/-} (n=20) et CFTR^{+/+} (n=22), prélevés moins de 12h après la naissance. Les mucines sécrétées ont été purifiées par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium puis les oligosaccharides ont été libérés chimiquement de l'axe peptidique et perméthylés avant d'être analysés par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en mode réflectron positif.

La perméthylation permet d'accroître de façon significative la détection des ions (donc des structures O-glycaniques) et de quantifier de manière relative les différents oligosaccharides présents dans les échantillons. Le pourcentage relatif d'expression de chaque ion a été calculé en intégrant les hauteurs des pics respectifs. Chaque ion détecté sur le spectre peut correspondre à une ou plusieurs compositions glycaniques et à une ou plusieurs structures isomériques. Il est par conséquent nécessaire de fragmenter les ions en spectrométrie de masse avant de déterminer leur structure exacte. La composition en monosaccharides a été assignée en prenant en compte la masse de chaque monosaccharide et en tenant compte des voies de biosynthèse des O-glycanes.

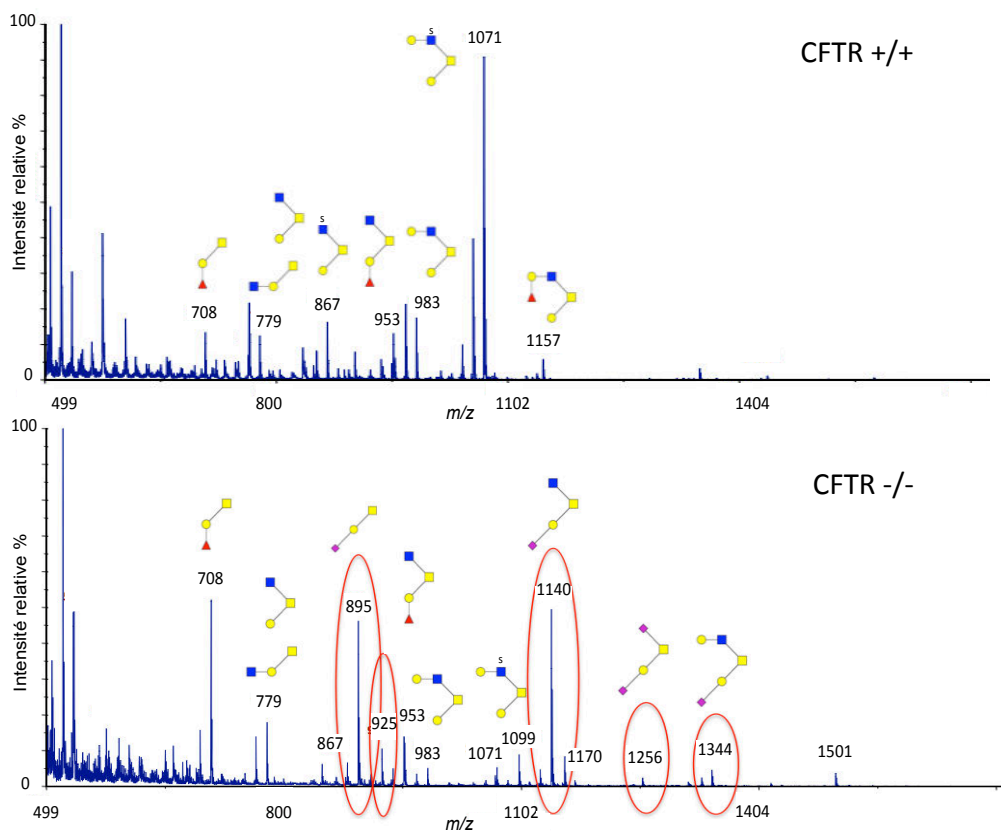


Figure 44. Spectres MS des O-glycanes perméthylés issus des mucines pulmonaires purifiées à partir de lavages broncho-alvéolaires de porcelets CFTR^{+/+} (A) et CFTR^{-/-} (B). Les ions détectés correspondent à des ions de type $[M+Na]^+$ ou $[M+2Na-H]^+$ pour les espèces sulfatées. Symboles : Fuc : triangle rouge ; GlcNAc : carré bleu ; GalNAc : carré jaune ; Gal : rond jaune ; NeuAc : losange violet ; Sulfate : S

La figure 44 montre deux spectres de masse qui ont été obtenus lors de l'analyse des O-glycanes perméthylés provenant des mucines purifiées à partir des LBA de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} prélevés à la naissance.

Les profils de glycosylation des mucines respiratoires sont très différents entre les deux génotypes. Les mucines de porcelets CFTR^{-/-} présentent un niveau de sialylation plus important que les CFTR^{+/+}, avec par exemple une forte expression des ions à m/z 895, 1140, 1256 et 1344 qui correspondent à des O-glycanes portant de l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac). D'autres structures sialylées, comme les ions à m/z 925, 1099 et 1170, comportant des résidus d'acide N-glycolylneuraminique, sont également surexprimées chez les porcelets CFTR^{-/-} par rapport aux porcelets CFTR^{+/+}.

Les ions ont été fragmentés par spectrométrie de masse en tandem afin de déterminer la structure exacte de ces O-glycanes sialylés (Figures 45 et 46). La fragmentation en mode MS/MS des ions parents produit des ions de type B, C, Y et Z par rupture des liaisons glycosidiques et des ions A et X par clivage intracyclique.

Le spectre de fragmentation de l'ion à m/z 895 nous indique que cet ion correspond en fait à deux structures isomériques : NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc ou Gal β 1,3(**NeuAc α 2,6**)GalNAc (Figure 45). Le spectre (figure 45C) montre que l'ion parent correspond à un trisaccharide composé du point d'attache des O-glycanes, c'est-à-dire d'un résidu de N-acétylgalactosamine (GalNAc), d'un résidu de galactose (Gal) et d'un résidu d'acide N-acétylneuraminique (NeuAc). Grâce aux ions fragments C1 β à m/z 259 (figure 45B) et Z1 à m/z 298 (figure 45A) qui correspondent respectivement au Gal lié à la GalNAc et à la GalNAc du point d'attache, la présence simultanée des deux structures isomériques est clairement mise en évidence. En effet, chacun des ions est le marqueur d'une des deux structures. De plus, les autres ions fragments permettent de donner la structure complète des deux isomères. Les ions fragments à m/z 398 (B1 et B1 α) et 520 (Y2 et Y1 α) correspondent au NeuAc situé en position terminale (figure 45A) et greffé au point d'attache (figure 45B). L'ion fragment à m/z 620 (C2) correspond au disaccharide (NeuAc-Gal) du trisaccharide linéaire (figure 45A).

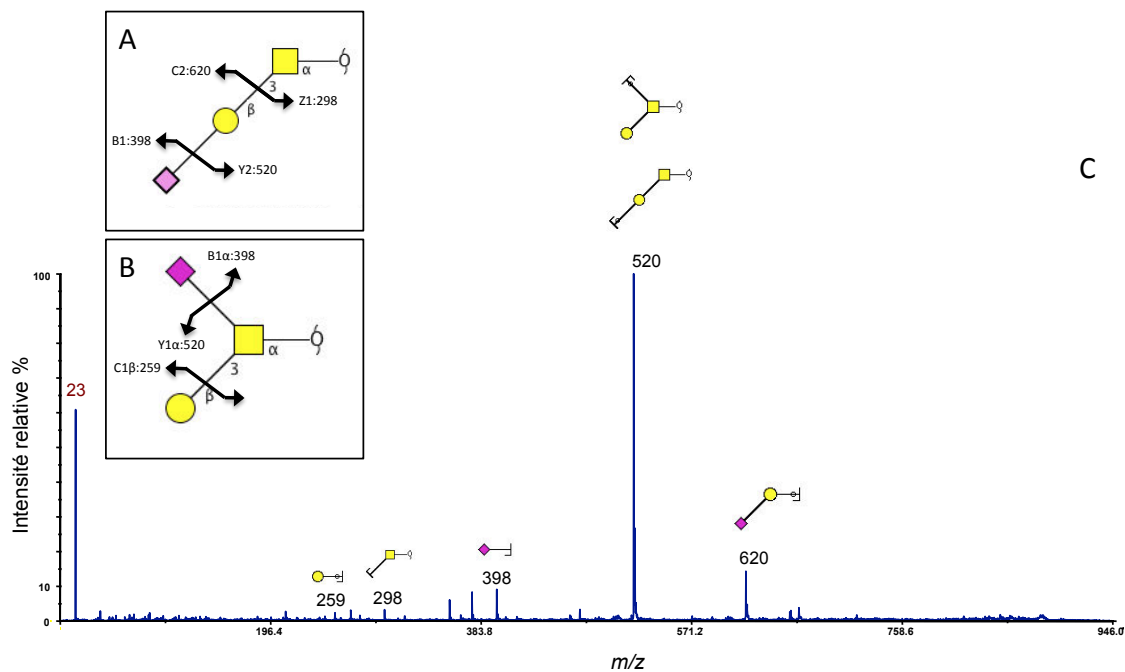


Figure 45. Spectre de fragmentation MS/MS en mode positif de l'ion à m/z 895 (sialyl-TF). (A) et (B) représentent les schémas de fragmentation du sialyl-T et (C) le spectre de fragmentation. Les ions détectés correspondent à des ions de type $[M+Na]^+$.

L'analyse du spectre de fragmentation de l'ion à m/z 1140 (figure 46B) montre que l'ion parent correspond au core 2 substitué par un résidu d'acide N-acétylneuraminique sur le résidu de galactose terminal (figure 46A).

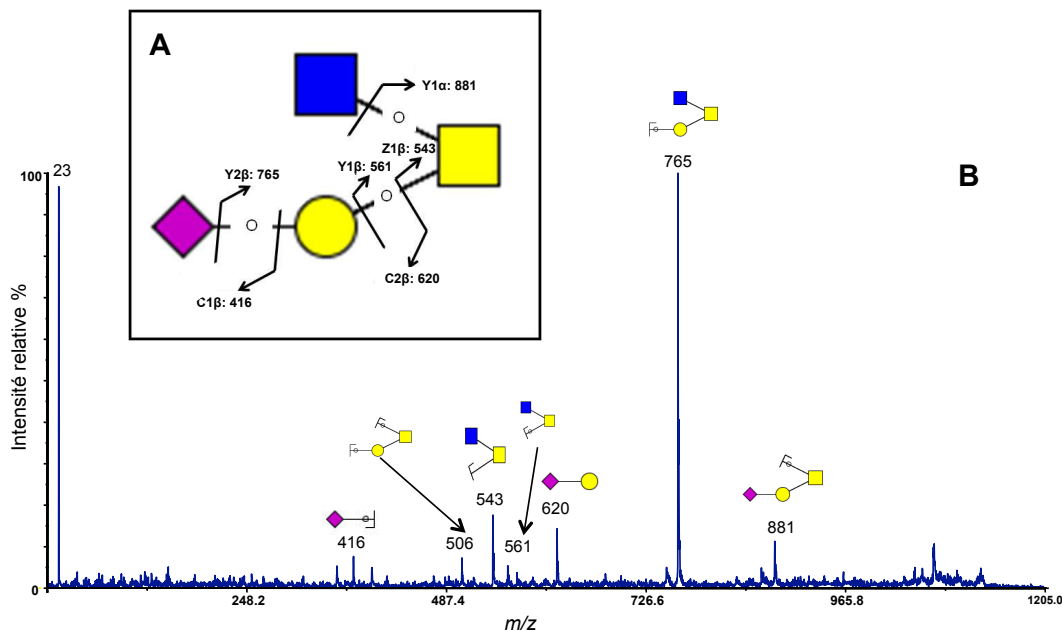


Figure 46. Spectre de fragmentation MS/MS en mode positif de l'ion à m/z 1140. (A) représente le schéma de fragmentation du tétrasaccharide et (B) le spectre de fragmentation. Les ions détectés correspondent à des ions de type $[M+Na]^+$.

L'ion fragment Y2 β à m/z 765 correspond au noyau seul suite à la perte de l'acide sialique au niveau du résidu de Gal tandis que l'ion fragment C1 β à m/z 416 correspond à ce résidu de NeuAc. L'ion fragment Y1 α à m/z 881 correspond au trisaccharide NeuAc-Gal-GalNAc. L'ion fragment C2 β à m/z 620 concorde avec le disaccharide NeuAc-Gal. Enfin, les ions fragments Y1 β et Z1 β à m/z 561 et m/z 543 correspondent au disaccharide GlcNAc-GalNAc.

Le niveau d'expression des différentes structures sialylées portées par les mucines respiratoires des porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} a été quantifié de manière relative à partir des spectres MS et montre des différences significatives entre les deux génotypes (p=0,000051). Plus de 50% des O-glycanes sont sialylés dans les échantillons CFTR^{-/-} contre 21,5% chez les CFTR^{+/+}. Comme le montre la figure 47, l'expression des O-glycanes sialylés correspondant aux ions à m/z 895, 925, 1140 et 1256 est significativement augmentée (p<0.05) dans les LBA de porcelets CFTR^{-/-}.

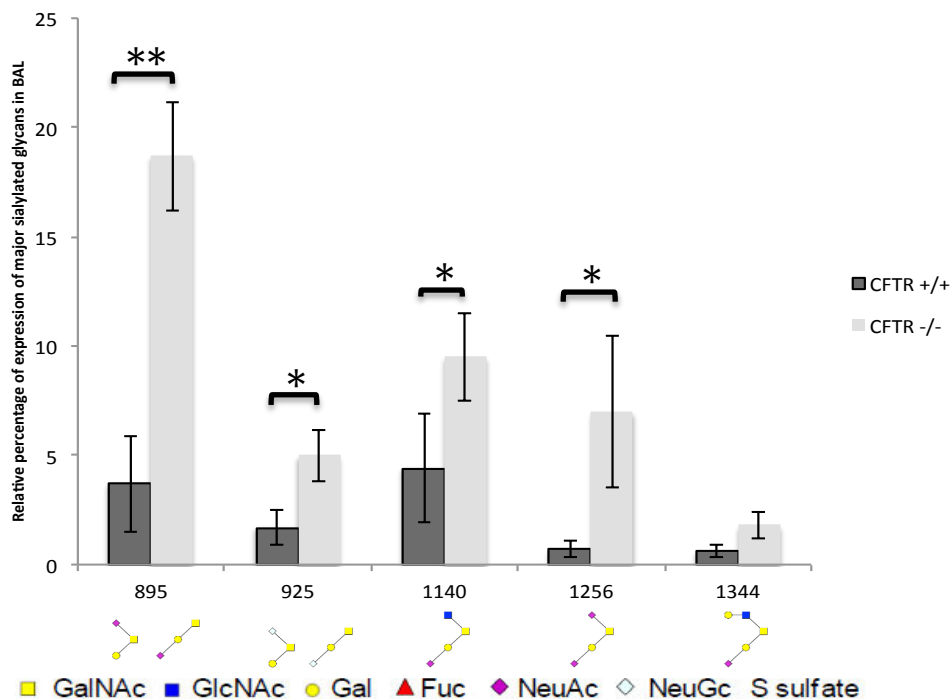


Figure 47. Pourcentage relatif des O-glycanes sialylés majoritaires dans les LBA des porcelets.















En dehors des structures sialylées, les mucines respiratoires des porcelets exhibent un certain nombre de structures neutres, fucosylées ou non, ainsi que quelques structures sulfatées (Tableau 8).


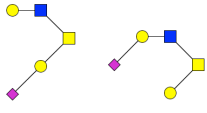
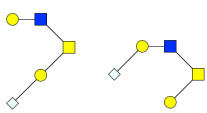
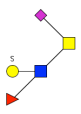
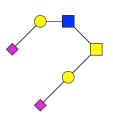
Tableau 8. Structures ou séquences proposées pour les oligosaccharides neutres et acides identifiés sur les mucines respiratoires issues des LBA de porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+}, infectés ou non par *P. aeruginosa*.

Le pourcentage relatif de chaque oligosaccharide a été calculé en intégrant les surfaces des pics sur les spectres MS. Les résultats sont présentés comme la moyenne ± déviation standard du pourcentage d'expression de chaque oligosaccharide pour une même condition.

Symboles : Fuc : triangle rouge ; GlcNAc : carré bleu ; GalNAc : carré jaune ; Gal : rond jaune ; NeuAc : losange violet ; Sulfate : S

Proposed structures or sequences of oligosaccharides	[M+Na] ⁺ or [M+2Na-H] ⁺ for sulfated species	CFTR +/+	CFTR -/-	CFTR +/+ infected	CFTR -/- infected
	534	15.6±6.7	9.5±2.1	0	2.0±1.8
	575	1.7±1.5	3.6±1.7	0	4.1±3
	622	0.2±0.5	0.9±0.6	0	0
	663	0	1±0.9	0	0.6±0.9
	691	0	0.1±0.2	0	0
	708	7.9±1.8	6.8±5.2	5.2±1.6	3.6±2.6
	721	0	0.8±0.5	0	0.7±0.5
	749	2.2±1.2	0.1±0.2	0	0
	779	14.4±8.5	7.0±4.1	0	1.5±1.1
	867	2.8±1.6	0.7±0.8	0	0.7±1
	895	3.7±2.2	18.7±2.5	51.1±3	30.9±1
	925	1.7±0.8	5±1.2	12.2±1.5	6±1.05
	936	0.2±0.5	0.1±0.2	0	0.5±0.8
	953	5.4±2.6	5.5±3.8	0	6.6±1.7

	983	7.1±6.1	4.0±1.4	0	0.8±1.2
	1024	3±2.5	0	0	0
	1041	0.3±0.1	0	0	0
	1069	0	0.5±0.6	0	2.8±2.1
	1071	9.6±5.8	5±2.7	0	0
	1099	0.2±0.5	1.4±1	10.4±3.7	0.6±0.8
	1110	0.1±0.3	0.4±0.8	0	0
	1112	0.6±0.8	0.3±0.4	0	0
	1127	0	0	0	0
	1140	4.4±2.5	9.5±2	0±0.5	2.6±0.9
	1157	3.1±1.9	1.4±0.5	0	1.4±2
	1170	1±1.4	1.1±1.1	0	0.2±0.3
1 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1198	0.4±0.2	0.6±1	0	0.2±0.3
	1228	1.4±0.9	0.6±0.6	0	0
2 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1245	0	0.4±1	0	0
	1256	0.7±0.4	7±3.5	15.7±2	17.5±1.4

1 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1314	0.1±0.2	0.2±0.3	0	0
2 Hex, 2 HexNAc, 1 SO ₃ , GalNAcol	1316	0.6±0.5	0	0	0.3±0.3
	1331	2.5±1	1.3±0.9	1.6±1.1	3.2±0.1
	1344	0.6±0.3	1.8±0.6	1.5±0.1	4±1.5
3 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1361	2.2±1.2	0.3±0.5	0	0.2±0.3
	1374	1.2±0.9	0.5±0.5	0	0.3±0.5
	1402	3.8±4.3	0.2±0.2	0	0.2±0.3
2 Hex, 1 HexNAc, 2 Fuc, 1 SO ₃ , GalNAcol	1419	0.3±0.4	0.3±0.5	0	0.2±0.2
3 Hex, 2 HexNAc, GalNAcol	1432	0.5±0.6	0.2±0.2	0	0.1±0.1
2 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	1473	4.9±3.5	0.1±0.2	0	0.1±0.2
1 Hex, 1 HexNAc, 2 NeuAc, GalNAcol	1501	0.3±0.2	0.9±0.9	0	0
2 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1518	0	0	0	0.4±0.6
3 Hex, 1 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1535	0	0	0	0.1±0.2
2 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuGc, GalNAcol	1548	0	0.1±0.2	0	0.4±0.5
2 Hex, 2 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1589	0.2±0.4	0.3±0.1	0	0
3 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1606	0	0	0	0.1±0.1
2 Hex, 2 HexNAc, 1 NeuGc, GalNAcol	1619	0.3±0.5	0.1±0.2	0	0
2 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1647	1±0.7	0.1±0.1	0	0.1±0.2
3 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	1677	0	0	0	0.1±0.1
	1705	0	0.2±0.4	0.1	1.2±1.1
2 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1718	0	0±0.1	0	1.9±1.5
3 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1780	0	0	0	0.1±0.1
3 Hex, 2 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1793	0	0.2±0.5	0	0
3 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1851	0	0	0	0.1±0.1
4 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	1881	0.4±0.2	0	0	0
2 Hex, 4 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1892	0.1±0.1	0	0	0
1 Hex, 2 HexNAc, 3 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1907	0.1±0.3	0.2±0.4	0	0
3 Hex, 4 HexNAc, GalNAcol	1922	0	0	0	1.3±0.7
3 Hex, 3 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	2025	0	0	0	0.1±0.1
4 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	2055	0.2±0.4	0	0	0
2 Hex, 4 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	2109	0±0.1	0.5±0.5	0	1.4±1.1

2 Hex, 2 HexNAc, 3 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	2111	0	0.3±0.6	0	0
1 Hex, 3 HexNAc, 3 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	2152	0.2±0.3	0.3±0.6	0	0
3 Hex, 5 HexNAc, GalNAcol	2167	0±0.1	0.3±0.6	0	0
1 Hex, 2 HexNAc, 3 Fuc, 2 NeuAc, GalNAcol	2268	0.1±0.3	0.1±0.3	0	0
3 Hex, 4 HexNAc, 1 NeuGc, GalNAcol	2313	0	0.4±0.4	0	0.9±1.1

Au total, plus de 80 O-glycanes différents ont été identifiés sur ces mucines. Les O-glycanes sont majoritairement basés sur du core 1 pour les structures sialylées ou sur du core 2 pour les structures neutres et les structures fucosylées comme l'illustre la figure 48.

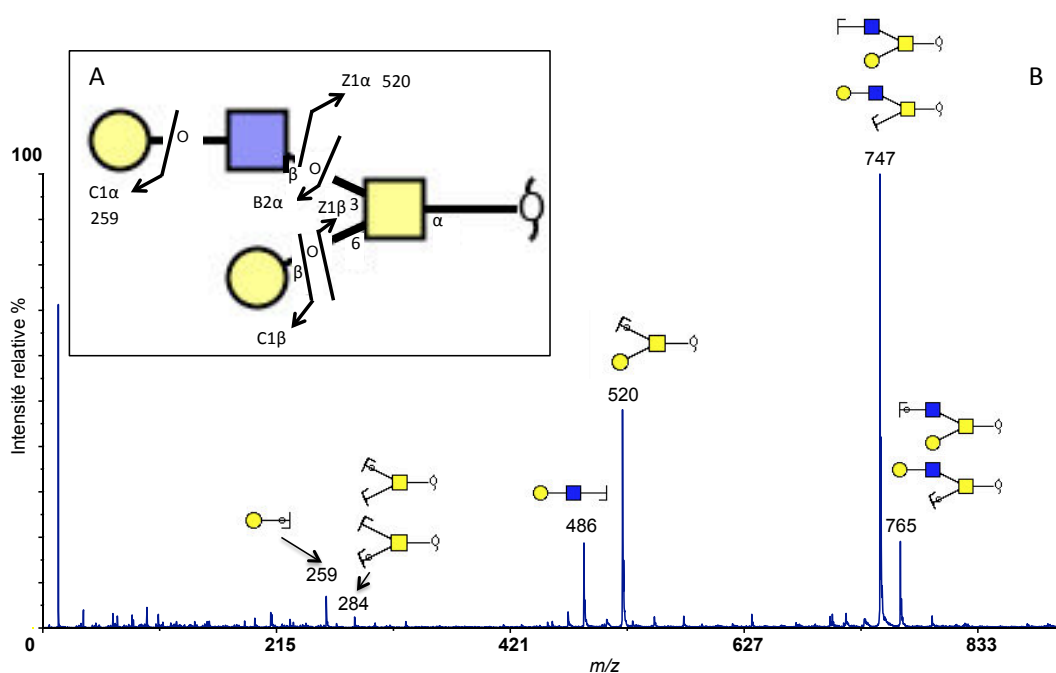


Figure 48. Spectre de fragmentation MS/MS en mode positif de l'ion à m/z 983. (A) représente le schéma de fragmentation du tétrasaccharide et (B) le spectre de fragmentation. Les ions détectés correspondent à des ions de type $[M+Na]^+$.

L'ion fragment C1 α ou C1 β à m/z 259 indique un résidu de galactose en position terminale. L'ion fragment Y1 α /Z1 β à m/z 284 indique que la GalNAc du point d'attache est disubstituée. L'ion fragment B2 α indique la présence d'un disaccharide composé d'un résidu de Gal terminal lié à un résidu de GlcNAc. L'ion fragment Y1 α à m/z 520 indique qu'un résidu de Gal est lié à la GalNAc du point d'attache. L'ensemble de ces ions nous permet de conclure que le O-glycane correspondant à l'ion à m/z 983 est un oligosaccharide de core 2 dont la structure est : Gal β 1,3(Gal β 1GlcNAc β 1,6)GalNAc.

Les résidus de fucose sont soit greffés sur un résidu de galactose pour former des antigènes de

groupe sanguin H soit greffés sur une chaîne lactosaminique de type 2 pour former les déterminants de type Lewis^x et Lewis^y.

2. Analyse de la glycosylation des mucines respiratoires le long de l'arbre trachéo-bronchique

Chez les porcelets CFTR^{-/-}, le mucus est déshydraté et plus visqueux, conduisant à une plus forte rétention des mucines sécrétées à la surface de l'épithélium. Afin de s'assurer que les modifications de sialylation des mucines issues des BAL de porcelets CFTR^{-/-} ne soient pas dues à des disparités dans la collecte des échantillons de BAL entre les 2 génotypes, nous avons analysé les profils de glycosylation des mucines non plus issues de lavages broncho-alvéolaires mais provenant de trachées (muqueuses et glandes sous muqueuses) et de bronches de porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+}. Pour cela, de nouveaux types de prélèvements ont été faits (Figure 49).

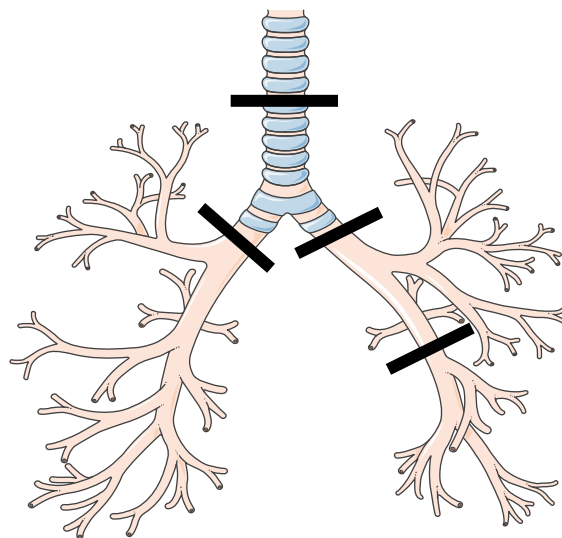


Figure 49. Représentation schématique des régions trachéo-bronchiques prélevées pour l'analyse de la glycosylation des mucines

Le poumon gauche de chaque porclet a été utilisé pour prélever le LBA. La trachée et les bronches du poumon droit ont été découpées en 2 parties ; le mucus a été gratté et le tissu systématiquement récupéré pour chaque zone de la trachée. Il n'a pas été possible de séparer la muqueuse de la sous-muqueuse dans les bronches, du fait de la faible épaisseur du tissu.

Afin de s'assurer que les échantillons de muqueuses et de sous-muqueuses étaient correctement séparés dans la trachée, une partie des échantillons a été fixée en paraffine et les coupes de tissus ont été colorées au PAS (Figure 50).

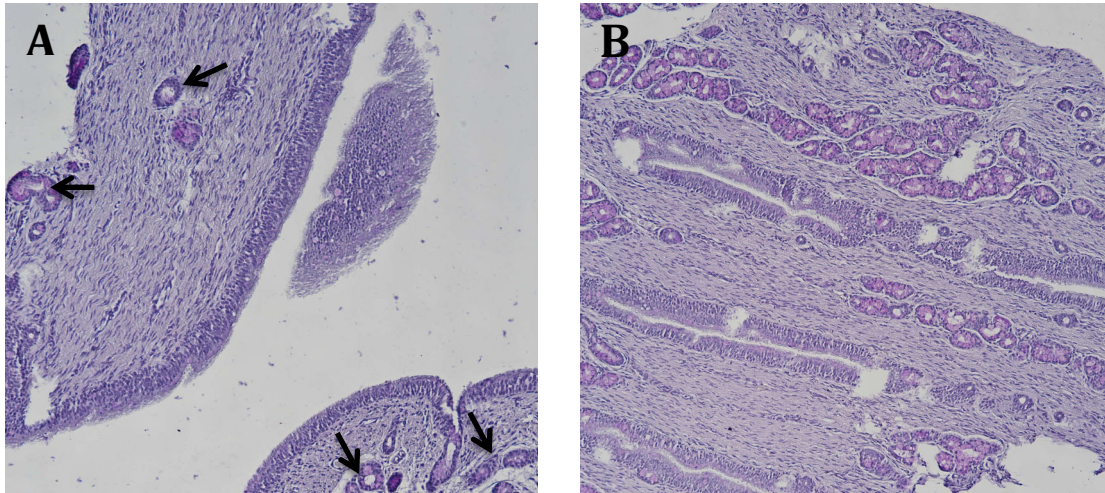


Figure 50. Analyse histologique des échantillons de muqueuses et sous-muqueuses trachéales. Coloration au PAS des échantillons de muqueuse (A) et sous-muqueuse (B) de trachées de porcelets CFTR^{-/-}

La partie sous-muqueuse ne renferme que les glandes sous-muqueuses et ne contient pas de cellules à gobelet de la surface (Figure 50B). Par contre même si la partie muqueuse ne contient majoritairement que les cellules à gobelet de la surface épithéliale, il y a présence de quelques glandes sous-muqueuses, comme indiqué par des flèches sur la figure (Figure 50A).

Les mucines ont été purifiées par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium comme précédemment et les O-glycanes de chacune des régions de l'arbre trachéo-bronchique ont été analysés par spectrométrie de masse. Les mêmes structures glycaniques sont retrouvées tout le long de cet arbre trachéo-bronchique mais avec des niveaux d'expression très variable en fonction de l'étage du tractus respiratoire.

La quantification relative de l'expression des glycanes sialylés dans chacun des échantillons indique une très forte augmentation de la sialylation des mucines dans la partie distale des bronches, par rapport aux autres zones de l'arbre trachéo-bronchique, et ce, quelque soit le génotype (Figure 51). Alors que les oligosaccharides sialylés représentent entre 13 et 40% des oligosaccharides totaux dans la trachée et les bronches proximales, plus de 60% des glycanes sont sialylés dans les bronches distales.

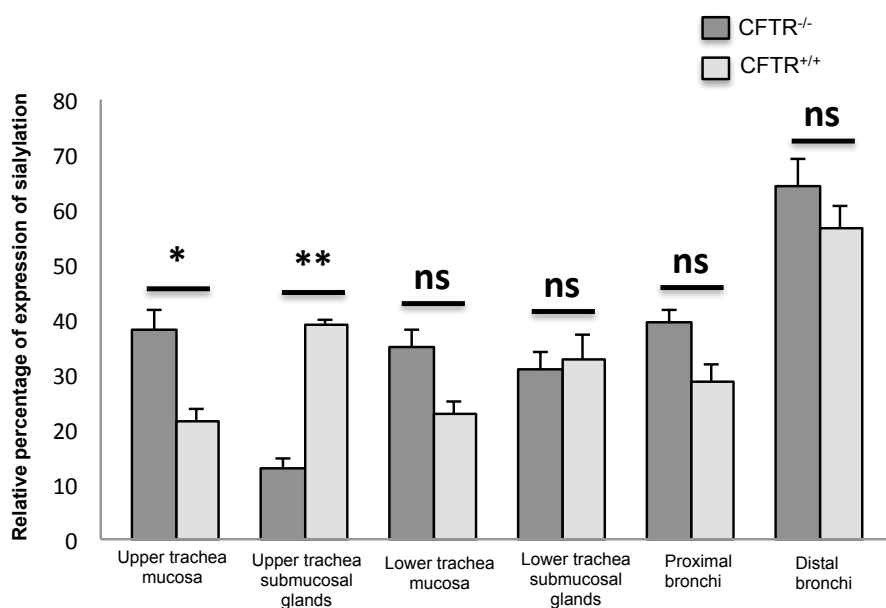


Figure 51. La sialylation des mucines respiratoires des porcelets CFTR^{-/-} est altérée dans la partie haute de la trachée. Pourcentage relatif des O-glycanes sialylés provenant des différentes parties de l'arbre trachéo-bronchique des porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} (n=3 et n=5).

C'est au niveau de la partie haute de la trachée qu'est retrouvée la différence la plus significative entre les génotypes en terme de sialylation des mucines (Figure 51). Chez les CFTR^{-/-}, les mucines sont plus sialylées dans la muqueuse que dans les glandes sous-muqueuses (p=0,006), alors que chez les CFTR^{+/+}, la situation est inversée (p=0,0078).

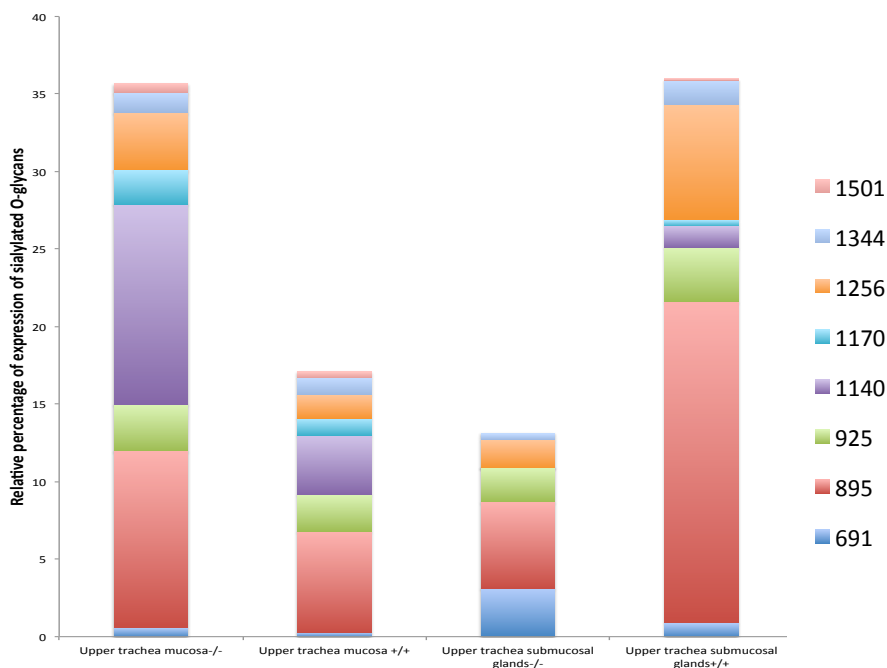


Figure 52. Pourcentage relatif des O-glycanes sialylés majoritaires portés par les mucines de la muqueuse et des glandes sous-muqueuses du haut de la trachée des porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} (n=3 et n=5).

3. Analyses histologiques et immunohistochimiques des coupes de tissus de trachées de porcelets

a) Coloration PAS/BA

L'augmentation de la sialylation des mucines au niveau de la trachée des porcelets CF a été confirmée par une coloration Periodic Acid Schiff/Bleu Alcian.

Dans le protocole que nous avons utilisé, les résidus d'acide sialique sont tout d'abord saponifiés au niveau de leur groupement acétyl (Figure 43). Après une oxydation periodique ménagée suivie d'une réaction de bêta-élimination, les acides sialiques sont spécifiquement colorés en bleu par le Bleu Alcian. La réaction au PAS ne colore dans ce cas que les monosaccharides neutres car les groupements OH vicinaux des acides sialiques ont été oxydés au préalable. Ce protocole permet donc une meilleure discrimination entre structures sialylées exclusivement marquées en bleu et structures neutres exclusivement marquées en rose. La coloration violette observée sur des coupes de tissus indique donc la présence simultanée des deux types de glycanes.

Dans un protocole classique de coloration PAS/BA, les acides sialiques sont colorés à la fois en rose par le PAS et en bleu par le BA.

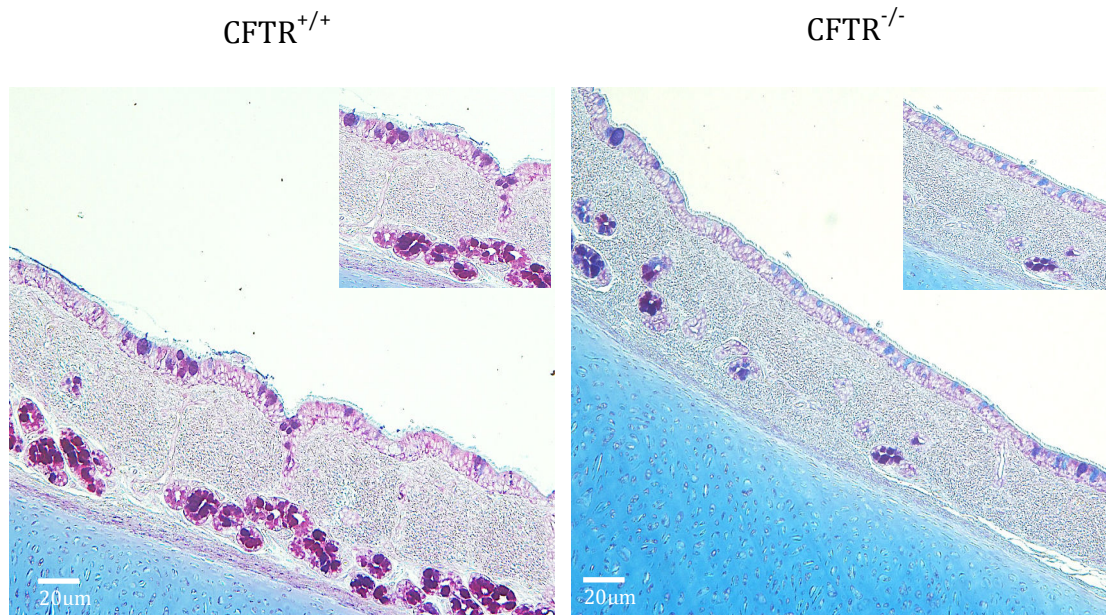


Figure 53. Coloration PAS/BA des trachées de porcelets CFTR. (A) Coupe de trachée CFTR^{-/-} (200x) montrant des mucines neutres dans les glandes sous-muqueuses (coloration rose) et des mucines acides dans les cellules à gobelets (coloration bleue). (B) Agrandissement (400x) des cellules à gobelets des trachées de porcelets CFTR^{-/-}. (C) Coupe de trachée CFTR^{+/+} (200x) montrant des mucines sialylées dans les glandes sous-muqueuses (coloration bleu/violette) et des mucines neutres dans les cellules à gobelets (coloration rose). (D) Agrandissement (400x) des glandes sous-muqueuses de trachées de porcelet CFTR^{+/+}.

La figure 53 confirme que les mucines de la trachée des porcelets CFTR^{-/-} sont beaucoup plus sialylées que celles des porcelets CFTR^{+/+}. Dans la trachée des CFTR^{-/-}, les glandes sous muqueuses sont majoritairement colorées en rose/magenta alors que les granules de sécrétion des cellules à gobelet sont soit bleues indiquant une très forte densité de mucines sialylées, soit violettes indiquant un mélange de mucines acides et neutres (Figure 53A-B). Au contraire, dans la trachée des CFTR^{+/+}, les glandes sous muqueuses sont colorées en violet/bleu alors que les cellules à gobelet sont colorées en violet (Figure 53C-D).

b) Immunomarquage des trachées avec la lectine SNA

La lectine SNA a également été utilisée sur les coupes de trachées afin de détecter les liaisons de l'acide sialique en $\alpha 2,6$. Ce marquage a confirmé la présence d'acide sialique en plus forte quantité au niveau des trachées des porcelets CFTR^{-/-}. Ces résidus d'acide sialique liés en $\alpha 2,6$ sont retrouvés aussi bien dans les cellules à gobelet de la surface épithéliale que dans les glandes sous-muqueuses.

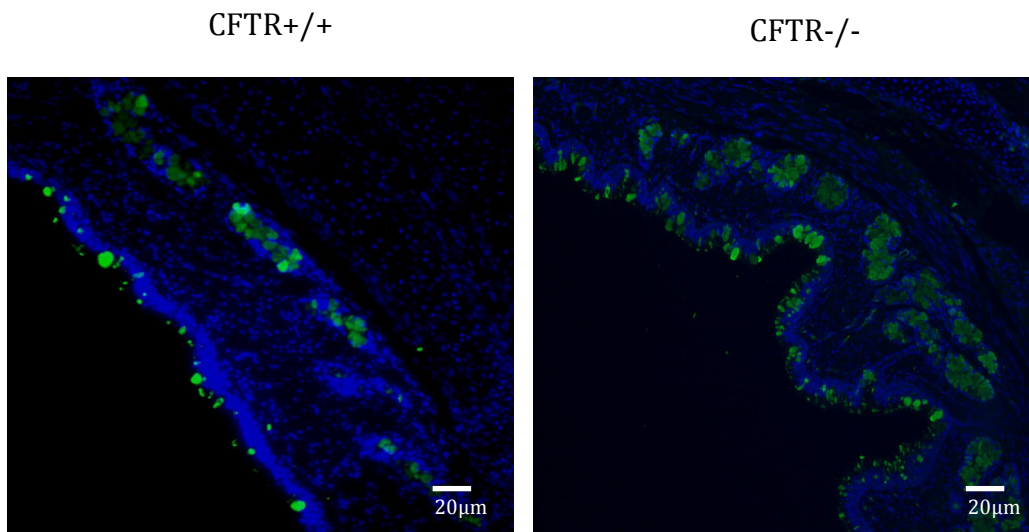


Figure 54. Immunomarquage des trachées de porcelets avec la lectine SNA marquée à la fluorescéine

c) Coloration HID/BA

La détection des structures sulfatées étant parfois difficile du fait de la perméthylation des O-glycanes avant l'analyse par spectrométrie de masse, nous avons décidé d'étudier les éventuelles variations de la sulfatation des mucines en utilisant une coloration de type High Iron Diamine (HID)/BA. Cette coloration colore en brun les structures sulfatées et en bleu les acides sialiques.

Les mucines trachéales semblent beaucoup moins sulfatées que sialylées, et ce, quelque soit le génotype. Ce résultat confirme ce qui avait été observé lors de l'analyse par spectrométrie de masse. De même, les mucines présentes dans les cellules à gobelet sont plus sulfatées que celles retrouvées au niveau des glandes sous-muqueuses aussi bien chez les CFTR^{-/-} que chez les CFTR^{+/+}. La coloration HID ne permet pas de conclure quant à des différences de quantité de mucines sulfatées entre les deux génotypes.

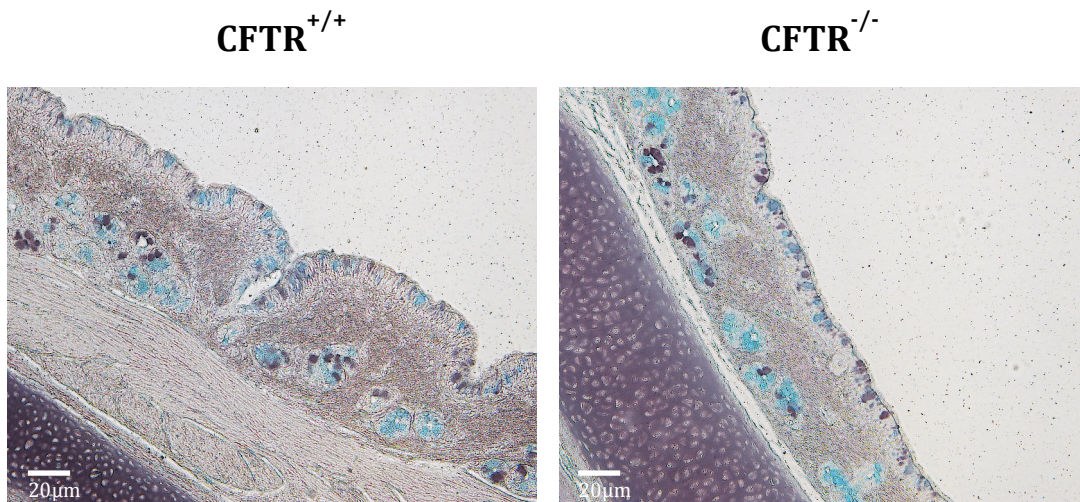


Figure 55. Coloration HID des trachées de porcelets. La couleur brune correspond au marquage des mucines sulfatées et la coloration bleue aux mucines sialylées.

II. Les altérations de glycosylation ne sont pas corrélées à des modifications d'expression ou de localisation des mucines à la naissance

Afin de caractériser au niveau tissulaire les différences associées au mucus entre CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+}, la localisation des deux principales mucines pulmonaires sécrétées, MUC5AC et MUC5B, a été analysée par immunofluorescence en microscopie à fluorescence et confocale (Figure 56). Nous n'avons pas observé de différences de localisation ou d'expression des mucines entre les 2 génotypes.

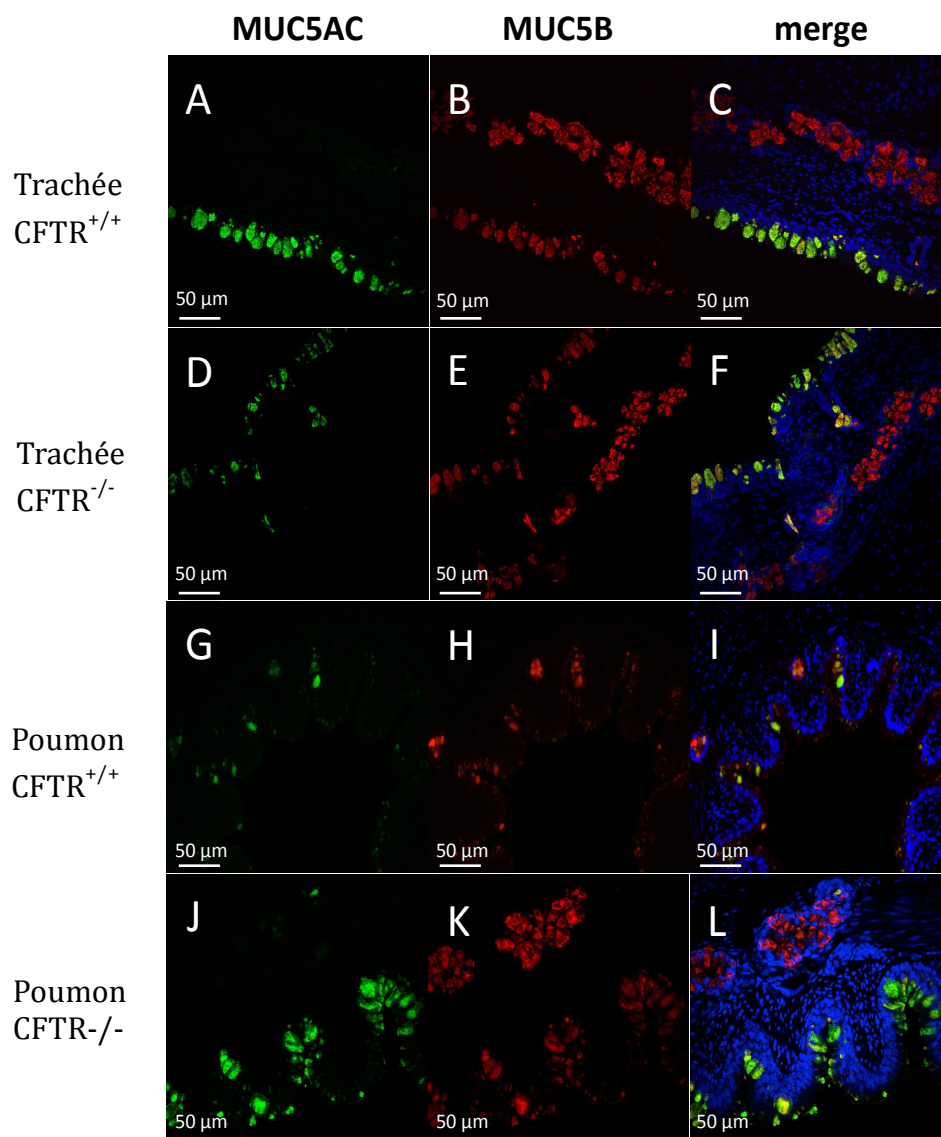


Figure 56. Immunolocalisation de MUC5AC et de MUC5B dans le tractus respiratoire des porcelets. Double marquage anti-MUC5AC en vert (anticorps monoclonal 45-M1) (A,D,G et J) et anti-MUC5B en rouge (anticorps polyclonal H-300) (B,E,H et K). Les noyaux sont marqués en bleu. (C, F, I et L) sont les superpositions des deux images. Dans les trachées des porcelets CFTR^{+/+} (A-C) et CFTR^{-/-} (D-F), MUC5AC est exclusivement retrouvée à la surface des cellules à gobelets tandis que MUC5B est localisée dans les glandes sous-muqueuses et à la surface des cellules à gobelets. Dans les poumons des porcelets CFTR^{+/+} (G-I) et CFTR^{-/-} (J-L), MUC5AC et MUC5B sont localisées à la surface des cellules à gobelets tandis que les sous-muqueuses bronchiques et les alvéoles ne contiennent que du MUC5B.

Dans la trachée, MUC5B est observée dans les glandes sous muqueuses et les cellules à gobelet de la surface épithéliale tandis que MUC5AC est exclusivement retrouvée dans les cellules caliciformes bordant la lumière trachéale (Figure 56 A-F). Plus profondément, dans les poumons, les cellules à gobelets des bronchioles sont remplies soit de MUC5AC soit de

MUC5B (Figure 56 G-L). Les glandes sous muqueuses des bronches et les alvéoles pulmonaires expriment exclusivement la mucine MUC5B chez les CFTR^{-/-} ou CFTR^{+/+}.

Au niveau de la trachée, les 2 mucines ne semblent pas co-localisées dans les mêmes vésicules de sécrétion. Il semblerait que les 2 mucines soient présentes dans les mêmes cellules mais dans des vésicules de sécrétion différentes (Figure 57).

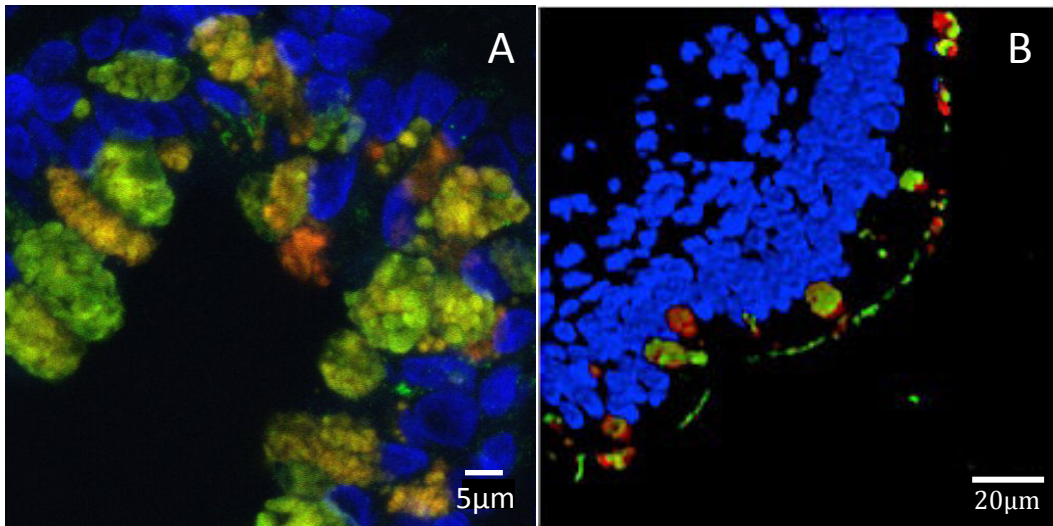


Figure 57: Localisation de MUC5AC (vert) et MUC5B (rouge) dans les trachées de porcelets. (A) Microscopie à épi-fluorescence (B) Reconstruction 3D obtenue à partir d'une série d'images de microscopie confocale. Les noyaux sont marqués en bleu.

Les différences de glycosylation des mucines des porcelets CFTR^{-/-} ne peuvent donc être corrélées à des différences d'expression ou de localisation des mucines à la naissance.

En 2017, deux équipes ont analysé l'organisation et la morphologie structurale des mucines dans la trachée. Ils ont utilisé comme modèle d'étude les porcelets CFTR^{-/-} et les CFTR^{+/+}. Les deux équipes ont conclu que MUC5AC était majoritairement sécrété sous forme de filaments qui viendraient partiellement recouvrir les faisceaux de MUC5B libérés à partir des canaux des glandes sous-muqueuses (Ostedgaard *et al.* 2017 ; Ermund *et al.* 2017). Pour mettre en évidence cette organisation du gel de mucus, l'équipe d'Ostedgaard a émis comme hypothèse que la lectine WGA marquait préférentiellement la mucine MUC5B et la jacaline marquait préférentiellement la mucine MUC5AC (Figure 58).

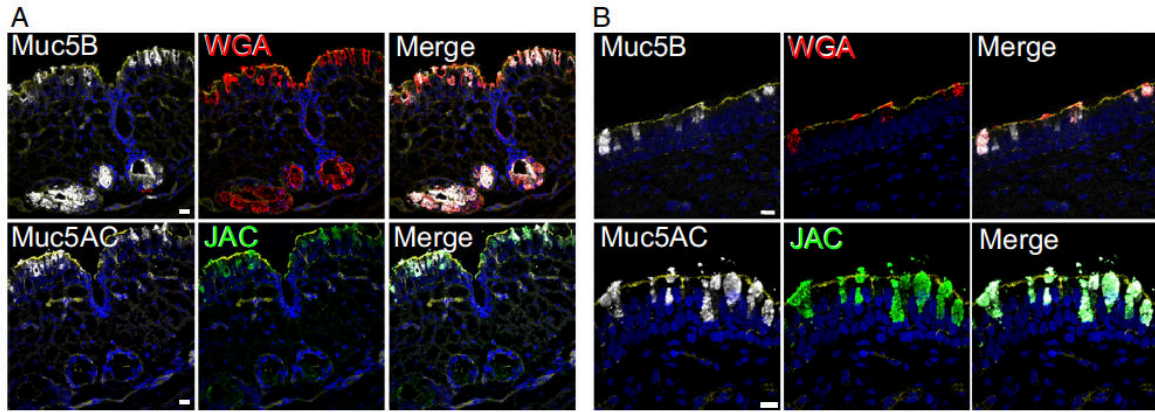


Figure 58. Les lectines WGA et jacaline marquent préférentiellement MUC5B et MUC5AC respectivement (d'après Ostedgaard *et al.* 2017). (A) Double marquage anti-MUC5B (blanc) et WGA (rouge) ou anti-MUC5AC (blanc) et Jacaline (vert) des glandes sous-muqueuses des trachées de porcelets. (B) Double marquage anti-MUC5B (blanc) et WGA (rouge) ou anti-MUC5AC (blanc) et Jacaline (vert) de la surface épithéliale et des cellules en gobelet. Les noyaux sont marqués en bleu et l'actine en jaune. (Echelle : 10 μ m)

L'équipe d'Ostedgaard a donc utilisé ce double marquage lectinique pour montrer que l'apparence morphologique des mucines CF et non-CF différait (Figure 59). Les faisceaux de MUC5B semblent plus attachés aux canaux dans la trachée des porcelets CFTR^{-/-}. Ces faisceaux sont aussi plus enchevêtrés que chez les porcelets CFTR^{+/+}. Les filaments de MUC5AC recouvrent les faisceaux de MUC5B uniquement chez les CFTR^{-/-}.

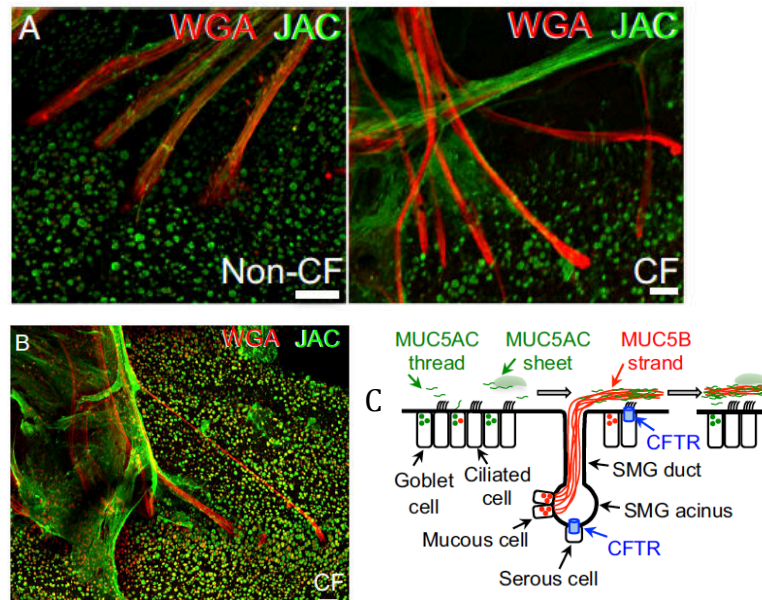


Figure 59. Les trachées des porcelets CFTR^{-/-} présentent des faisceaux de mucus enchevêtrés (d'après Ostedgaard *et al.* 2017). (A) Trachées de porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} stimulées à la méthacoline. La WGA est colorée en rouge et la jacaline en vert. (B) Filaments de MUC5AC recouvrant les faisceaux de MUC5B chez les porcelets CFTR^{-/-}. (échelle, 50 μ m). (C) Modèle de sécrétion des mucines dans la trachée de porc.

La lectine WGA (wheat germ agglutinin) reconnaît spécifiquement les résidus de D-GlcNAc. La jacaline se fixe uniquement sur des O-glycanes et reconnaît l'antigène TF (Gal β 1-3GalNAc) mono- ou di-substitué par un ou deux résidus d'acide sialique. Elle reconnaît donc les antigènes sialyl-TF et disialyl-TF. Elle reconnaît également les antigènes Tn (GalNAc α 1-Ser/Thr) et le core 3 (GlcNAc β 1-3GalNAc) (Tachibana *et al.* 2006). Nos études structurales réalisées par spectrométrie de masse et portant sur l'analyse de la glycosylation des mucines dans les muqueuses et dans les glandes sous-muqueuses nous ont permis de démontrer que les motifs TF et sialyl-TF étaient présents aussi bien dans les glandes sous-muqueuses que dans les cellules à gobelet. De même, la GlcNAc est un monosaccharide majeur des O-glycanes puisqu'il entre dans la composition de toutes les chaînes lactosaminiques.

Nous avons donc décidé de marquer les coupes de trachées de porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} avec des anticorps anti-MUC5AC ou anti-MUC5B et la jacaline (Figure 60).

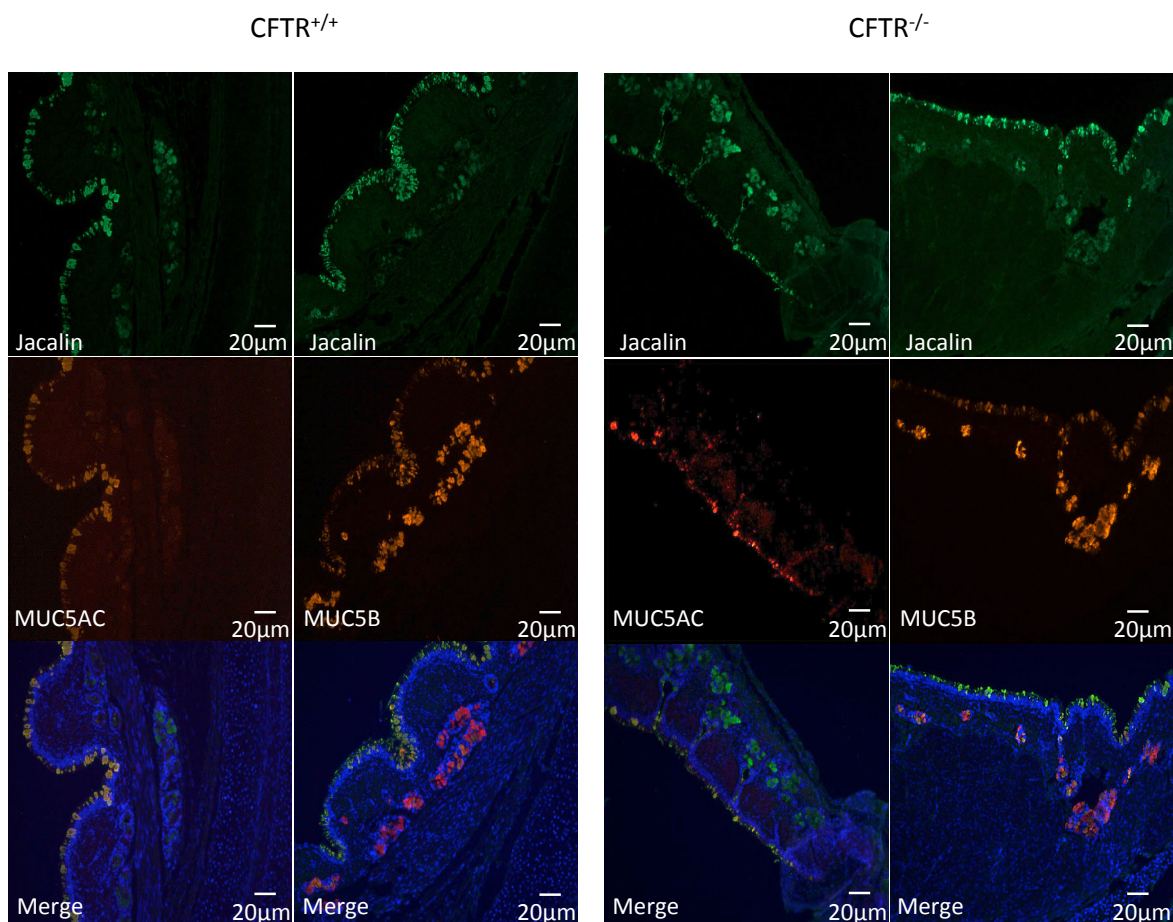


Figure 60. Co-marquage de la jacaline (vert) et des mucines MUC5AC et MUC5B (rouge) dans la trachée des porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}.

La jacaline marque aussi bien les mucines présentes dans les cellules à gobelet que celles présentes dans les glandes sous-muqueuses.

L'équipe d'Ermund a utilisé quant à elle la lectine LTL pour marquer MUC5B et la lectine UEA-1 pour marquer MUC5AC (Figure 61). Elle est parvenue aux mêmes conclusions en terme d'organisation morphologique des mucines dans la trachée.

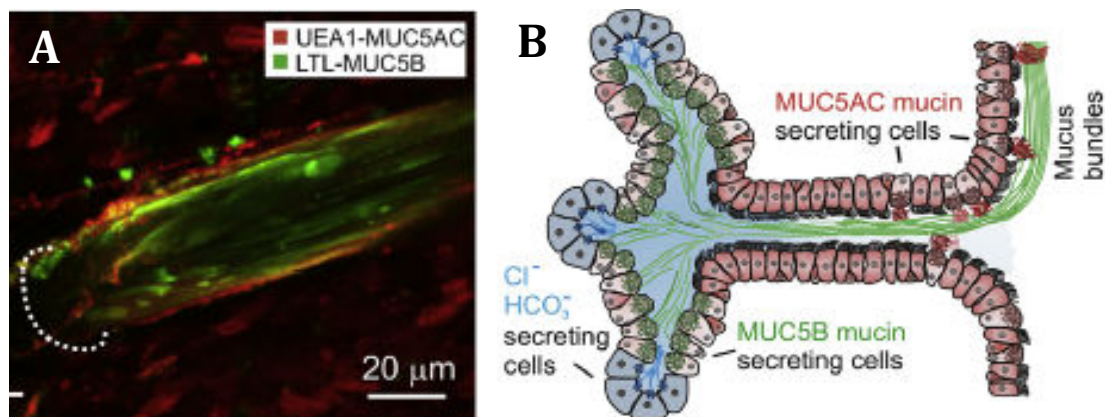


Figure 61. Les trachées des porcelets présentent des faisceaux de mucus enchevêtrés (d'après Ermund *et al.* 2017). (A) Trachée de porc stimulée à la méthacoline. UEA-1 est colorée en rouge et LTL en vert. Les filaments de MUC5AC recouvrent les faisceaux de MUC5B. (B) Modèle de sécrétion des mucines dans la trachée de porc.

La lectine UEA-1 reconnaît les résidus de fucose liés en α , et plus particulièrement les déterminants antigéniques de type H (Fuc α 1,2Gal). La lectine LTL reconnaît les mêmes groupements fucosylés que UEA-1 et reconnaît aussi l'arabinose qui n'est pas un monosaccharide présent sur les O-glycanes de mucines. Nos analyses en spectrométrie de masse ont montré que les déterminants antigéniques de type H et les structures fucosylées étaient retrouvés aussi bien sur les mucines des cellules en gobelet que sur les mucines des glandes sous-muqueuses. Nos analyses immunohistochimiques ont permis de confirmer que la lectine UEA-1 marque les mucines MUC5AC et MUC5B de la surface épithéliale et des glandes sous-muqueuses des trachées de « nos » porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} (Figure 62).

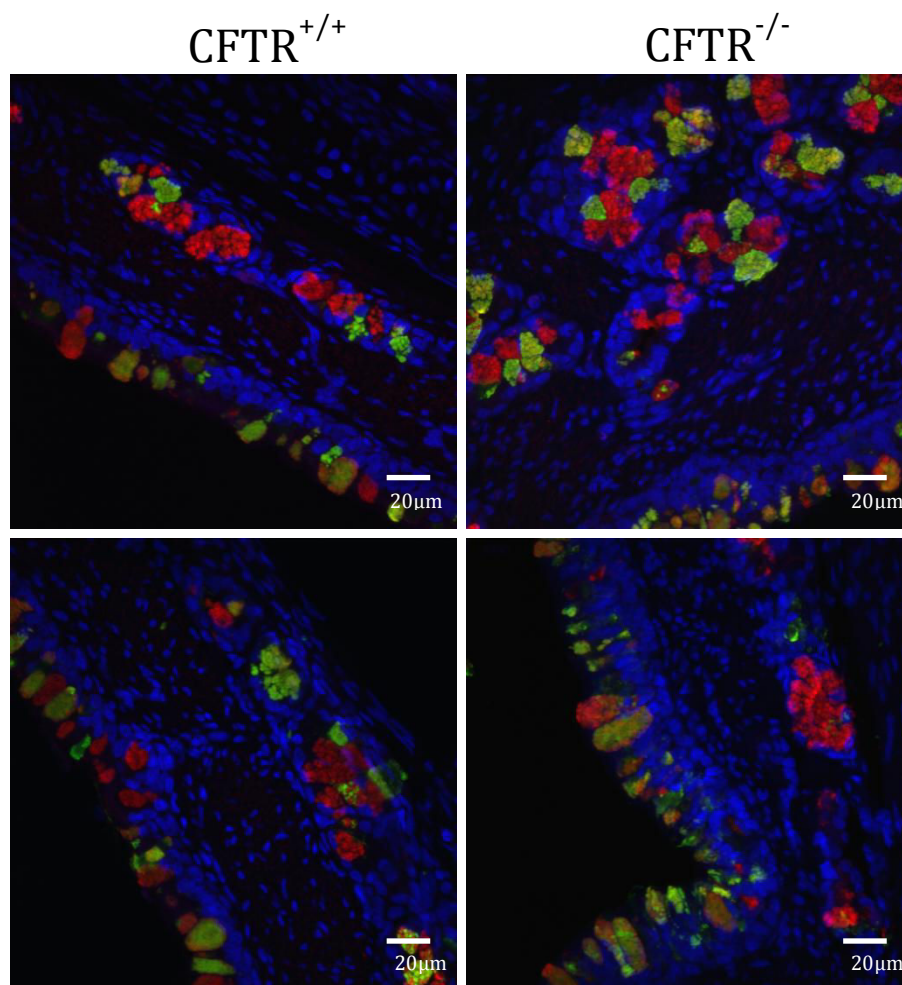


Figure 62. Co-marquage de UEA-1 (vert) et des mucines MUC5B (rouge) dans la trachée des porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}.

Même si toutes les mucines MUC5B ne sont pas co-marquées par UEA-1, confirmant ainsi une hétérogénéité en terme de glycosylation des mucines sécrétées, il paraît évident que les mucines MUC5B de la surface épithéliale sont reconnues par UEA-1 et il est donc difficile d’imaginer que UEA-1 soit spécifique des mucines MUC5AC produites par les cellules en gobelet de la surface.

III. Les perturbations du mucus précèdent l’inflammation et l’infection

De nombreuses modifications de la glycosylation des mucines bronchiques, en particulier la sialylation et la sulfatation, ont été observées chez les patients atteints de mucoviscidose. Il a été proposé que ces modifications découlaient principalement de processus inflammatoires ou

infectieux (Lo-Guidice *et al.* 1994 ; Colomb *et al.* 2012). Nous avons donc évalué l'état inflammatoire et infectieux des poumons et trachées des porcelets CFTR^{-/-} à la naissance afin de déterminer si l'augmentation de sialylation des mucines précédait ou non toute inflammation ou infection. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du docteur Caballero-Posadas de l'INRA de Nouzilly qui a analysé l'expression des gènes codant pour différentes cytokines et interleukines par PCR quantitative ainsi que le dosage ELISA des interleukines IL-8 et IL-6.

1. Analyse histologique des tissus

Une coloration HE a été réalisée sur des coupes de 4µm de poumons et de trachées de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} inclus en paraffine (Figure 63).

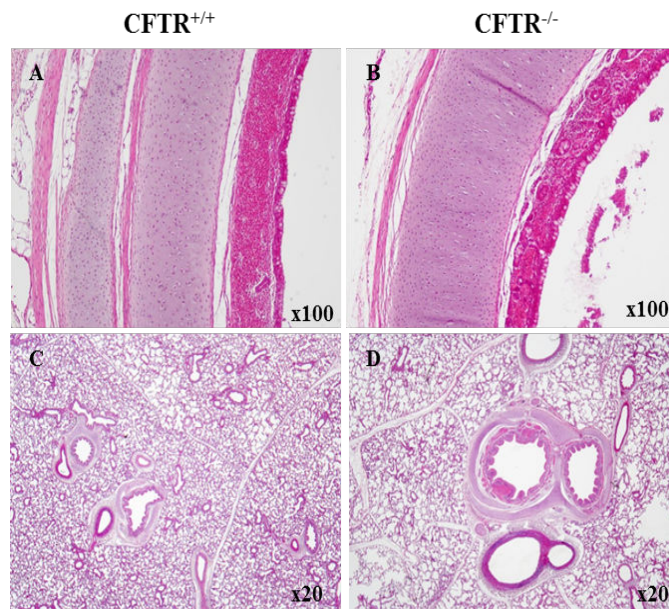


Figure 63. Etude histologique des poumons et trachées de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} avant infection. Les tissus ont été analysés par coloration à l'éosine-hématoxyline et les cellules sécrétrices ont été colorées par une coloration PAS. Coupe de trachée (100x) de porcelet non infecté CFTR^{+/+} (A) et CFTR^{-/-} (B) et de poumon (20x) de porcelet non infecté CFTR^{+/+} (C) et CFTR^{-/-} (D).

2. Dosage ELISA des IL-6 et IL-8

Un dosage ELISA a permis de déterminer les quantités d'interleukines IL-8 et IL-6 présentes dans les BAL des porcelets à la naissance (Figure 64). Aucune modification significative n'a été observée au niveau de ces interleukines entre les porcelets WT et CF.

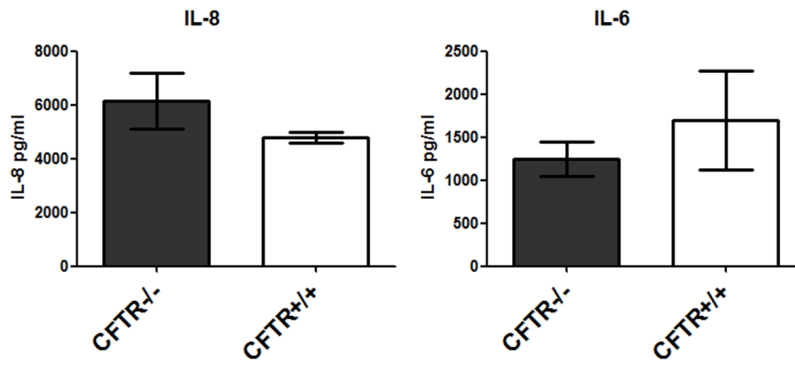


Figure 64. Dosage ELISA du niveau d'expression des interleukines IL-8 et IL-6 des poumons de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}.

3. Dosage de l'expression des gènes de l'inflammation par PCR quantitative

Le niveau d'expression de différents gènes codant pour des protéines pro-inflammatoires a été analysé par RT-qPCR afin de conforter notre hypothèse d'absence d'inflammation chez les porcelets CF dès la naissance (Figure 65). Aucune variation de l'expression des gènes codant pour les Toll Like Receptor 2, 4 et 5, pour les facteurs de transcription NF- κ B1, NF- κ BIA ainsi que les gènes codant pour les interleukines 8 et 10, impliquées dans les mécanismes de réponse aux infections, n'a été détectée entre les deux génotypes.

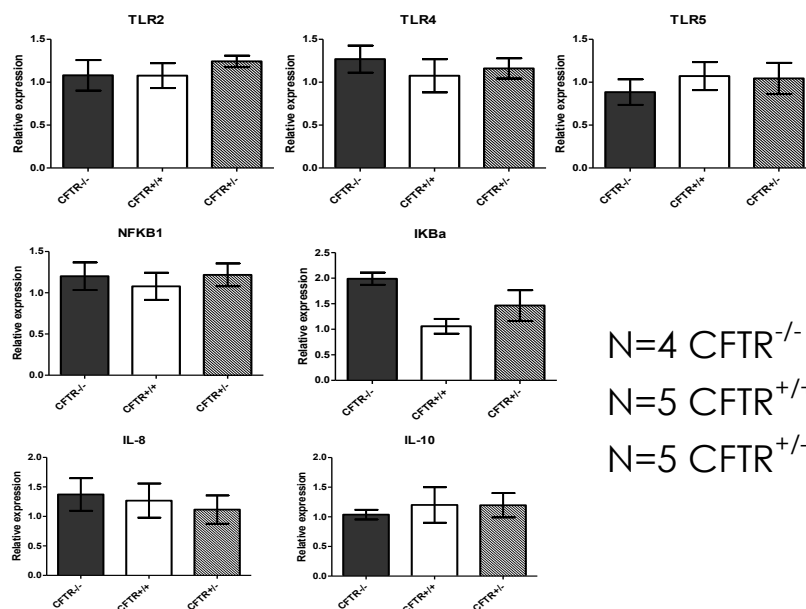


Figure 65. Analyse en qPCR de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation. Le niveau d'expression des gènes TLR2, TLR4, TLR5, NFKB1, NFKBIA, IL-8 et IL-10 a été mesuré par RT-qPCR, à partir de tissus prélevés au niveau du carrefour bronchique des porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} dès la naissance.

IV. Analyse transcriptomique des poumons de porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} à la naissance

Afin d'élucider les mécanismes moléculaires aboutissant à l'augmentation de sialylation des mucines constatée à la naissance chez les porcelets CFTR^{-/-}, nous avons entrepris de comparer les transcriptomes des carènes bronchiques issues de 5 CFTR^{-/-} et 5 CFTR^{+/+} par RNAseq (travail réalisé par l'équipe du Dr Barbry). Le transcriptome des poumons de 5 porcelets CFTR^{-/-} et 4 CFTR^{+/+} infectés par *P. aeruginosa* a également été analysé dans cette étude (Figure 66).

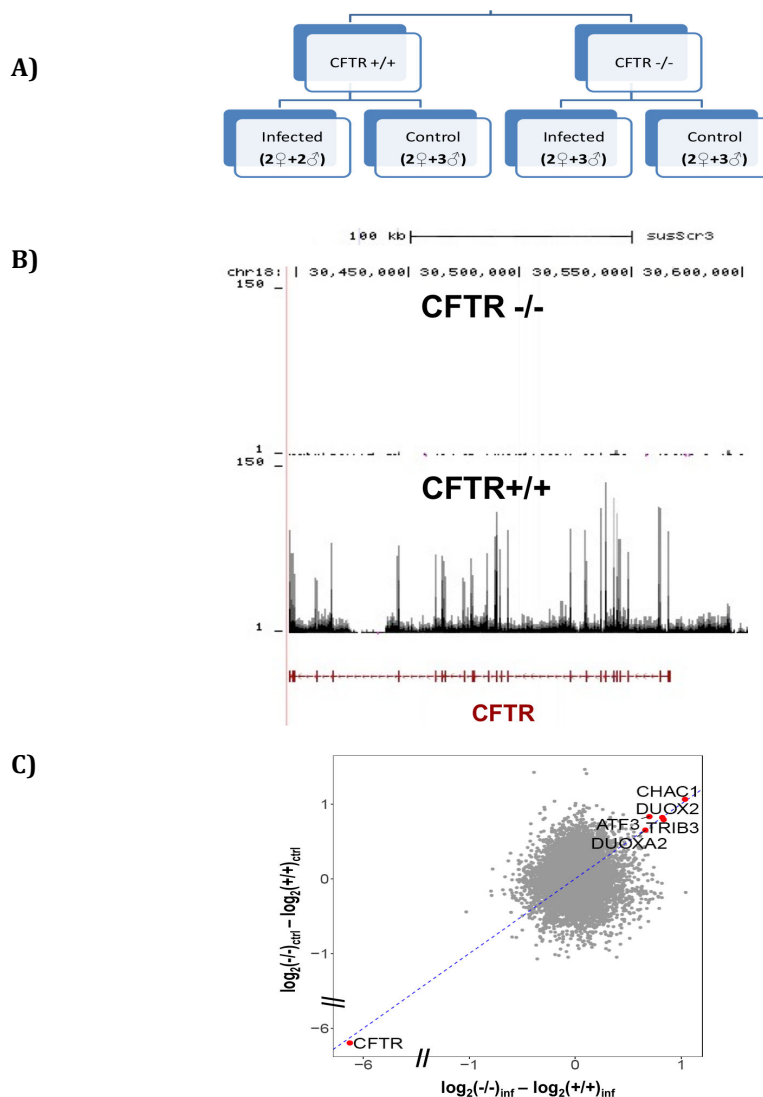


Figure 66. Analyse transcriptomique des poumons de porcelets nouveau-nés. (A) Représentation schématique du plan d'expérience. (B) Analyse RNAseq dans le locus CFTR chez les porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} confirmant l'absence de l'ARNm codant pour CFTR chez les porcelets CFTR^{-/-}. (C) Corrélation entre le $\log_2(\text{CFTR}^{-/-}/\text{CFTR}^{+/+})$ chez les porcelets non infectés (vertical) et infectés par *P. aeruginosa* (horizontal).

De façon surprenante, seule l'expression du gène codant pour le canal CFTR est fortement impactée chez les porcelets CFTR^{-/-} (Figure 66). Cependant nous avons pu observer une expression plus forte de certains transcrits tels que TRIB3, CHAC1 et DUOX2 chez les porcelets CFTR^{-/-} infectés ou non par *P. aeruginosa* qui pourraient collectivement contribuer au développement d'un phénotype pro-inflammatoire. CHAC1 (p=0.004) et TRIB3 (p=0.02) codent pour deux protéines impliquées dans la réponse UPR (unfolded protein response) dont le but est d'augmenter les capacités de repliement, de maturation, voire de dégradation du réticulum endoplasmique (Mungrue *et al.* 2009). Une corrélation entre le phénotype CF et la réponse UPR a déjà été rapportée précédemment (Blohmke *et al.* 2012). CHAC1 affecte le niveau de glutathion et peut ainsi jouer un rôle dans la balance oxydante (Crawford *et al.*, 2015).

Nous avons également observé une augmentation du niveau d'expression de DUOX2 (p=0.06), une importante NADPH oxydase produisant du H₂O₂ dans les tissus des voies aériennes (Fischer, 2009). DUOX2 génère de l'hypothiocyanite (OSCN⁻) qui est un composé antimicrobien sous l'action d'une lactoperoxydase (LPO). L'efficacité de ce système de défense dépend de l'activité du canal CFTR pour fournir du thiocyanate, qui est le substrat de la LPO (Figure 67).

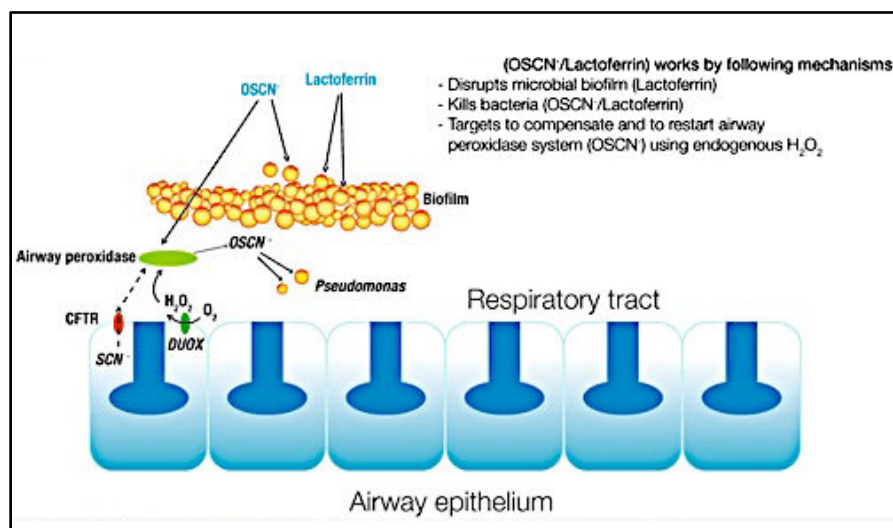


Figure 67. Représentation schématique du système de défense antimicrobienne DUOX/LPO dans les poumons.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les poumons et la trachée des porcelets CFTR^{-/-} se trouveraient en condition de stress oxydant. Cependant ces effets n'ont été mesurés qu'au niveau ARNm et restent à confirmer.

V. L'ascenseur muco-ciliaire est incapable d'éliminer *Pseudomonas aeruginosa* chez les porcelets CFTR^{-/-} à la naissance

Ce travail a été réalisé à l'INRA de Nouzilly en collaboration avec l'équipe du Dr Ignacio Caballero.

1. Evaluation de l'efficacité du transport muco-ciliaire *in vivo*

Dans notre étude, nous avons évalué l'efficacité du transport muco-ciliaire à éliminer la bactérie *P. aeruginosa* en inoculant le carrefour bronchique des porcelets nouveau-nés avec la souche PAK-Lux de *P. aeruginosa* luminescente.

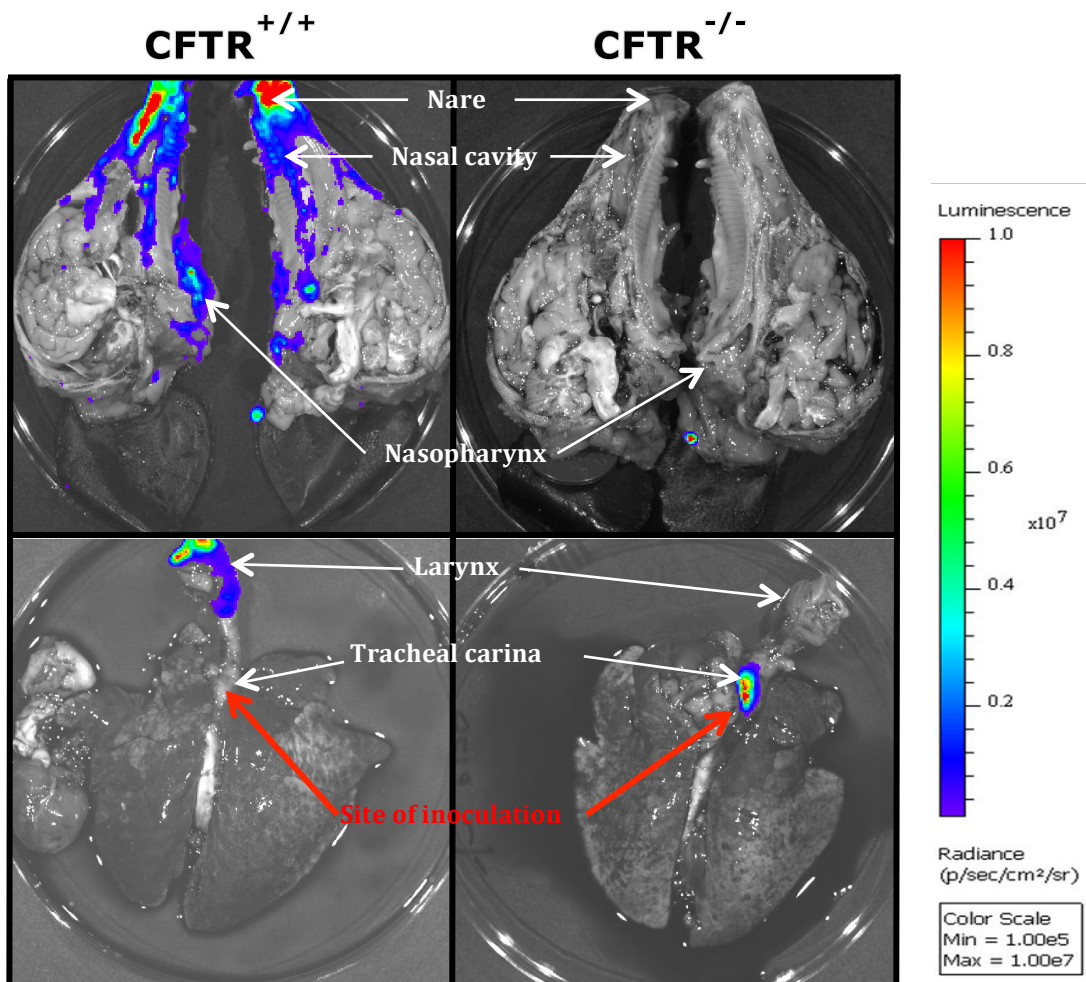


Figure 68. Le transport muco-ciliaire est inefficace chez les porcelets CFTR^{-/-}. *P. aeruginosa* est observée dans le larynx et le pharynx des porcelets CFTR^{+/+} pour être éliminée par les narines alors que le pathogène reste au point d'infection chez les porcelets CFTR^{-/-}.

Les poumons des nouveau-nés, une fois prélevés, ont été imagés immédiatement à l'aide d'un IVIS spectrum (Figure 68). Les faces antérieures et postérieures du poumon ont été exposées à la caméra et la bioluminescence a été capturée avec des temps d'intégration allant de quelques secondes à 5 minutes. Une coupe sagittale de la tête du porcelet a été effectuée et les 2 moitiés ont été exposées à la caméra aux mêmes temps d'exposition que pour les poumons.

Les analyses ont été réalisées 3 fois et montrent clairement des différences de localisation *ex-vivo* de la bactérie dans les voies respiratoires entre les deux génotypes. *P. aeruginosa* est principalement retrouvée dans le larynx, le pharynx et le museau des CFTR^{+/+} suggérant un transport muco-ciliaire fonctionnel et efficace. En revanche, chez les CFTR^{-/-}, *P. aeruginosa* reste localisée dans la trachée au niveau du site d'infection.

2. Evaluation de l'efficacité du transport muco-ciliaire *ex vivo*

La dynamique de déplacement de *P. aeruginosa* a également été évaluée *ex-vivo* en utilisant trois explants de trachées de chaque génotype. Après inoculation de celles-ci avec la souche PAK-Lux fluorescente de *P. aeruginosa*, les explants ont été imagés à l'aide d'un IVIS spectrum (Figure 69).

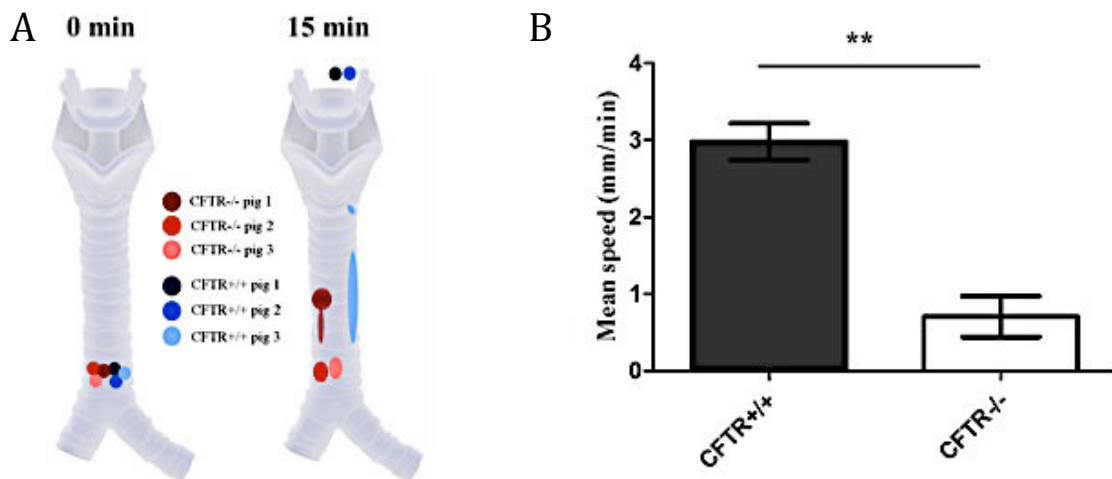


Figure 69. Suivi par imagerie bioluminescente de la souche PAK-Lux sur des explants de trachée de porcelets. (A) Représentation schématique de la distribution de *P. aeruginosa* avant et après 15 minutes d'infection. Chaque point représente le pathogène sur différents porcelets. Deux des porcelets CFTR^{+/+} (1 et 2) avait déjà éliminé le pathogène avant la fin de l'étude. (B) Vitesse moyenne d'élimination de *P. aeruginosa* au niveau des explants de trachées. ** p<0.01, Student's *t*-test.

Comme pour les résultats obtenus *in vivo*, les CFTR^{-/-} présentent une diminution significative de la clairance bactérienne et de la vitesse moyenne de déplacement de la bactérie. Ces observations nous indiquent un défaut majeur dans la clairance muco-ciliaire engendrant un impact sur la colonisation des voies respiratoires par *P. aeruginosa* chez les patients CFTR^{-/-}.

Etude des mécanismes moléculaires induisant l'hypersialylation des mucines trachéales des porcelets CFTR^{-/-}

I. L'hypoxie peut-elle altérer la glycosylation des mucines respiratoires ?

La conséquence d'un dysfonctionnement de CFTR étant un défaut d'exportation des ions HCO₃⁻ induisant une acidification du milieu extracellulaire, nous avons cherché à vérifier si ce processus d'acidification jouait un rôle dans les changements de glycosylation du mucus. Pour cela nous avons placé des porcs sous hypoventilation de façon à induire une hypoxie conduisant elle aussi à une acidification du liquide péri-ciliaire (ASL). Les résultats obtenus en comparant la glycosylation des mucines de deux cochons normalement ventilés à celui d'un cochon hypo-ventilé ne semblent pas indiquer de changement significatif de la sialylation induit par ce traitement (Figure 70).

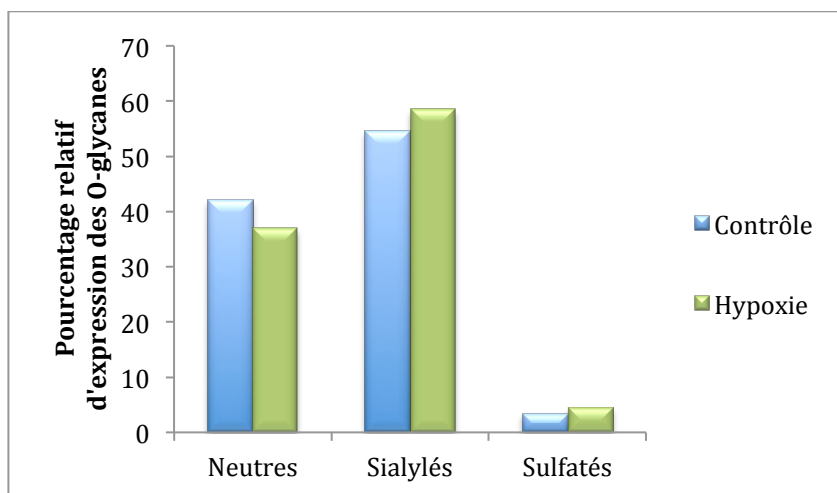


Figure 70. Glycosylation des LBA de porcs CFTR^{+/+} placés ou non sous hypoventilation. Pourcentage relatif d'expression des O-glycanes neutres, sialylés et sulfatés portés par les mucines purifiées à partir des LBA de porcs adultes placés ou non sous-hypoventilation pendant 6h.

Les structures sialylées représentent respectivement 54,6% et 58% des O-glycanes totaux chez les porcs contrôle et hypoventilé. Cette étude a été faite sur des porcs adultes CFTR^{+/+} et sur un petit nombre d'échantillons. Les mucines des porcs adultes sont plus sialylées que celles des porcelets à la naissance. Ce résultat est cohérent avec ce qui est décrit chez

l'homme (Walther *et al.*, 2013). Les mucines étant déjà fortement sialylées chez nos porcs contrôle, il se peut que l'effet éventuel de l'hypoxie n'ait pas été très marqué. Cependant il ne nous a pas paru pertinent de refaire les manipulations sur des porcelets pour observer une éventuelle augmentation de la sialylation.

II. Régulation du niveau d'expression des sialyltransférases

Une des hypothèses pour expliquer l'augmentation de sialylation des mucines est une régulation du niveau d'expression génique et/ou protéique des sialyltransférases impliquées dans la biosynthèse des structures glycaniques sialylées. Une liste de 23 gènes humains codant pour des sialyltransférases a été extraite de la base de données CAZY, ce qui a permis d'identifier 21 gènes orthologues chez le porc (*Sus scrofa*) (Tableau 9).

Tableau 9. Comparaison du niveau d'expression des gènes codant pour les sialyltransférases dans les poumons de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} infectés ou non par *P. aeruginosa*.

ANNOTATIONS		Reads	-/- vs +/+		-/- vs +/+, infected		+/, infected vs ctrl		-/-, infected vs ctrl	
Label	Geneid		log2FC	adjusted p-value	log2FC	adjusted p-value	log2FC	adjusted p-value	log2FC	adjusted p-value
ST3GAL1	ENSSSCG00000005943	1073	0.31	1.00	0.21	0.81	0.68	0.01	0.58	0.02
ST3GAL2	ENSSSCG00000025089	156	0.12	1.00	-0.50	0.45	-0.15	0.71	-0.76	<0.01
ST3GAL3(1)	ENSSSCG00000023597	30	0.15	1.00	0.08	0.95	0.11	0.80	0.03	0.92
ST3GAL3(2)	ENSSSCG00000029461	33	-0.02	1.00	-0.39	0.64	0.38	0.31	0.01	0.98
ST3GAL4	ENSSSCG00000015232	1074	-0.05	1.00	0.03	0.98	-0.33	0.15	-0.25	0.21
ST3GAL5	ENSSSCG00000008227	30	-0.11	1.00	-0.12	0.92	-0.76	0.01	-0.77	0.01
ST6GAL1	ENSSSCG00000025770	1610	-0.25	1.00	-0.11	0.93	0.08	0.88	0.21	0.53
ST6GAL2	ENSSSCG00000008141	31	-0.29	1.00	0.08	0.95	-0.16	0.72	0.22	0.53
ST6GALNAC1	ENSSSCG00000017172	598	-0.21	1.00	0.17	0.85	0.32	0.28	0.69	<0.01
ST6GALNAC2	ENSSSCG00000017177	925	-0.04	1.00	0.26	0.61	-0.65	<0.01	-0.36	0.05
ST6GALNAC4	ENSSSCG00000005628	281	0.18	1.00	-0.44	0.45	0.42	0.13	-0.20	0.46
ST6GALNAC6	ENSSSCG00000005623	309	0.11	1.00	-0.39	0.52	-0.04	0.92	-0.55	0.02
ST8SIA4	ENSSSCG00000014180	759	-0.02	1.00	0.01	0.99	-0.37	0.04	-0.34	0.03

Par analyse RNAseq, 13 de ces transcrits ont été détectés mais nous n'avons pas observé de différence significative d'expression entre les deux génotypes. Après infection par *P. aeruginosa*, les niveaux d'expression des ST3GAL1 et ST6GALNAC1 étaient légèrement augmentés chez les porcelets CFTR^{-/-} alors que les ST3GAL2, ST3GAL5 et ST6GALNAC6 étaient diminués.

Nous avons également évalué le niveau d'expression génique des sialyltransférases ST6GALNAC1 et ST3GAL1 par RT-PCR quantitative. Ces sialyltransférases greffent respectivement un résidu de NeuAc en α 2,6 sur la GalNAc du point d'attache ou en α 2,3 sur un résidu de Gal et sont impliquées dans la biosynthèse du sialyl-TF et sialyl-Tn qui sont majoritairement retrouvés au niveau des mucines pulmonaires de porcelets. L'analyse par qPCR confirme qu'il n'y a pas de variation significative de l'expression génique de ces sialyltransférases entre les deux génotypes (Figure 71).

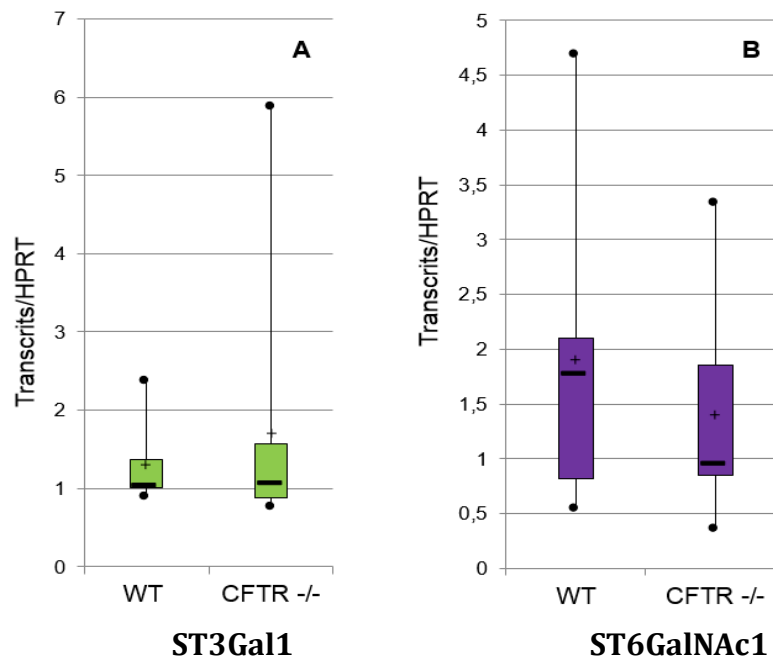


Figure 71. Etude de l'expression des sialyltransférases ST3Gal1 et ST6GalNAc1 chez les porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+}.

La quantification des éventuelles variations d'expression protéique de ces sialyltransférases après broyage des tissus de poumons et trachées puis séparation des protéines par SDS/PAGE n'a pas non plus permis de mettre en évidence des différences d'expression entre les 2 génotypes.

L'augmentation de la sialylation observée chez les porcelets CFTR^{-/-} n'est donc pas en corrélation avec une variation de l'expression des sialyltransférases ST3Gal1 et ST6GalNAc1.

III. L'activité du canal CFTR peut-elle réguler la glycosylation des mucines respiratoires ?

Pour évaluer le rôle de l'activité des canaux CFTR sur la glycosylation des mucines, nous avons testé deux inhibiteurs de CFTR, GlyH-101 et CFTR_{inh-172}. La glycine hydrazide (GlyH-101) bloque le canal CFTR en position ouverte. Le composé entre depuis la partie extracellulaire du pore pour bloquer le canal, il est soluble dans l'eau et actif à faible concentration (Muanprasat *et al.* 2004). Au contraire, l'effet du thiazolidinone (CFTR_{inh-172}) passe par une stabilisation de l'état fermé du canal CFTR (Caci *et al.* 2008). Il n'est soluble que dans des solutions salines et présente une efficacité plus faible.

Des explants de trachées de porcelets CFTR^{+/+} ont été traités 24h par ces inhibiteurs de CFTR, puis les mucines de la muqueuse et de la sous-muqueuse ont été purifiées et les O-glycanes analysés par spectrométrie de masse (Figure 72).

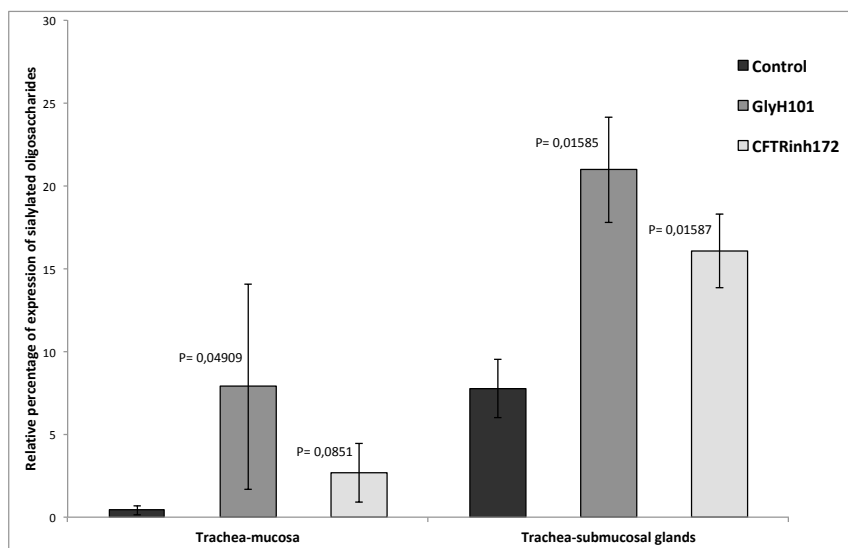


Figure 72. Augmentation de la sialylation des mucines respiratoires après inhibition de l'activité du canal CFTR. Pourcentage relatif de l'expression des O-glycanes sialylés dans des explants de trachées traités ou non avec des inhibiteurs de l'activité du canal CFTR (GlyH101 et CFTR_{inh-172}).

La mesure du taux de structures sialylées dans les glandes sous-muqueuses des deux trachées traitées aux inhibiteurs de CFTR a montré une augmentation de la sialylation d'un facteur 2,7 et 2,1 pour GlyH101 ($p = 0,0158$) et CFTR_{inh-172} ($p = 0,01587$) respectivement, par rapport aux trachées non traitées. Dans la muqueuse, nous avons noté un effet significatif de GlyH101 sur la sialylation ($p = 0,049$) et une légère augmentation, non significative, de la sialylation (p

= 0,0851) avec l'inhibiteur CFTR_{inh-172}. Ces résultats démontrent un effet direct de l'activité du canal CFTR sur la sialylation des mucines dans la mucoviscidose, en l'absence de toute autre modification à la naissance.

Le fait qu'il existe un effet direct entre activité du canal CFTR et sialylation des mucines à la surface de l'épithélium respiratoire peut être expliqué, au moins partiellement, par les découvertes récentes de Montoro *et al.* et Plasschaert *et al.* en 2018 d'un nouveau type cellulaire dans le tractus respiratoire humain et murin. Ces cellules appelées ionocytes pulmonaires s'apparentent aux branchies des poissons et expriment très fortement la protéine CFTR. Elles se situent à la surface de l'épithélium en faible quantité (environ 1% des cellules).

IV. Le stress du réticulum endoplasmique peut-il altérer la glycosylation des mucines respiratoires ?

Les analyses RNAseq ont mis en évidence un lien entre absence de l'expression du gène CFTR et stress du réticulum. Afin de déterminer si ce stress peut expliquer les modifications d'acidité des mucines, nous avons entrepris de traiter des cellules nasales de patients (n=5) avec de la thapsigargine, qui est un inhibiteur des pompes à calcium du réticulum endoplasmique. Nous avons également traité ces cellules par l'inhibiteur CFTR_{inh-172} afin de conforter les résultats obtenus sur les explants de trachées de porcelets. Nous avons ensuite comparé les profils de glycosylation des mucines extraites et purifiées à partir des cellules contrôles et stimulées et nous avons mesuré les variations du taux de sialylation de ces mucines dans les différentes conditions (Figure 73). Les cellules contrôles ont été traitées par du DMSO, qui a été utilisé pour diluer la thapsigargine et le CFTR_{inh-172}. La même augmentation de la sialylation des mucines a été observée après avoir traité les cellules avec de la thapsigargine ou l'inhibiteur de l'activité du canal CFTR.

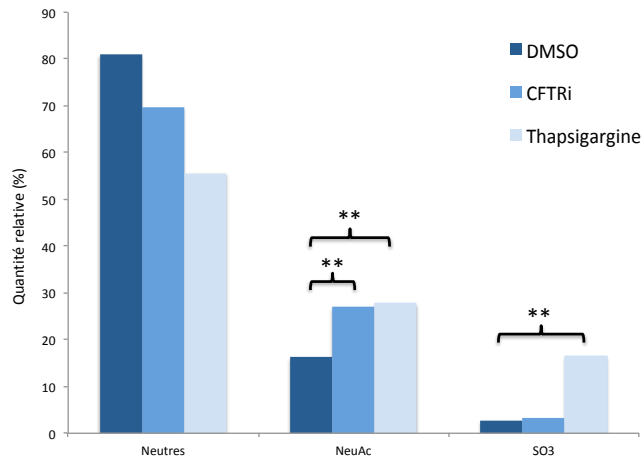


Figure 73. Le stress du réticulum et l'inhibition de l'activité du canal CFTR altèrent la sialylation des mucines. Pourcentage relatif d'expression des O-glycanes neutres, sialylés et sulfatés portés par les mucines purifiées à partir de cellules nasales de patients traitées par de la thapsigargine ou l'inhibiteur CFTRinh-172.

Afin d'évaluer le stress du réticulum, nous avons fixé les cellules nasales dans du paraformaldéhyde puis nous avons marqué les cellules avec un anticorps anti-thioflavine (Figure 74). La thioflavine sert à marquer les vésicules en cas de stress du réticulum. On observe un marquage accru de la thioflavine aussi bien après utilisation de thapsigargine que de l'inhibiteur CFTR_{inh-172}. Ces résultats suggèrent que l'absence de canal CFTR génère un stress du RE dans les cellules qui pourraient être à l'origine des altérations de sialylation des mucines.

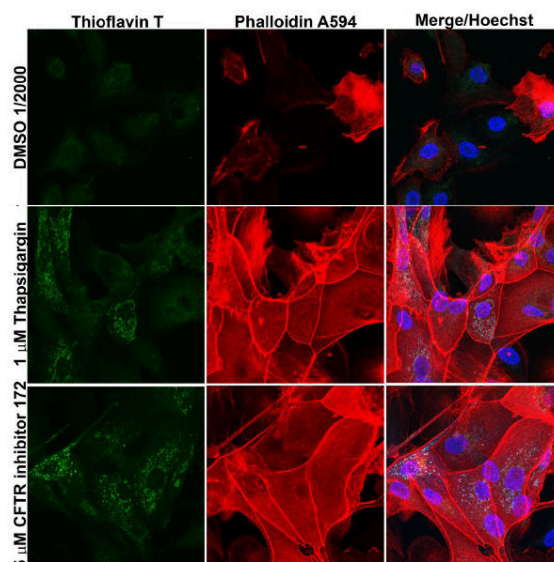


Figure 74. L'inhibition de l'activité du canal CFTR induit un stress du réticulum. Les cellules nasales de patients ont été cultivées à l'interface air-liquide puis traitées pendant 15h avec de la thapsigargine ou le CFTR_{inh-172}. Les cellules fixées ont été marquées par des anticorps anti-thioflavine (vert) et anti-phalloïdine (rouge). Les noyaux sont marqués en bleu.

Les altérations de sialylation des mucines favorisent l'infection des tissus par *Pseudomonas aeruginosa*

I. *Pseudomonas aeruginosa* adhère préférentiellement aux mucines sialylées

Afin de déterminer si la sialylation des mucines du tractus respiratoire pouvait impacter la primo-colonisation de *P. aeruginosa* chez les porcelets CFTR^{-/-}, nous avons réalisé des tests d'adhésion de la bactérie sur des mucines purifiées de porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+}, préalablement infectés ou non par *P. aeruginosa*. En absence d'infection préalable, l'adhésion de la bactérie est beaucoup plus forte sur les mucines des porcelets CFTR^{-/-} que sur celles des CFTR^{+/+}. En revanche, si les porcelets ont préalablement été infectés par *P. aeruginosa*, l'adhésion est forte quel que soit le génotype des animaux (Figure 75).

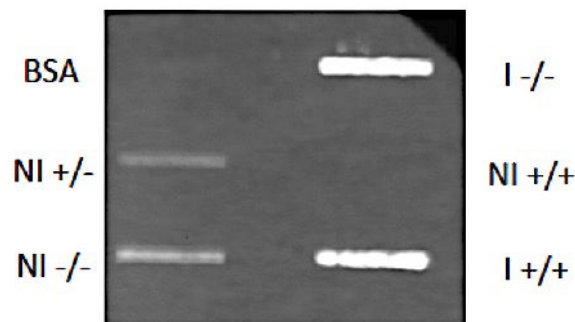


Figure 75. Adhésion de la souche PAO1 de *P. aeruginosa* sur les mucines bronchiques de porcs CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} avant et après infection. *P. aeruginosa* adhère préférentiellement sur les mucines pulmonaires des CFTR^{-/-} infectées.

Afin de confirmer le rôle des acides sialiques dans cette adhésion, les mucines ont été préalablement désialylées chimiquement avant d'évaluer l'adhésion de *P. aeruginosa* sur ces mucines (Figure 76). La capacité d'adhésion de *P. aeruginosa* aux mucines désialylées est fortement diminuée, suggérant un rôle majeur des acides sialiques comme ligands de la bactérie.

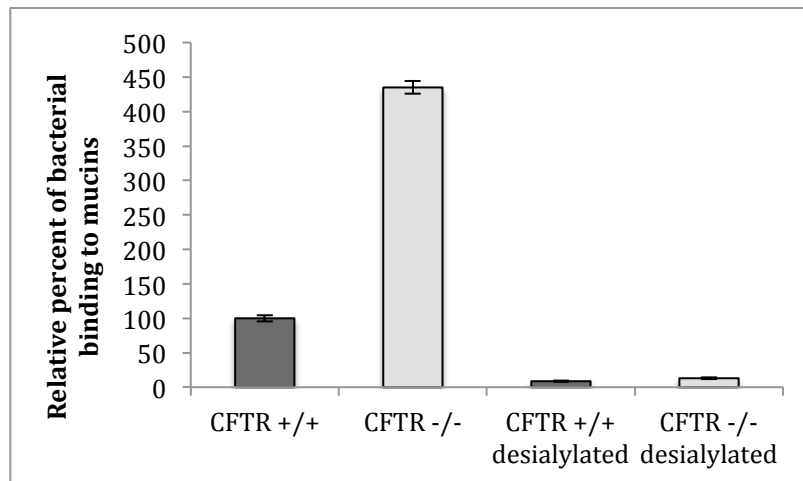


Figure 76. *P. aeruginosa* adhère préférentiellement aux mucines respiratoires sialylées des porcelets CFTR^{-/-}. Une perte d'adhésion est observée après désialylation chimique des mucines.

II. *Pseudomonas aeruginosa* croit préférentiellement dans des cellules épithéliales bronchiques issues de porcelets CFTR^{-/-}

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Ignacio Caballero.

1. Validation du modèle de culture primaire de cellules épithéliales bronchiques des porcelets CFTR^{-/-}

Un modèle de cultures primaires polarisées de cellules épithéliales bronchiques issues de 5 porcelets CFTR^{-/-} et 3 CFTR^{+/+}, cultivées à l'interface air-liquide, a été développé. Nous avons observé une augmentation de la résistance électrique transépithéliale, passant de 300 Ω cm² en début de culture jusqu'à 4000 Ω cm², suggérant la formation de jonctions cellulaires fortes. La différenciation des cellules en épithélium a été évaluée par la présence de cils et de mucus à l'aide d'anticorps dirigés contre la β-Tubuline-Cy3 et MUC5AC. Les jonctions épithéliales ont été marquées par l'anticorps ZO-1. Au début de la culture (J5), un marquage léger et diffus de ZO-1 est observé dans le cytoplasme des cellules. Le marquage s'intensifie jusqu'au jour 15 et se localise au niveau des jonctions cellulaires. Un anticorps anti-cytokératine a été utilisé pour vérifier que l'épithélium n'était pas contaminé par des cellules d'une autre origine (Figures 77 et 78).

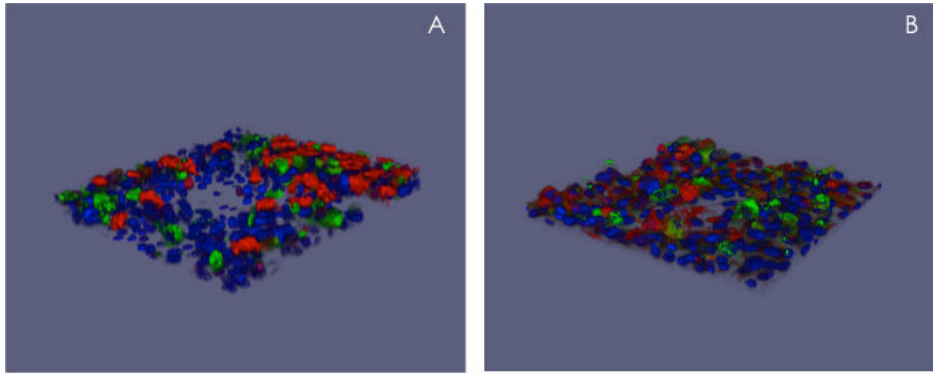


Figure 77. Reconstitution 3D de cultures primaires de cellules pulmonaires polarisées issues de poumons de porcelets $CFTR^{-/-}$ (A) ou $CFTR^{+/+}$ (B). Les cellules sont cultivées à l'interface air-liquide. Les cellules ont été fixées puis marquées avec des anticorps anti tubuline (rouge) et anti MUC5AC (vert). Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu).

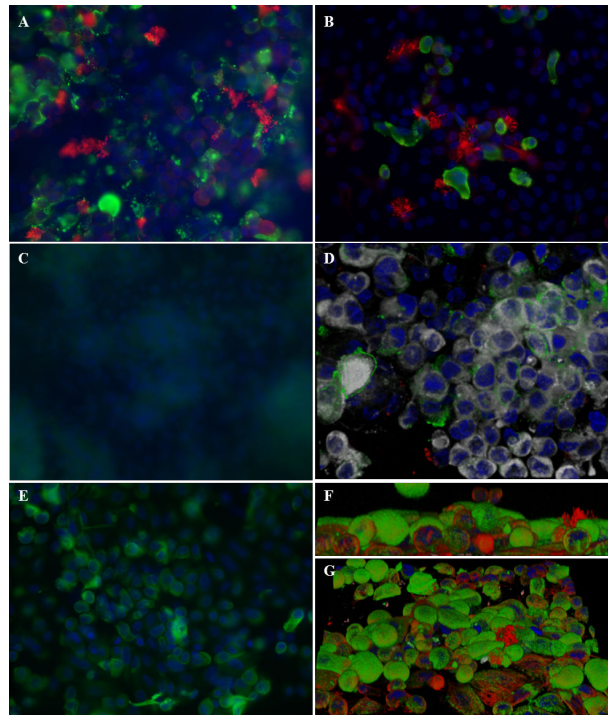


Figure 78. Immunofluorescence de cellules polarisées différenciées de porcelets $CFTR^{-/-}$ et $CFTR^{+/+}$ cultivées en condition air-liquide. (A) et (B) Immunomarquage des cellules épithéliales bronchiques (400x) des porcelets $CFTR^{-/-}$ (A) et $CFTR^{+/+}$ (B) après 5 jours de culture. L'expression des cils et des mucines a été observée à l'aide d'anticorps anti- β -Tubuline-Cy3 (rouge) et anti-MUC5AC (vert), respectivement. (C) et (D) $CFTR^{-/-}$ (C, 400x) et $CFTR^{+/+}$ (D, 630x) Les jonctions épithéliales ont été visualisées à l'aide d'un anticorps anti-human ZO-1 (vert). Les cellules ont été marquées au DAPI (bleu) et au CellMask (blanc) pour visualiser les noyaux cellulaires et le cytoplasme. (E) L'absence de contamination par d'autres types cellulaires est confirmée par un marquage avec un anti-cytokératine (vert) (400x). (F) et (G) Reconstitution 3D de l'épithélium respiratoire après 15 jours sous culture air-liquide. Les cellules ont été marquées au DAPI (bleu), avec un anti-cytokératine (vert) et un anti- β -Tubuline-Cy3 (rouge) (630x).

2. Croissance de *Pseudomonas aeruginosa* dans les cellules épithéliales

Nous avons ensuite déterminé si le taux de croissance bactérienne était différent entre les 2 génotypes, ce qui suggérerait des altérations du système de défense immunitaire inné de l'hôte. Comme le montre la figure 79, la croissance de la souche PAKlux de *P. aeruginosa* est significativement plus faible dans les cellules épithéliales bronchiques CFTR^{+/+}, par rapport aux CFTR^{-/-} (p<0.05).

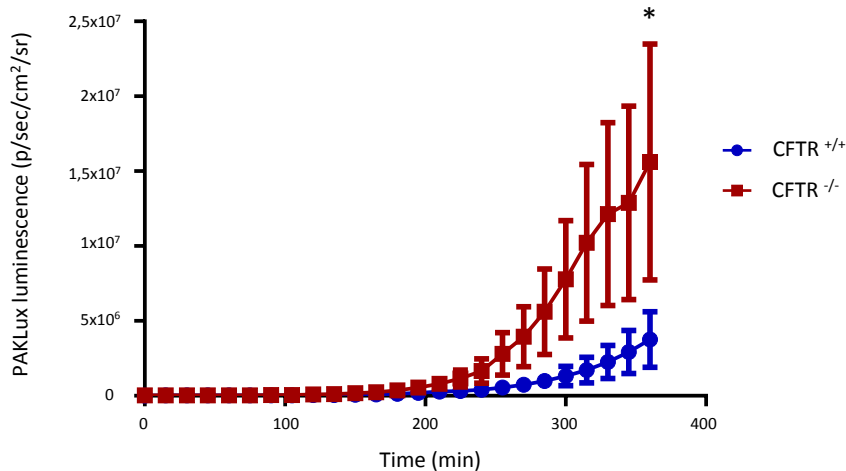


Figure 79. Suivi de la croissance de *P. aeruginosa* sur cellules épithéliales différenciées par imagerie bioluminescente de la souche PAK-Lux.

III. Modifications de la sialylation et de la sécrétion des mucines en réponse à l'infection

Les porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} ont été infectés *in vivo* par *P. aeruginosa*. Après avoir vérifié l'efficacité de l'infection, nous avons caractérisé les altérations biochimiques du mucus et étudié le transcriptome des poumons de porcelets infectés.

1. Validation du modèle d'infection des porcelets par *Pseudomonas aeruginosa*

L'infection des porcelets a tout d'abord été confirmée par coloration HE des lames de tissus de poumon et de trachée infectés par la souche PAK de *P. aeruginosa* (Figure 80).

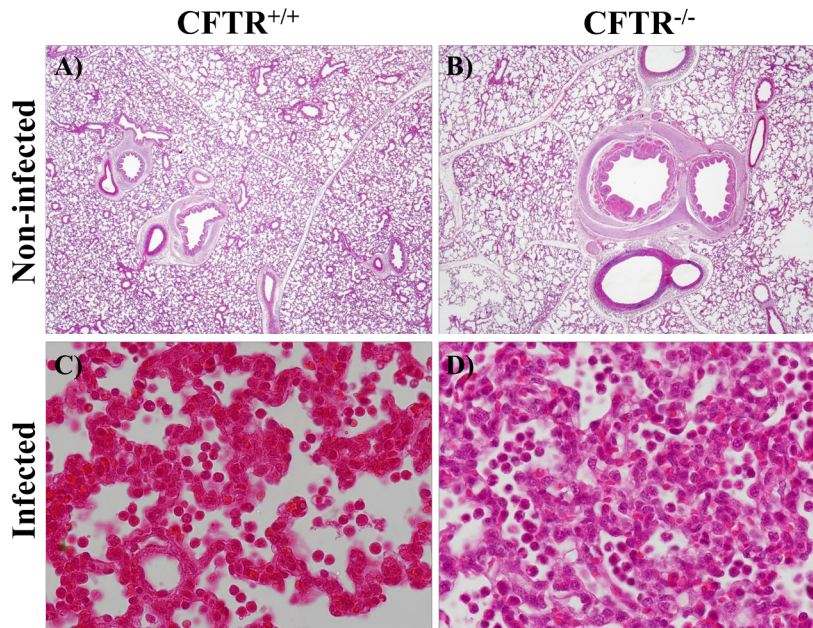


Figure 80. Coloration HE des tissus de poumons et de trachées des porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} infectés. (A) et (B) Coupe de poumons (20x) de porcelets non infectés CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} montrant l'absence de cellules immunitaires. (C) et (D) Coupe de poumons (600x) de porcelets infectés CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} indiquant une réponse inflammatoire avec la présence de leucocytes, principalement des neutrophiles dans les espaces alvéolaires.

Après infection, les tissus des porcelets des deux génotypes présentent une très forte inflammation avec présence de leucocytes, majoritairement des polynucléaires neutrophiles, dans les alvéoles.

La réponse inflammatoire après inoculation de *P. aeruginosa* au niveau du carrefour bronchique des porcelets a également été analysée par RT-PCR quantitative des gènes codant pour des cytokines et interleukines pro-inflammatoires et dosage ELISA des cytokines pro-inflammatoires et comparée entre les deux génotypes (Figure 81).

Aucune modification majeure n'a été observée entre les deux génotypes à l'exception d'une légère augmentation de l'expression de l'IL-8 dans les lavages broncho-alvéolaires des porcelets CFTR^{-/-}. La réponse inflammatoire n'est donc pas affectée par le phénotype CFTR^{-/-}.

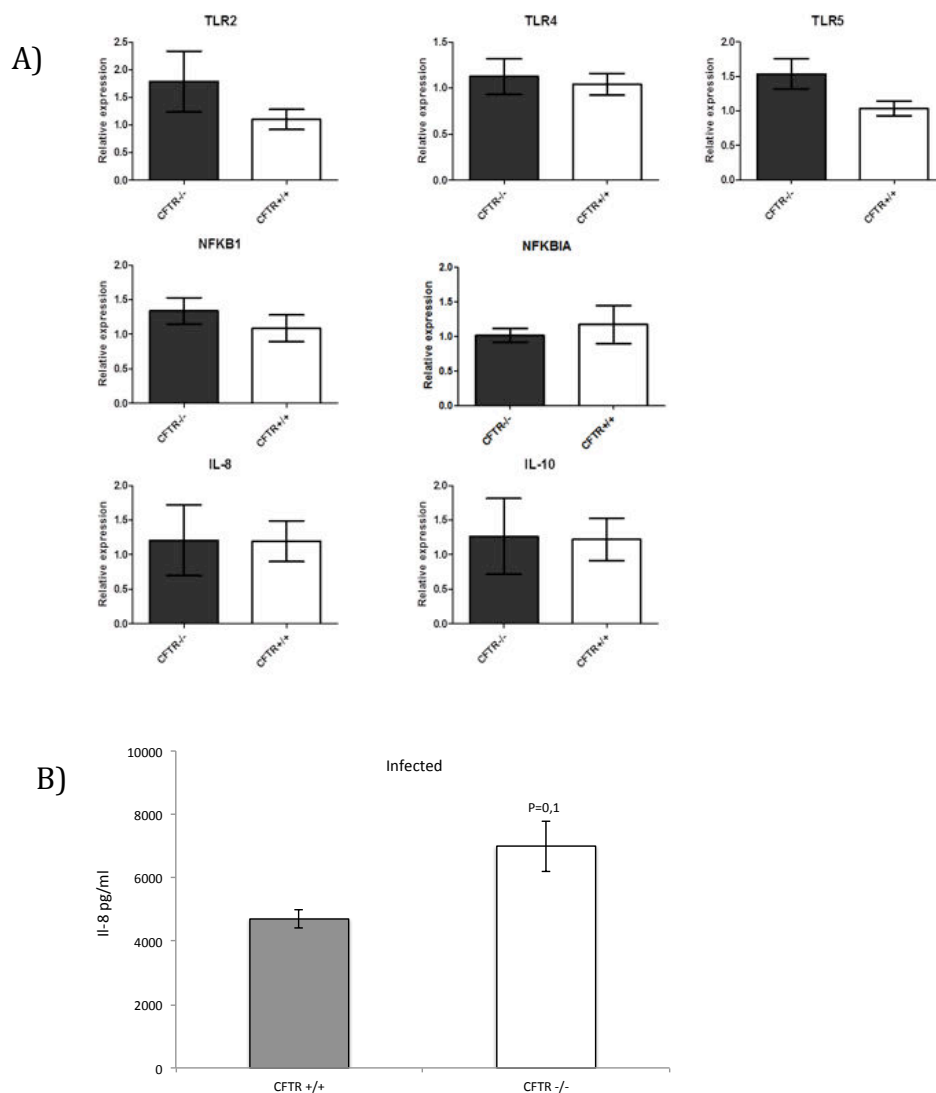


Figure 81. La réponse inflammatoire à l'infection par *P. aeruginosa* n'est pas affectée par le génotype. (A) Analyse en qPCR en temps réel de l'expression des gènes TLR2, TLR4, TLR5, NFKB1, NFKBIA, IL-8 et IL-10 au niveau du carrefour bronchique des porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} après infection par *P. aeruginosa*. (B) Dosage ELISA de la quantité d'IL-8 dans les BAL des porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}.

2. Analyse transcriptomique de la réponse inflammatoire des poumons des porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} après infection par *Pseudomonas aeruginosa*

Nous avons comparé le transcriptome des poumons de porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} infectés par *P. aeruginosa* afin d'évaluer l'impact du génotype sur la réponse inflammatoire suite à l'infection (Figure 82). Nous n'avons pas observé de différence significative du niveau d'expression des gènes impliqués dans la réaction inflammatoire.

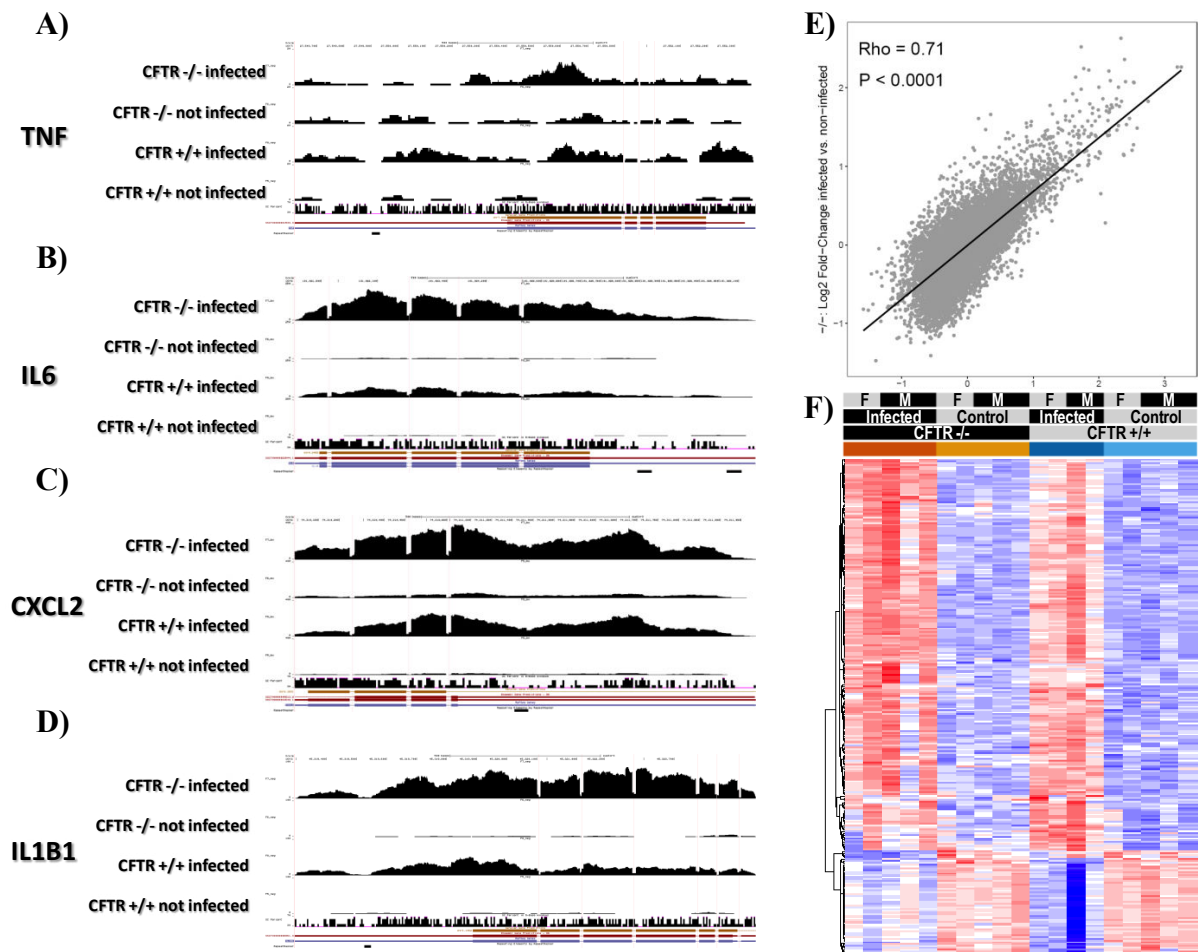


Figure 82. Réponse transcriptionnelle des poumons de porcelets $CFTR^{-/-}$ suite à l'infection par *P. aeruginosa*. (A-D) Analyse RNAseq (échelle de lecture verticale) dans les locus génomiques TNF (A), IL-6 (B), CXCL2 (C) et IL1B1 (D) chez les porcelets $CFTR^{-/-}$ et $CFTR^{+/+}$ infectés ou non. (E) Log_2 (infecté/contrôle) entre les porcelets $CFTR^{+/+}$ (horizontal) et $CFTR^{-/-}$ (vertical). (F) Heatmap des différences d'expression entre les transcrits des porcelets infectés et non infectés $CFTR^{+/+}$ et $CFTR^{-/-}$.

3. Altérations de la glycosylation des mucines respiratoires des porcelets en réponse à l'infection par *Pseudomonas aeruginosa*

Nous avons comparé la glycosylation des mucines provenant de LBA de porcelets $CFTR^{+/+}$ et $CFTR^{-/-}$ infectés ou non par *P. aeruginosa*. Les LBA ont été collectés six heures après l'infection puis les mucines ont été purifiées et les oligosaccharides libérés et analysés par spectrométrie de masse. De façon surprenante, l'infection par *P. aeruginosa* induit les mêmes altérations de la sialylation des mucines que celles observées de façon constitutive chez le porcelet $CFTR^{-/-}$ à la naissance, à la fois chez les $CFTR^{+/+}$ (de $14 \pm 4,9\%$ des oligosaccharides totaux chez les non infectés à $93,2 \pm 5\%$ chez les infectés) et chez les $CFTR^{-/-}$ (de $51 \pm 6,2\%$ des oligosaccharides totaux chez les non infectés à $72 \pm 4\%$ chez les infectés) (Figure 83).

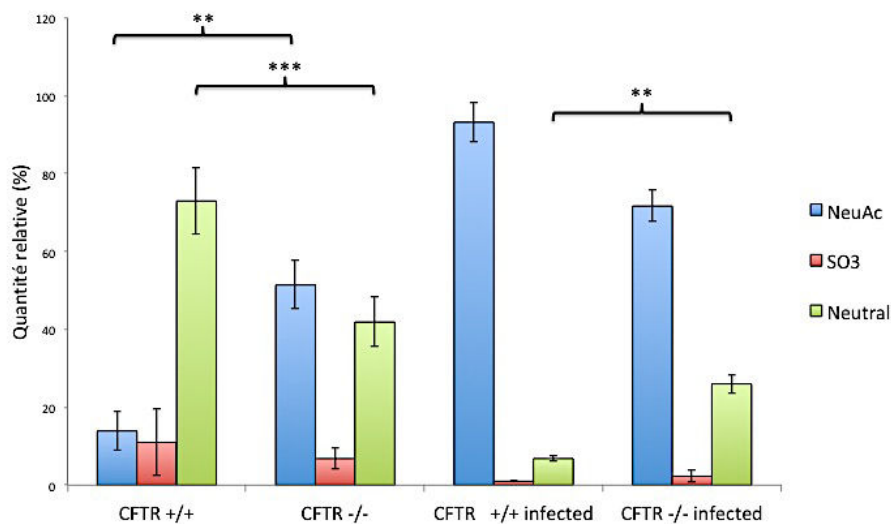


Figure 83. La sialylation des mucines respiratoires des porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} augmente de façon significative en réponse à l'infection par *P. aeruginosa*. Pourcentage relatif des O-glycans sialylés provenant des LBA des porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} infectés par *P. aeruginosa*.

De plus, les O-glycans sialylés dont l'expression augmente fortement chez les CFTR^{+/+} après infection (et chez les CFTR^{-/-}) sont les mêmes que ceux exprimés constitutivement chez les CFTR^{-/-} à la naissance avant infection, autrement dit une augmentation des glycanes à m/z 895, 1140, 1256 et 1344 (Figure 84).

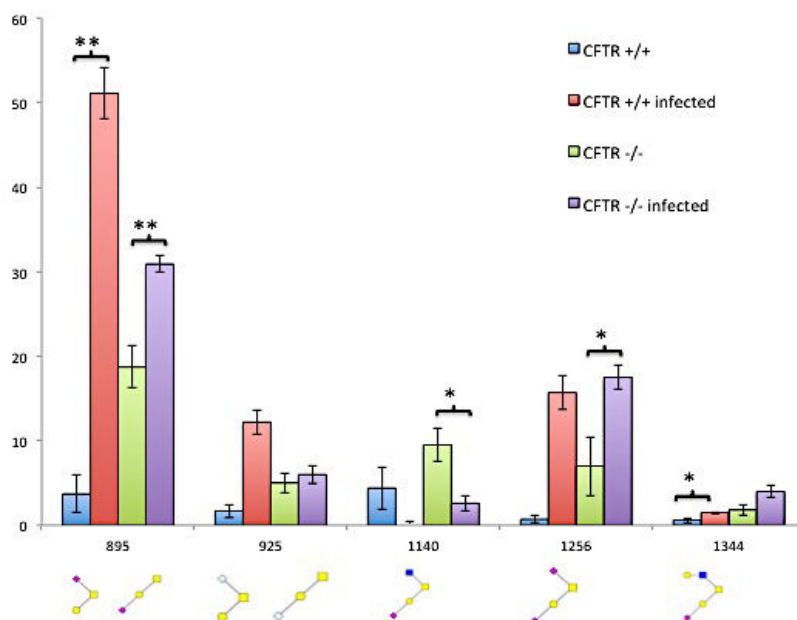


Figure 84. Pourcentage relatif des O-glycans sialylés majoritaires portés par les mucines respiratoires des porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} infectés ou non par *P. aeruginosa*.

Ces travaux suggèrent un rôle majeur des acides sialiques durant le processus de colonisation des voies respiratoires par ce pathogène.

4. Altérations de l'expression des mucines respiratoires des porcelets en réponse à l'infection par *Pseudomonas aeruginosa*

Afin de déterminer si l'infection des tissus respiratoires des porcelets par *P. aeruginosa* modifie l'expression ou la localisation des mucines sécrétées, des marquages immunohistochimiques des mucines MUC5AC et MUC5B ont été effectués sur coupes de tissus (Figure 85).

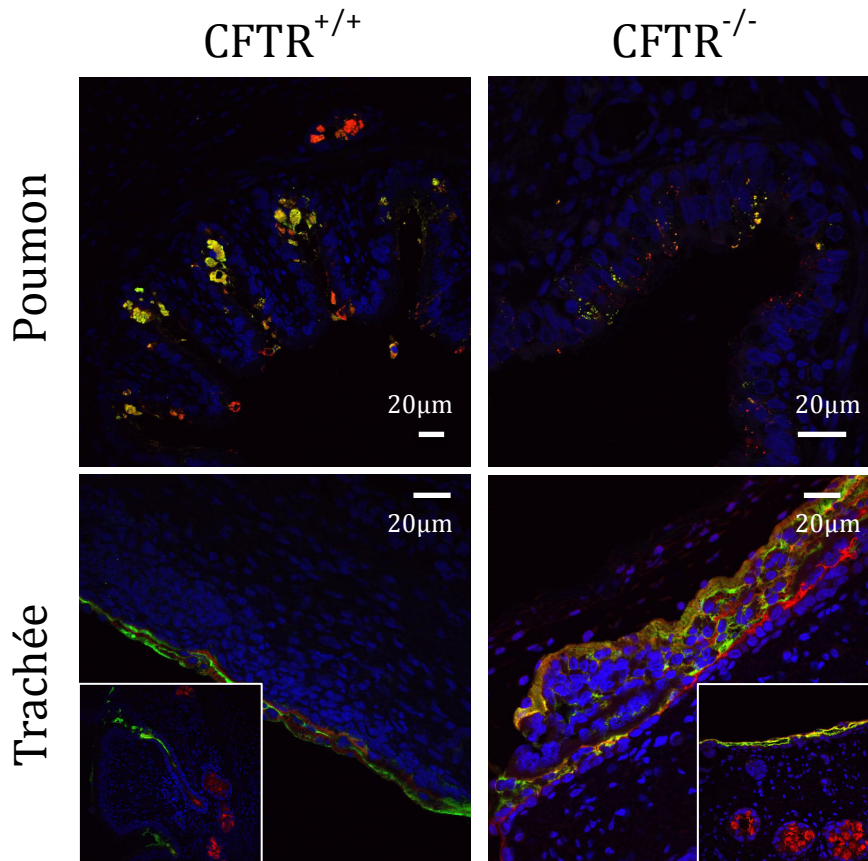


Figure 85. Immunomarquage des mucines MUC5AC (vert) et MUC5B (rouge) sur les tissus de poumon et de trachée de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-} infectés par *P. aeruginosa*.

Aucune délocalisation ou modification de la quantité de mucine n'a été observée au niveau des tissus pulmonaires des porcelets. Par contre, au niveau des trachées, nous avons observé une forte sécrétion des mucines au niveau de la lumière trachéale. Les mucines sécrétées nous semblent recouvrir l'épithélium en formant des strates avec une alternance de MUC5B et MUC5AC. Les mucines ne semblent pas se mélanger et restent bien distinctes.

Ces résultats suggèrent que les mucines sont un moyen de défense des cellules contre les pathogènes car après infection les cellules sont vidées de leur mucus afin de créer une barrière « organisée » pour mieux lutter contre les bactéries.

Caractérisation de la glycosylation et de l'expression des mucines du tractus intestinal des porcelets CFTR^{-/-}

I. Glycosylation des mucines méconiales

Le méconium est un mélange de sécrétions gastro-intestinales et pancréatico-biliaires, de mucus, de débris cellulaires, de cellules desquamées et de liquide amniotique. Dans notre modèle de porcelets CFTR^{-/-}, 100% des porcelets présentent un iléus méconial à la naissance. Notre hypothèse est que les mucines et les oligosaccharides retrouvés dans le méconium pourraient présenter les mêmes altérations de sialylation que celles observées au niveau des mucines bronchiques. Des échantillons de méconium provenant de 10 porcelets CFTR^{+/+} et 15 porcelets CFTR^{-/-} ont été inclus dans l'étude. Les mucines ont été purifiées, les oligosaccharides libérés et analysés par spectrométrie de masse (Figure 86).

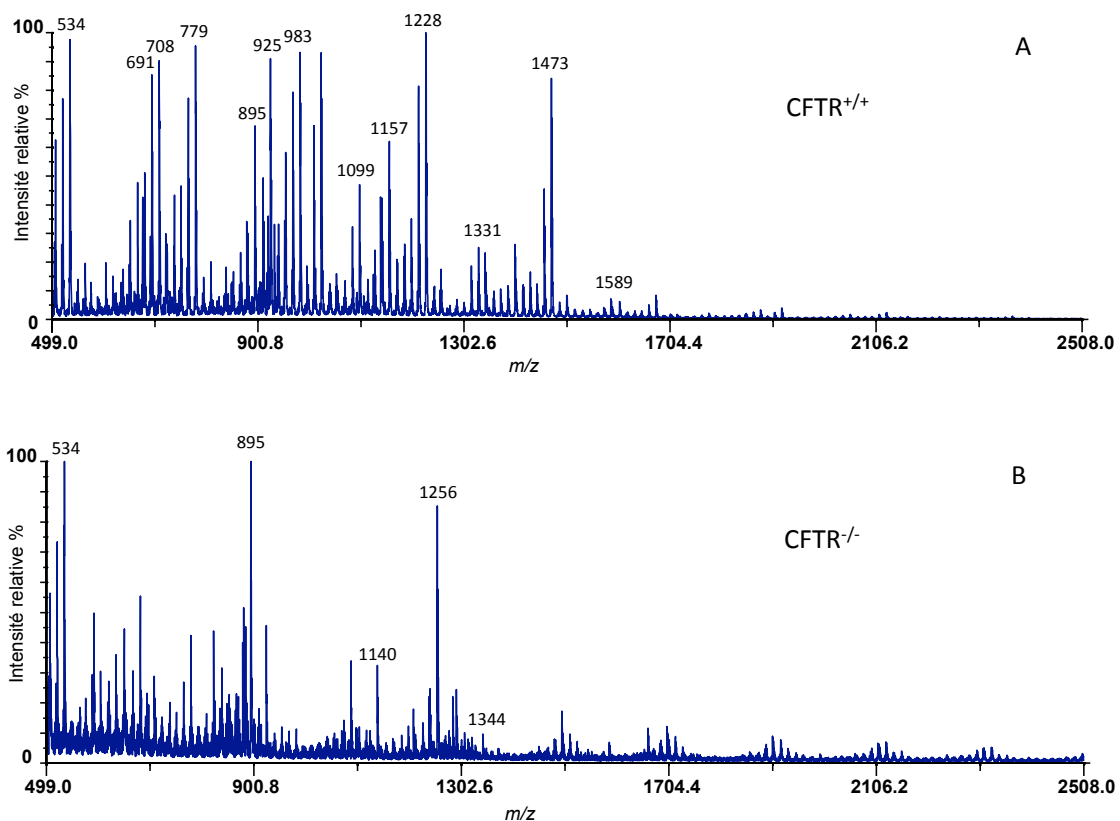


Figure 86. Spectres MS des O-glycanes perméthylés issus des mucines purifiées à partir de méconium de porcelets CFTR^{+/+} (A) et CFTR^{-/-} (B). Les ions détectés correspondent à des ions de type $[M+Na]^+$ ou $[M+2Na-H]^+$ pour les espèces sulfatées.

Les résultats obtenus indiquent des modifications du niveau d'expression de certaines

structures glycaniques mais nous n'avons pas observé d'apparition ou disparition de O-glycanes en fonction du génotype. Comme pour les poumons des porcelets CFTR^{-/-}, nous avons observé une augmentation significative du taux global de sialylation des mucines (Figure 87).

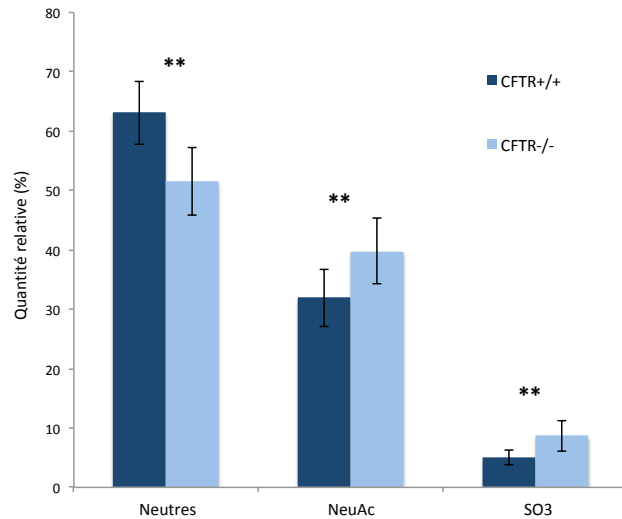


Figure 87. Augmentation significative de la sialylation des mucines dans le méconium des porcelets CFTR^{-/-}. Pourcentage relatif d'expression des O-glycanes neutres, sialylés et sulfatés portés par les mucines purifiées à partir de méconium de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}.

La présence de l'iléus méconial chez les porcelets CFTR^{-/-} pourrait donc être expliqué à la fois par des changements de glycosylation et par un défaut fonctionnel de l'intestin dont le lien avec l'expression du CFTR reste à déterminer.

II. Glycosylation des mucines du côlon et de l'iléon des porcelets CFTR^{-/-}

De même que pour le méconium, nous avons émis l'hypothèse d'une altération de la composition biochimique du mucus intestinal (côlon et iléon) des porcelets CFTR^{-/-} à la naissance, par rapport aux porcelets CFTR^{+/+}. Des prélèvements provenant de côlons et d'iléons de 13 porcelets CFTR^{+/+} et 18 porcelets CFTR^{-/-} ont été inclus. La purification des mucines a été réalisée puis les analyses de glycosylation ont été effectuées (Figures 88 et 89).

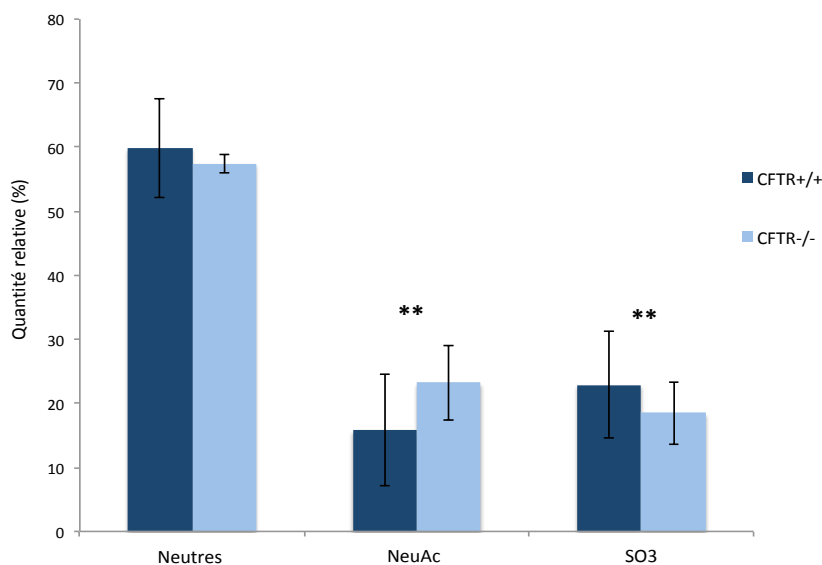


Figure 88. Augmentation significative de la sialylation des mucines dans l'iléon des porcelets CFTR^{-/-}. Pourcentage relatif d'expression des O-glycans neutres, sialylés et sulfatés portés par les mucines purifiées à partir d'iléons de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}.

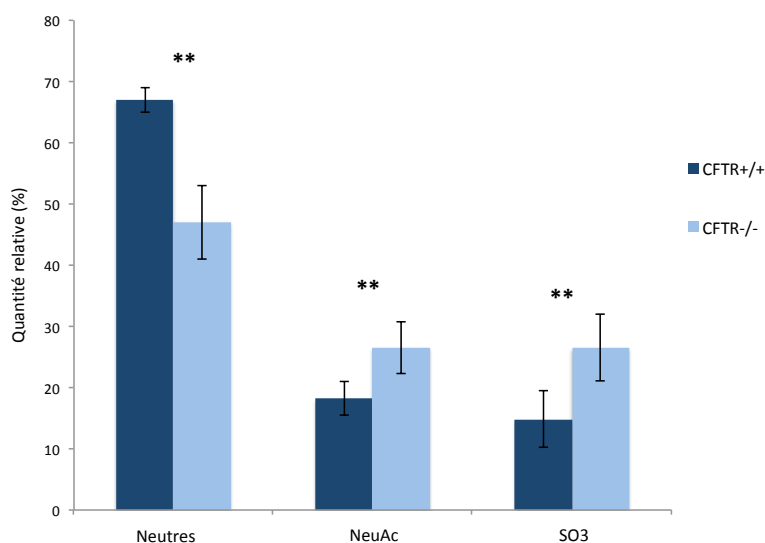


Figure 89. Augmentation significative de la sialylation des mucines dans le côlon des porcelets CFTR^{-/-}. Pourcentage relatif d'expression des O-glycans neutres, sialylés et sulfatés portés par les mucines purifiées à partir de côlons de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}.

Dans l'iléon des porcelets CFTR^{-/-}, l'augmentation significative de la sialylation des mucines est corrélée avec une diminution significative du taux de sulfatation des mucines, le pourcentage de structures neutres n'étant pas affecté.

La situation est différente dans le côlon puisque nous avons observé une augmentation significative à la fois du taux de sialylation et du taux de sulfatation des mucines et une diminution significative du taux de structures neutres.

La sialylation des mucines semble donc être profondément affectée par l'absence d'expression du canal CFTR, et ce dans tout le tractus respiratoire et intestinal. Sachant que les acides sialiques jouent un rôle majeur dans les propriétés rhéologiques et dans la viscosité du mucus, ces altérations présentes dès la naissance pourraient expliquer la présence de bouchons de mucus et d'iléus méconial chez les patients atteints de mucoviscidose.

III. Expression et localisation des mucines du côlon et de l'iléon des porcelets CFTR^{-/-}

1. Coloration PAS/BA des mucines

Des coupes de colons et iléons de porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} ont été colorées au PAS/BA dans le but de visualiser des différences de sialylation des mucines.

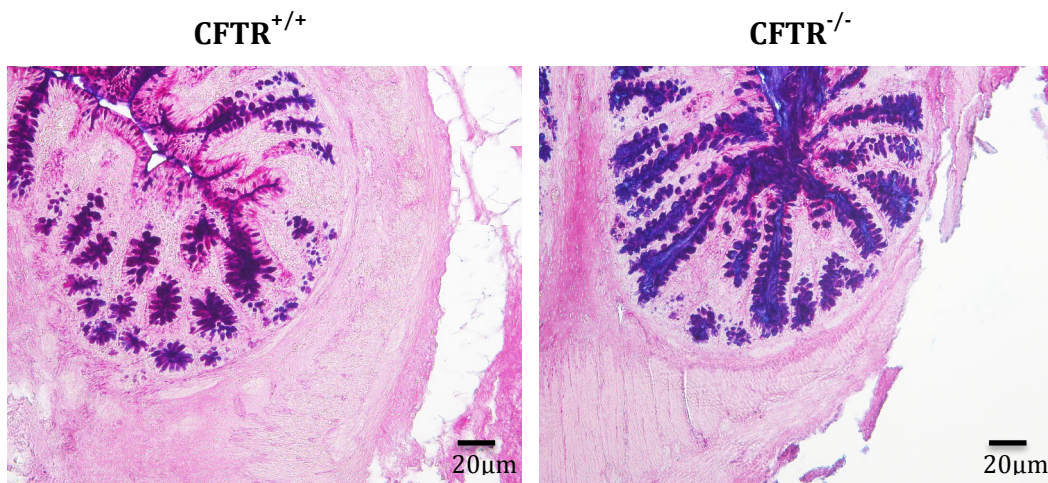


Figure 90. Coloration PAS/BA des côlons de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}

La coloration PAS/BA des coupes de côlon montre une coloration bleue plus marquée au niveau des mucines de l'intestin des porcelets CFTR^{-/-}, par rapport aux mucines des porcelets CFTR^{+/+}, ce qui permet de confirmer les résultats obtenus par spectrométrie de masse (Figure 90). La lumière du côlon des porcelets CFTR^{-/-} est obstruée par du mucus et l'épithélium colique montre une hyperplasie mucineuse.

La coloration bleue spécifique des acides sialiques est également plus prononcée dans l'iléon des porcelets CFTR^{-/-} que dans l'iléon des CFTR^{+/+} (Figure 91). L'épithélium de l'iléon des porcelets CFTR^{+/+} ne présente que quelques rares cellules en gobelet renfermant des mucines, contrairement aux CFTR^{-/-} dont l'épithélium peut présenter une hyperplasie mucineuse.

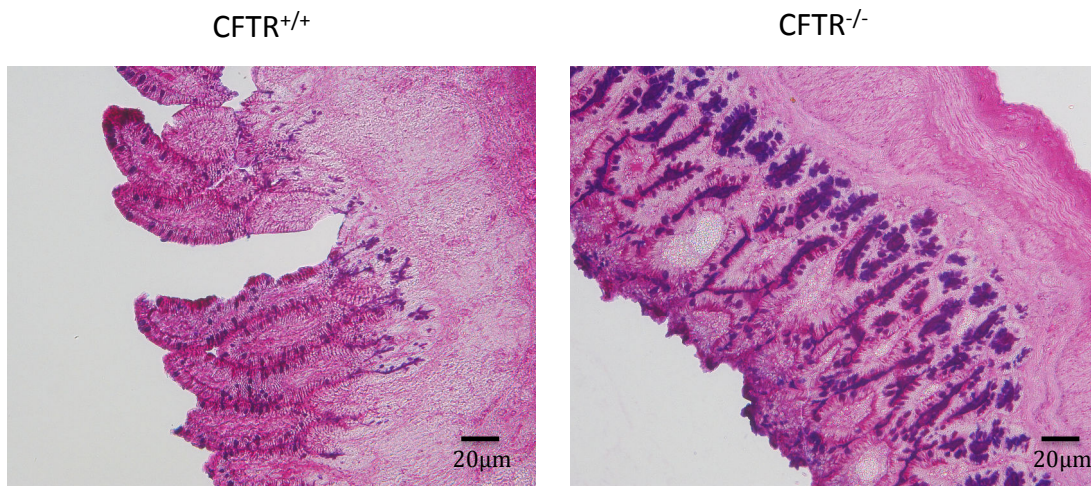


Figure 91. Coloration PAS/BA des iléons de porcelets $CFTR^{+/+}$ et $CFTR^{-/-}$

2. Immunomarquage des mucines MUC2

La mucine MUC2 étant la mucine majoritairement sécrétée dans le tractus intestinal, nous avons immunomarcqué des coupes de tissus de côlons avec un anticorps anti-MUC2 (Figure 92). Nous avons également utilisé la lectine UEA-1 spécifique de motifs fucosylés qui, d'après nos analyses en spectrométrie de masse, sont fréquemment retrouvés sur les O-glycanes de mucines intestinales.

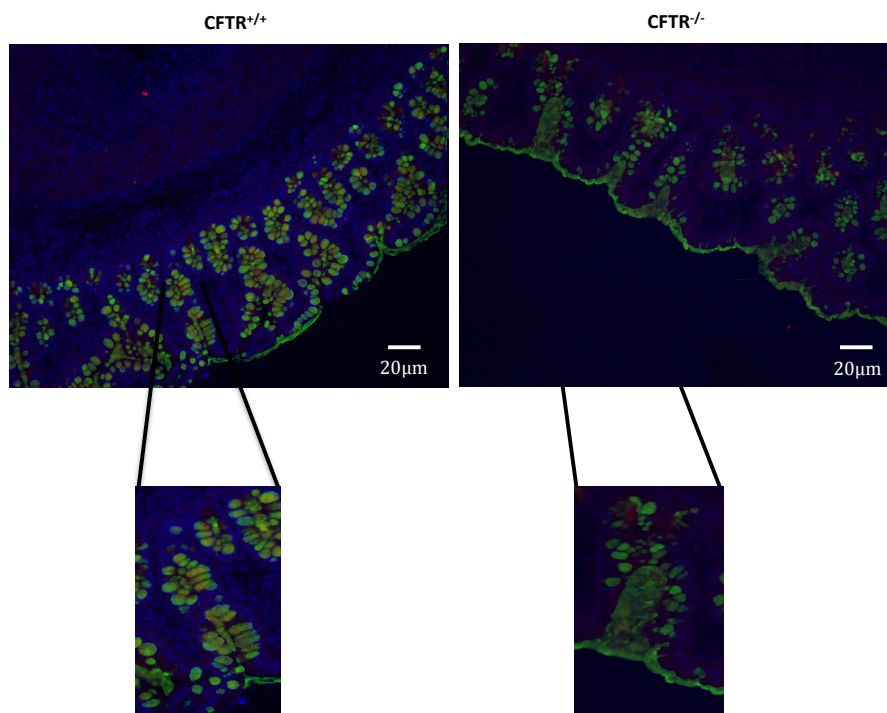


Figure 92. Co-marquage de UEA-1 (vert) et des mucines MUC2 (rouge) dans le côlon des porcelets $CFTR^{+/+}$ et $CFTR^{-/-}$.

La sécrétion de MUC2 est plus importante dans la lumière de l'épithélium colique des porcelets CFTR^{-/-}, comparés aux CFTR^{+/+}. On observe à nouveau une hyperplasie mucineuse. De même, chez les CFTR^{-/-}, le marquage avec la lectine UEA-1 est plus intense et homogène à la surface de l'épithélium alors que les cellules à mucus du fond des cryptes ne sont pas toutes positives au marquage UEA-1. La diminution du marquage avec UEA-1, qui signifie une diminution du nombre de résidus de fucose dans le fond des cryptes pourrait être corrélée avec une augmentation de la sialylation des mucines. Chez les CFTR^{+/+}, le marquage semble identique entre la surface de l'épithélium et le fond des cryptes.

Identification de ligands glycaniques reconnus par le flagelle de *Pseudomonas aeruginosa*

I. Modélisation moléculaire de l'interaction moléculaire entre FliC et les oligosaccharides sialylés

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Docteur Jérôme de Ruyck de notre Unité. Parmi les nombreuses protéines constituant le flagelle de *P. aeruginosa*, les lectines FliC et FliD ont été décrites comme étant capables de reconnaître les motifs Lewis^x et sialylLewis^x. (Scharfman *et al.*, 2001). A l'heure actuelle, seule la structure cristalline des domaines D1 et D2 de FliC a été élucidée (Figure 93) (PDB ID 4NX9 ; Song et Yoon, 2014).

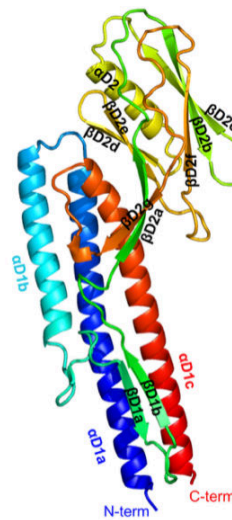


Figure 93. Structure cristallographique du monomère de FliC (d'après Song et Yoon 2014).

Nous avons donc utilisé cette structure cristalline afin de déterminer par modélisation moléculaire si FliC était capable d'interagir avec les 3'sialylTF, 6'sialylTF et disialylTF, qui sont les oligosaccharides sialylés majeurs retrouvés de façon constitutive dans la trachée des porcelets CFTR^{-/-} et en réponse à l'infection par *P. aeruginosa*. La modélisation a permis de montrer que l'affinité était plus forte pour le 6'sialylTF par rapport au 3'sialylTF, suggérant que la nature de la liaison entre le résidu d'acide sialique et le monosaccharide (Gal ou GalNAc) est importante dans la reconnaissance par FliC.

L'affinité la plus forte a été observée avec le disialylTF, le résidu d'acide sialique lié en 6 sur la GalNAc entrant dans le site actif de FliC (Figure 94B). Pour les 3 oligosaccharides testés, c'est systématiquement l'acide sialique qui participe à l'interaction (Figure 95).

D'après la modélisation, il semble que l'interaction entre FliC et les oligosaccharides implique une lysine (lysine 308) permettant une liaison de 4Å environ avec le groupement carboxylate de l'acide sialique.

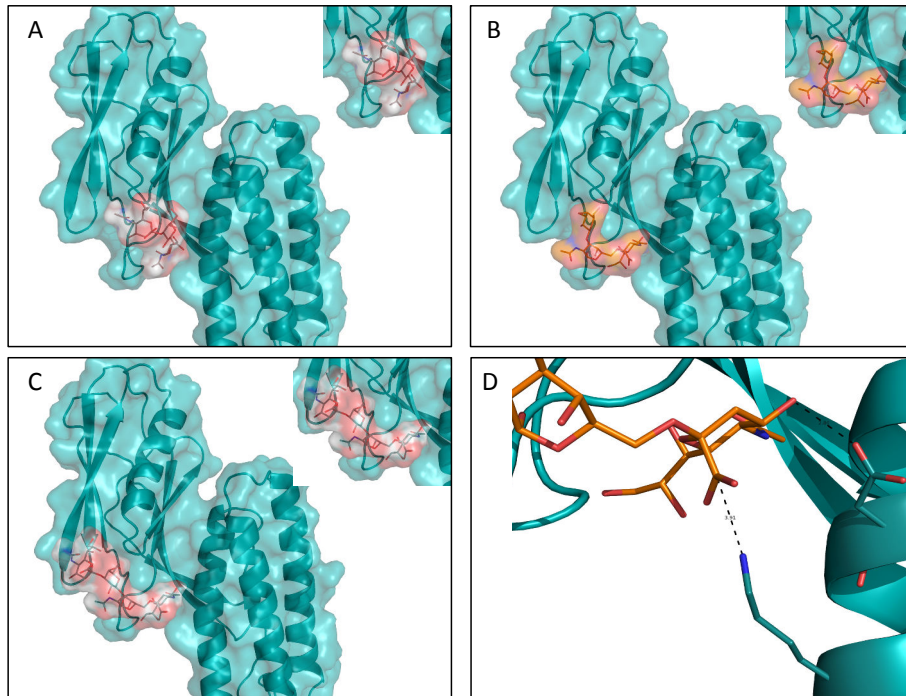


Figure 94 : Modélisation moléculaire de l'interaction de différents oligosaccharides avec FliC. (A) Interaction du 3'sialylTF avec FliC. (B) Interaction du 6'sialylTF avec FliC. (C) Interaction du disialylTF avec FliC. (D) Interaction entre le 6'sialylTF et FliC impliquant la lysine 308.

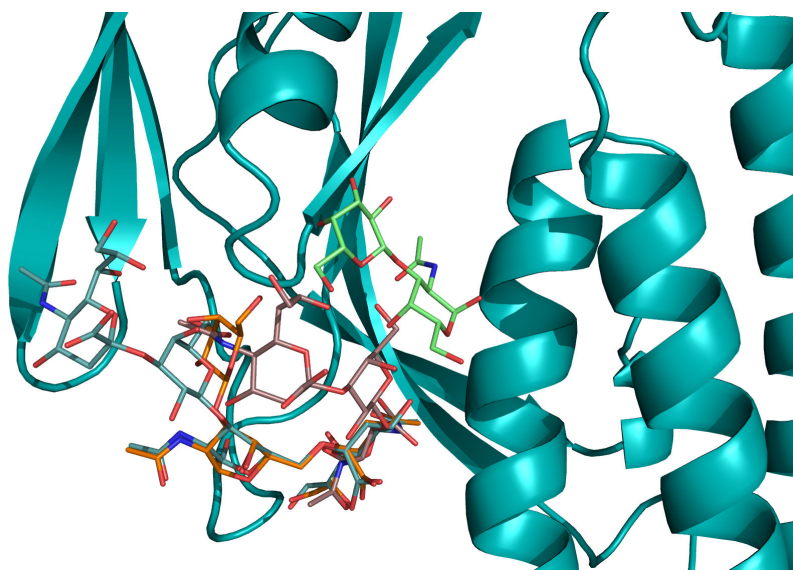


Figure 95 : Modélisation moléculaire de l'interaction des 3 oligosaccharides avec FliC.

II. Glycosylation des mucines produites par les cellules HT29-5M21

Les cellules HT29-5M21 ont été cultivées pendant 21 jours puis les mucines sécrétées ont été collectées, purifiées et les oligosaccharides analysés par spectrométrie de masse. Comme le montre le spectre de masse (Figure 96), les oligosaccharides majoritairement exprimés par les mucines des cellules HT29-5M21 sont les antigènes TF à m/z 534, sialyl-TF à m/z 895 et disialyl-TF à m/z 1256, ainsi que la structure disialylée à m/z 1705.

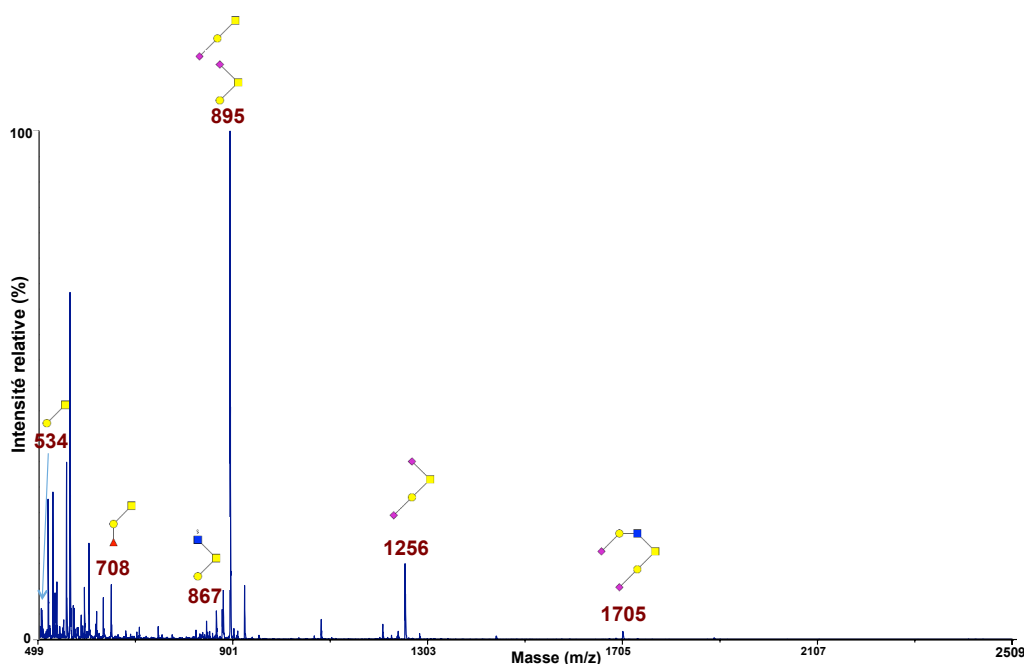


Figure 96. Spectre de masse en mode positif des O-glycanes perméthylés de mucines sécrétées par les cellules épithéliales d'adénocarcinome colique HT29-5M21. Les ions détectés correspondent à des ions de type $[M+Na]^+$.

III. Purification des antigènes sialyl-TF et disialyl-TF à partir des mucines produites par les cellules HT29-5M21

Comme décrit ci-dessus, les antigènes sialyl-TF et disialyl-TF sont des O-glycanes majoritaires produits par les mucines des cellules HT29-5M21. Etant donné que la modélisation moléculaire a permis de mettre en évidence une possible interaction entre FliC et ces antigènes, nous avons décidé de les purifier à partir des mucines produites par les cellules HT29-5M21 (figure 97). Ces oligosaccharides seront ensuite utilisés pour déterminer

par résonance plasmonique de surface les paramètres physiques de leurs interactions avec le flagelle.

Nous avons donc cultivé ces cellules en grande quantité puis récupéré le mucus, purifié les mucines et libéré les oligosaccharides par une hydrolyse chimique. Les oligosaccharides ont ensuite été séparés par chromatographie liquide haute performance en phase normale, sur une colonne de type amino (Figure 97).

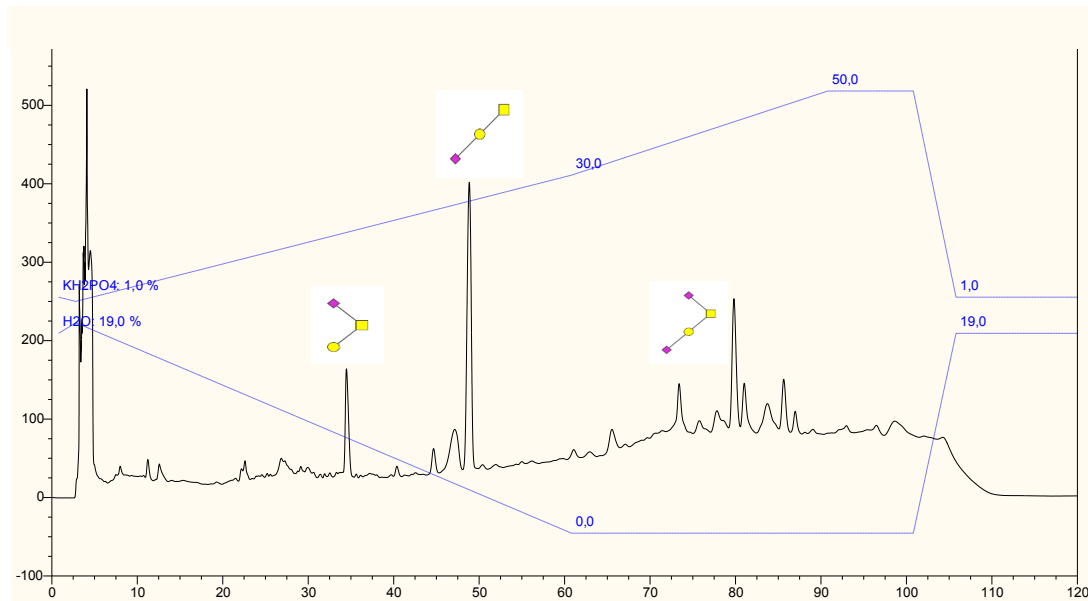


Figure 97. Profil chromatographique en phase normale des O-glycanes de mucines produites par les cellules HT29-5M21.

Les différentes fractions ont été collectées puis dessalées. Les oligosaccharides ont ensuite été perméthylés avant d'être analysés par spectrométrie de masse en tandem. Les spectres de fragmentation obtenus pour les ions à m/z 895 (sialyl-TF) et 1256 (disialyl-TF) sont présentés dans les figures 95 à 97. Le premier O-glycane à m/z 895 à être élué (temps de rétention de 34 minutes) correspond au 6'sialyl-TF formé d'un résidu de NeuAc lié en α 2,6 sur la GalNac du point d'attache, elle-même substituée par un résidu de Gal lié en β 1,3 (Figure 95). L'ion fragment C1 β à m/z 259 est caractéristique d'un résidu de Gal non substitué en position terminale. L'ion fragment à m/z 284 (Y1 α /Z1 β) indique que la GalNac du point d'attache est di-substituée par deux résidus monosaccharidiques.

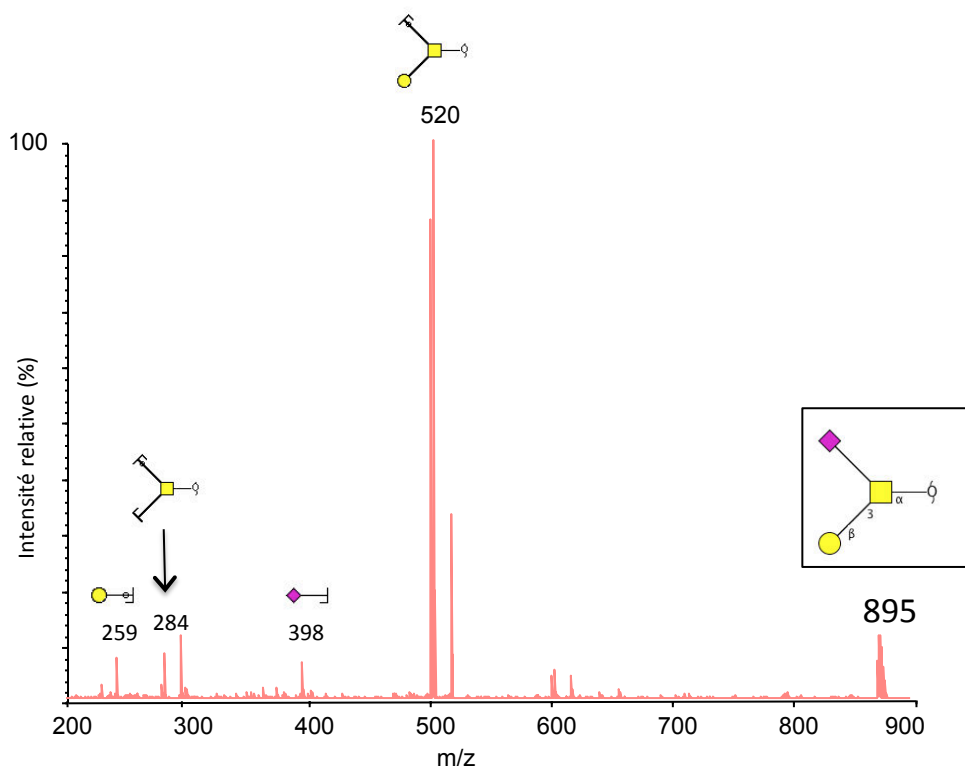


Figure 98. Spectre de fragmentation MS/MS en mode positif de l'ion à m/z 895. La structure encadrée correspond à l'ion parent identifié dans la fraction éluée à 34 minutes sur le profil chromatographique. Les ions détectés correspondent à des ions de type $[M+Na]^+$.

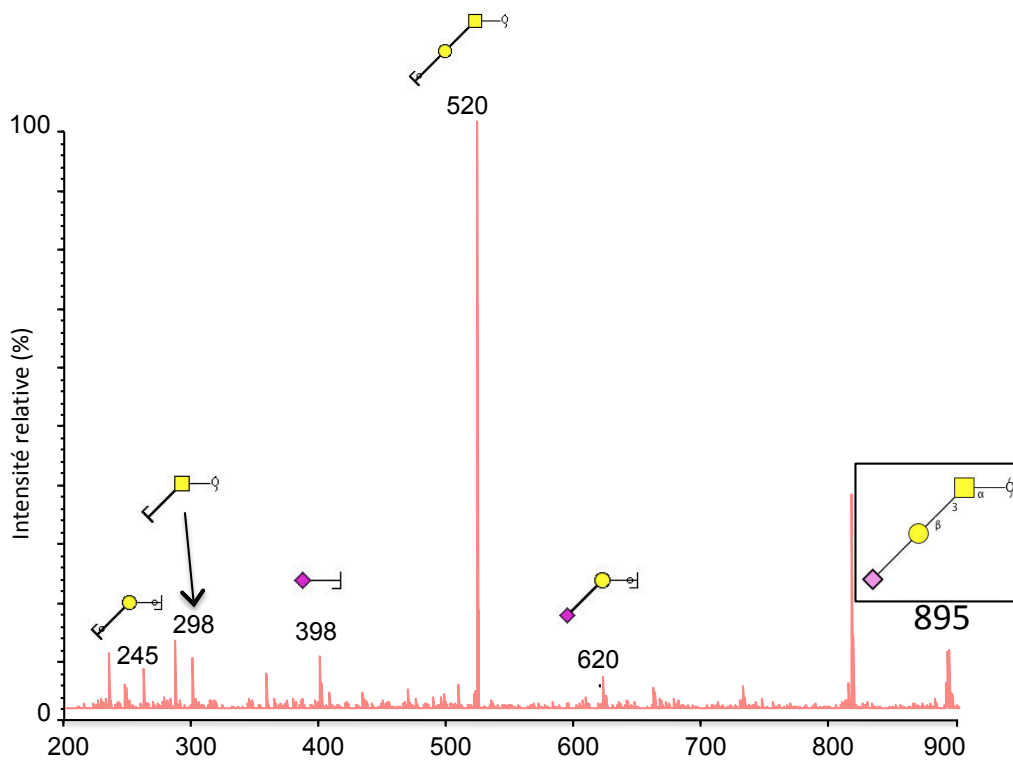


Figure 99. Spectre de fragmentation MS/MS en mode positif de l'ion à m/z 895. La structure encadrée correspond à l'ion parent identifié dans la fraction éluée à 49 minutes sur le profil chromatographique. Les ions détectés correspondent à des ions de type $[M+Na]^+$.

Le deuxième O-glycane à m/z 895 à être élué (temps de rétention de 49 minutes) correspond au 3'sialyl-TF linéaire composé d'un résidu de NeuAc lié en α 2,3 sur un résidu de Gal lui-même lié en β 1,3 sur la GalNAc du point d'attache (Figure 99). L'ion fragment Z1 à m/z 298 indique que la GalNAc du point d'attache est substitué par un seul monosaccharide. L'ion fragment C2/Y2 à m/z 245 indique que le galactose est relié à deux monosaccharides. Les ions fragment Y2 à m/z 520 et C2 à m/z 620 indiquent respectivement que le galactose est lié sur la GalNAc du point d'attache et que le galactose est substitué par un résidu d'acide sialique.

L'antigène disialyl-TF à m/z 1256 est élué à 73 minutes après séparation par HPLC en phase normale. L'ion fragment Y1 α /Y2 β à m/z 506 indique que la GalNAc du point d'attache est disubstituée par 2 monosaccharides dont l'un est un galactose. L'ion fragment Z1 β à m/z 659 indique que la GalNAc du point d'attache est disubstituée par 2 monosaccharides dont l'un est un résidu d'acide sialique. Ces 2 ions caractéristiques nous permettent de confirmer que la structure de l'ion à m/z 1256 est : NeuAc α 2,3Gal β 1,3(NeuAc α 2,6)GalNAc.

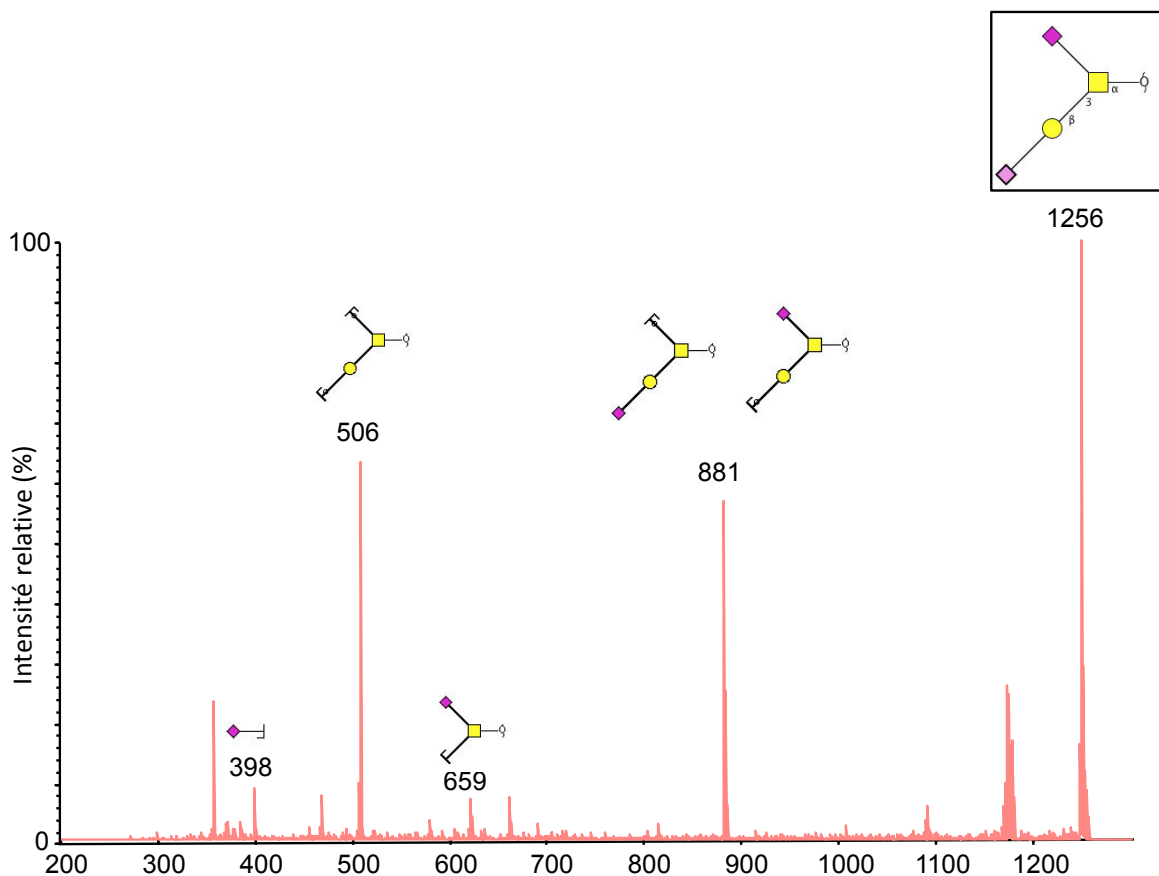


Figure 100. Spectre de fragmentation MS/MS en mode positif de l'ion à m/z 1256. La structure encadrée correspond à l'ion parent identifié dans la fraction éluée à 73 minutes sur le profil chromatographique. Les ions détectés correspondent à des ions de type $[M+Na]^+$.

IV. Purification du flagelle de *Pseudomonas aeruginosa*

Des études précédentes ont permis de démontrer que le flagelle de *P. aeruginosa* et plus particulièrement FliD permet à la bactérie de se fixer aux mucines en reconnaissant les motifs Lewis^x et sialyl Lewis^x (Arora *et al.* 1998, Scharfman *et al.* 2001). Nous avons cherché à déterminer si le flagelle de *P. aeruginosa* était également capable de reconnaître les antigènes sialyl-TF et disialyl-TF. Pour cela, nous avons dans un premier temps purifié le flagelle de *P. aeruginosa* à partir de la souche PAO1 délétée pour PilA, en suivant le protocole de Bucior *et al.* (Bucior *et al.* 2012). Ce protocole permet de purifier spécifiquement les flagelles et les pili, en utilisant différentes étapes de centrifugations et précipitations au MgCl₂. Comme le montre la Figure 101, le flagelle est correctement purifié et il n'y a pas d'autres protéines contaminantes dans l'échantillon. En utilisant le même protocole, nous avons purifié uniquement les pilis exprimés par le mutant Δ FliC de la souche PAO1.

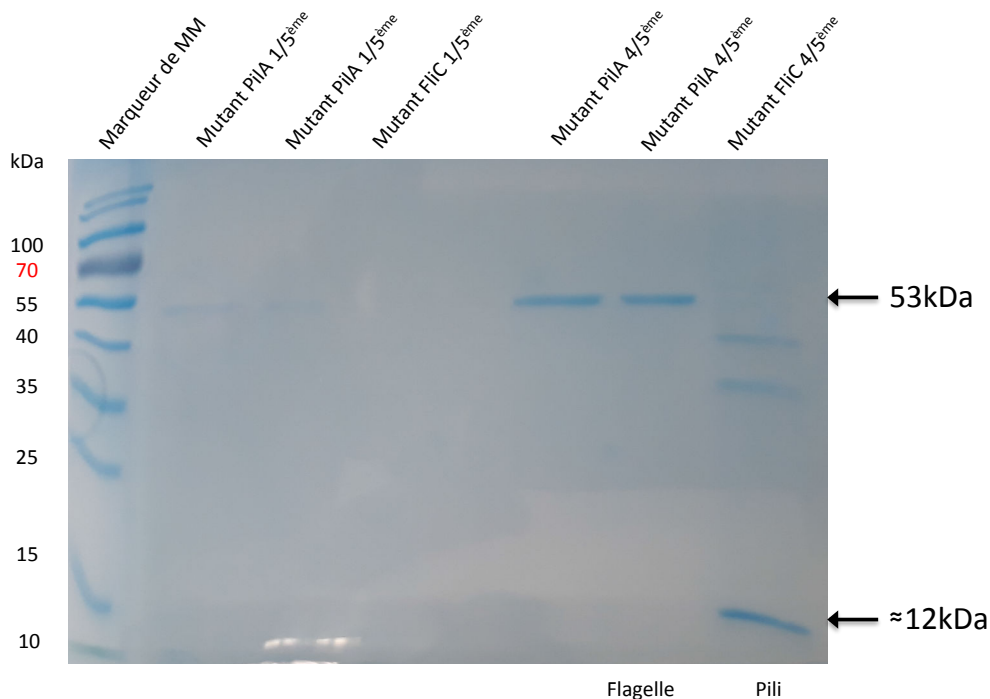


Figure 101. Purification du flagelle de *P. aeruginosa*. Le flagelle (MM=53 kDa) de *P. aeruginosa* a été purifié à partir de la souche Δ PilA de PAO1. Le mutant Δ FliC n'exprime pas de flagelle mais exprime des pili (MM=12kDa). Un gel SDS-PAGE à 12,5% d'acrylamide, coloré au bleu de Coomassie, a permis de vérifier la pureté des protéines purifiées.

Après grattage de 50 boîtes de Pétri (de 9 cm de diamètre), ce qui correspond à environ 10^{11} bactéries au total, ce protocole nous permet de purifier approximativement 1,5 mg de flagelle.

Développement d'un test rapide et sensible pour mesurer l'adhésion des bactéries sur mucines

Dans le cadre de la thèse, nous avons développé un test d'adhésion des bactéries sur mucines purifiées préalablement immobilisées sur membrane de nitrocellulose (Figure 102). Ce test a été utilisé pour étudier l'adhésion de *P. aeruginosa* sur les mucines bronchiques des porcelets CFTR^{-/-}.

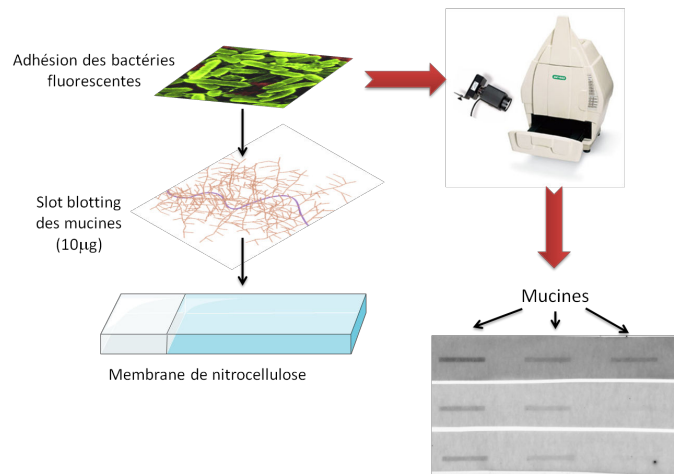


Figure 102. Schéma du principe du test d'adhésion des bactéries sur mucines purifiées. Les mucines sont immobilisées sur membrane de nitrocellulose puis les bactéries fluorescentes sont incubées sur la membrane. Après lavages, l'intensité de fluorescence est lue à l'aide d'un imageur.

De nombreuses équipes travaillant sur l'adhésion bactérienne utilisent des plaques en plastique de 96 puits. Il existe deux inconvénients majeurs à l'utilisation de ces plaques :

- certaines bactéries pathogènes adhèrent facilement au plastique
- pour pallier à ce problème, il faut intégralement couvrir la surface du puits avec de la mucine, ce qui est extrêmement consommateur de mucines.

Pour se dispenser de plastique, nous avons développé un nouveau test utilisant comme support d'adhésion une membrane de nitrocellulose.

I. Mises au point des conditions du test

1. Choix du saturateur

Plusieurs agents saturants ont été testés : 5% de lait en poudre ou 0,5% de BSA tous deux dilués dans du PBS et une solution commerciale de type Protein Free Blocking Buffer

(Pierce®). La solution commerciale nous a donné le meilleur rapport signal/bruit et a donc été notre choix pour la suite des tests.

2. Choix du fluorophore

Afin de pouvoir visualiser les bactéries, nous avons choisi de les rendre fluorescentes. Trois fluorophores ont été testés : le syto9, l'isocyanate de fluorescéine (FITC) et le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Le syto9 et le FITC nécessitaient des temps de marquage plus long que le DAPI, ce qui augmentait le taux de mortalité des bactéries et la perte rapide de la fluorescence. De plus, les mucines déposées sur membrane et marquées uniquement au FITC émettent un signal lors de la révélation. Le FITC et le syto9 ne s'avèrent donc pas être de bons fluorophores pour le marquage des bactéries. Le DAPI a donc été retenu pour la suite des tests.

3. Quantités minimales de mucines à utiliser

Afin de déterminer la quantité de mucines minimales à utiliser dans les tests, une gamme de concentrations de mucines a été faite. Des mucines humaines provenant de jéjunum, côlon et iléon ont été déposées sur membrane de nitrocellulose à des quantités allant de 1 à 20 μ g et incubées avec la souche *K12* de *E. coli* marquée au DAPI.

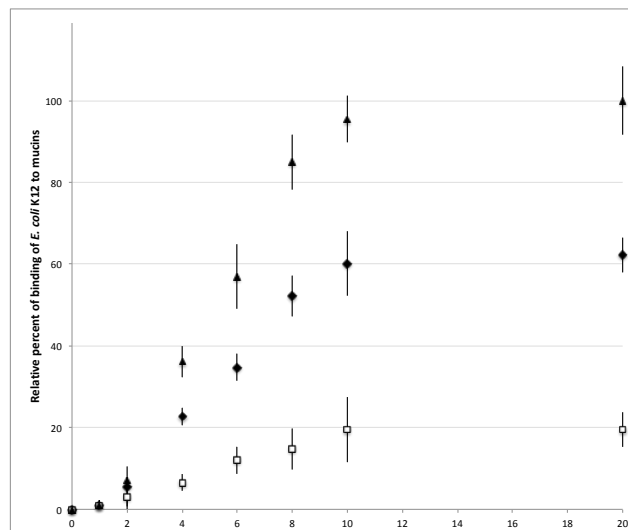


Figure 103. Relation entre l'intensité de fluorescence et la quantité de mucines utilisées. Les mucines humaines de côlon (Δ), de jéjunum (\blacklozenge) et d'iléon (\square) ont été immobilisées sur membrane de nitrocellulose à des concentrations allant de 1 à 20 μ g de mucines.

Comme le montre la figure 103, au dessus de 2 μ g de mucines déposées le signal augmente de façon proportionnelle à la quantité de mucines jusqu'à environ 10 μ g pour atteindre un plateau

à 20µg. Ces résultats suggèrent qu'au delà de 20µg de mucines l'augmentation du signal sera négligeable. Nous avons donc décidé d'utiliser 20µg de mucines pour la suite des tests d'adhésion.

II. L'adhésion des bactéries sur la mucine commerciale gastrique de porc (PGM) ou les mucines produites par la lignée cellulaire HT29-MTX ne reflète pas l'adhésion des bactéries sur les mucines humaines

De nombreuses études portant sur l'adhésion des bactéries sur mucines utilisent une mucine gastrique de porc commerciale (PGM) plus facilement accessible que de la mucine humaine. La figure 104 ne montre pas de différence significative d'adhésion entre les bactéries *L. casei shirota*, connues pour transiter temporairement dans le tractus gastro-intestinal et la souche commensale *E. coli K12* qui colonise le mucus.

Il en est de même pour les mucines provenant de la lignée cellulaire intestinale HT29-MTX qui sont elles aussi souvent utilisées dans les tests d'adhésion de bactéries. En effet, nous avons observé une plus forte adhésion de différentes bactéries et levures sur des mucines intestinales humaines comparées à l'adhésion sur HT29-MTX ou encore sur PGM (Figure 104). Par exemple, aucune différence d'adhésion n'est observée entre PGM et HT29-MTX incubées avec les souches *L. casei shirota* et *Y. enterocolitica* alors que *L. casei shirota* est connue pour adhérer aux mucines intestinales contrairement à *Y. enterocolitica*.

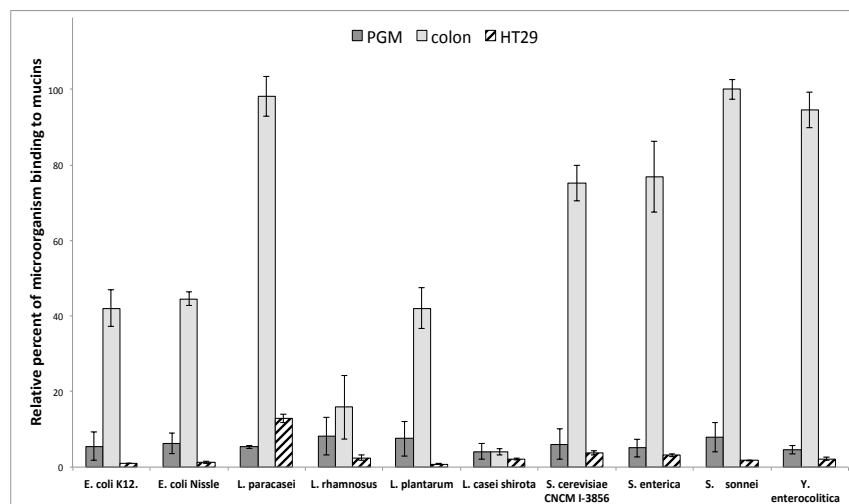


Figure 104. Etude de l'adhésion de différents probiotiques et microorganismes pathogènes sur de la mucine gastrique de porc commerciale, de la mucine intestinale HT29-MTX et de la mucine humaine de côlon.

Ces résultats suggèrent que la PGM et les mucines de la lignée cellulaire HT29-MTX ne sont pas les meilleurs modèles pour étudier les adhésions bactériennes dans un contexte intestinal. Comme le montre la figure 104, les microorganismes utilisés dans cette étude ne présentent pas tous les mêmes profils d'adhésion aux mucines utilisées dans le test. Les trois agents pathogènes, *S. enterica*, *S. sonnei* et *Y. enterocolitica*, présentent une forte capacité d'adhésion aux mucines du côlon. Les deux souches d'*E. coli*, la bactérie *E. coli* K12 commensale et le probiotique *E. coli* Nissle 1917, ont également montré une forte liaison aux mucines intestinales humaines. Parmi les autres bactéries probiotiques testées, seule *L. casei shirota* ne présente aucune adhérence avec les mucines intestinales. *L. rhamnosus* se fixe de façon plus modérée, alors que toutes les autres bactéries et levures (*S. cerevisiae*) présentent une forte capacité de liaison.

III. Influence des résidus d'acide sialique ou de la nature du « core » sur l'adhésion des microorganismes aux mucines humaines

Pour déterminer si la sialylation peut être un facteur clé dans l'adhésion des microorganismes aux mucines, nous avons désialylé chimiquement les mucines intestinales humaines et comparé le niveau d'adhésion de bactéries et de levures aux mucines natives et à leurs homologues désialylées (Figure 105A). La perte des résidus d'acide sialique entraîne une diminution importante du taux d'adhésion allant de 47 % pour *L. rhamnosus* et 89% pour la souche *S. cerevisiae*, jusqu'à 96 % pour *L. paracasei* et 97 % pour *Y. enterocolitica*. Pour tous les microorganismes testés, leur capacité d'adhésion aux mucines intestinales désialylées est proche de celle de la PGM non désialylée.

Dans les mucines intestinales humaines, les acides sialiques sont principalement liés en α 2-6 au premier résidu de GalNAc, qui est également substitué par un résidu de GlcNAc lié en β 1,3 pour former un glycanne de core 3.

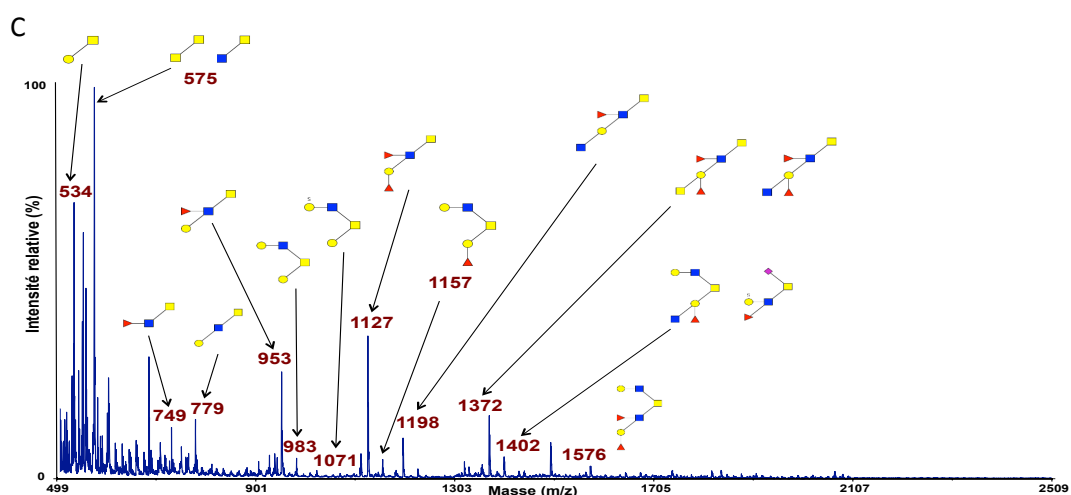
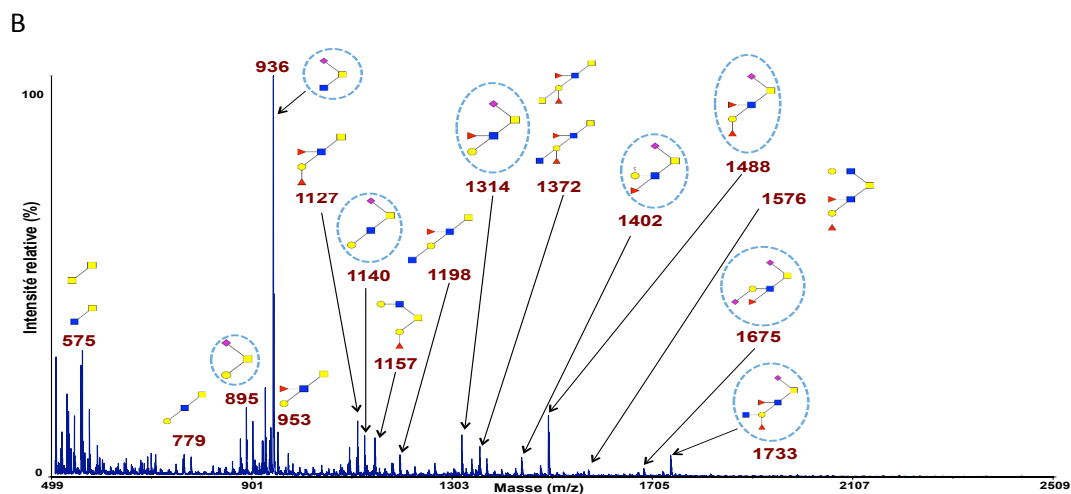
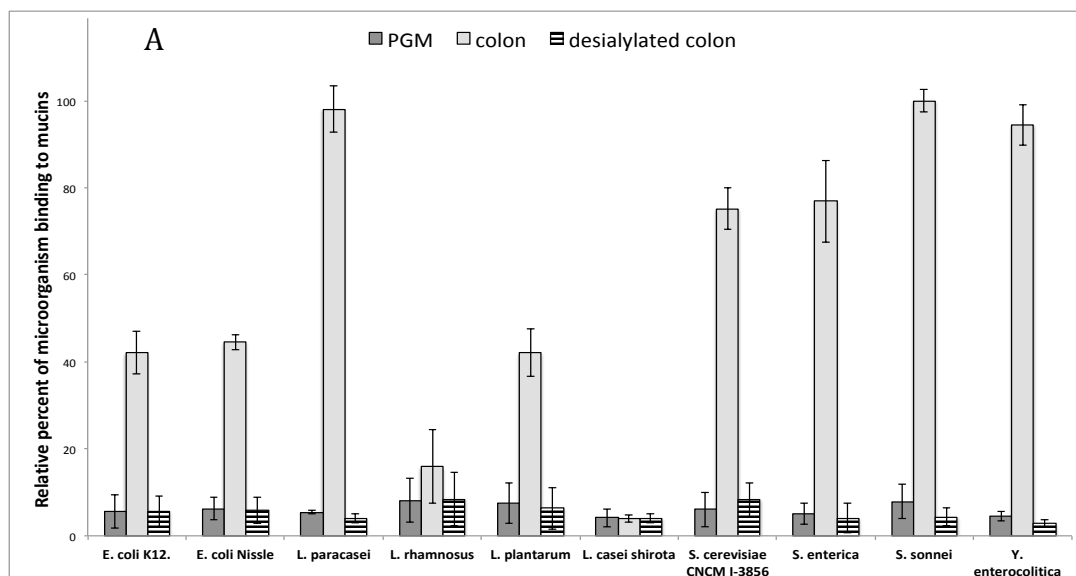


Figure 105. Influence des résidus d'acide sialique sur l'adhésion des microorganismes aux mucines. (A) Les bactéries et les levures se lient préférentiellement aux mucines du côlon humain natif. L'adhésion des microorganismes marqués au DAPI à la PGM (gris foncé), aux mucines purifiées de côlon humain (gris clair) et à leurs homologues désialylées (bandes) a été quantifiée. (B-C) Spectres MS des O-glycannes perméthylés isolés à partir de mucines du côlon humain natives (B) et désialylées (C), acquis en mode ion positif $[M + Na]^+$.

Pour déterminer si seuls les résidus d'acide sialique sont importants pour la liaison des microorganismes ou si la structure centrale peut jouer un rôle dans la reconnaissance, nous avons ensuite évalué la liaison des bactéries aux mucines provenant de tumeurs malignes de kystes ovariens humains.

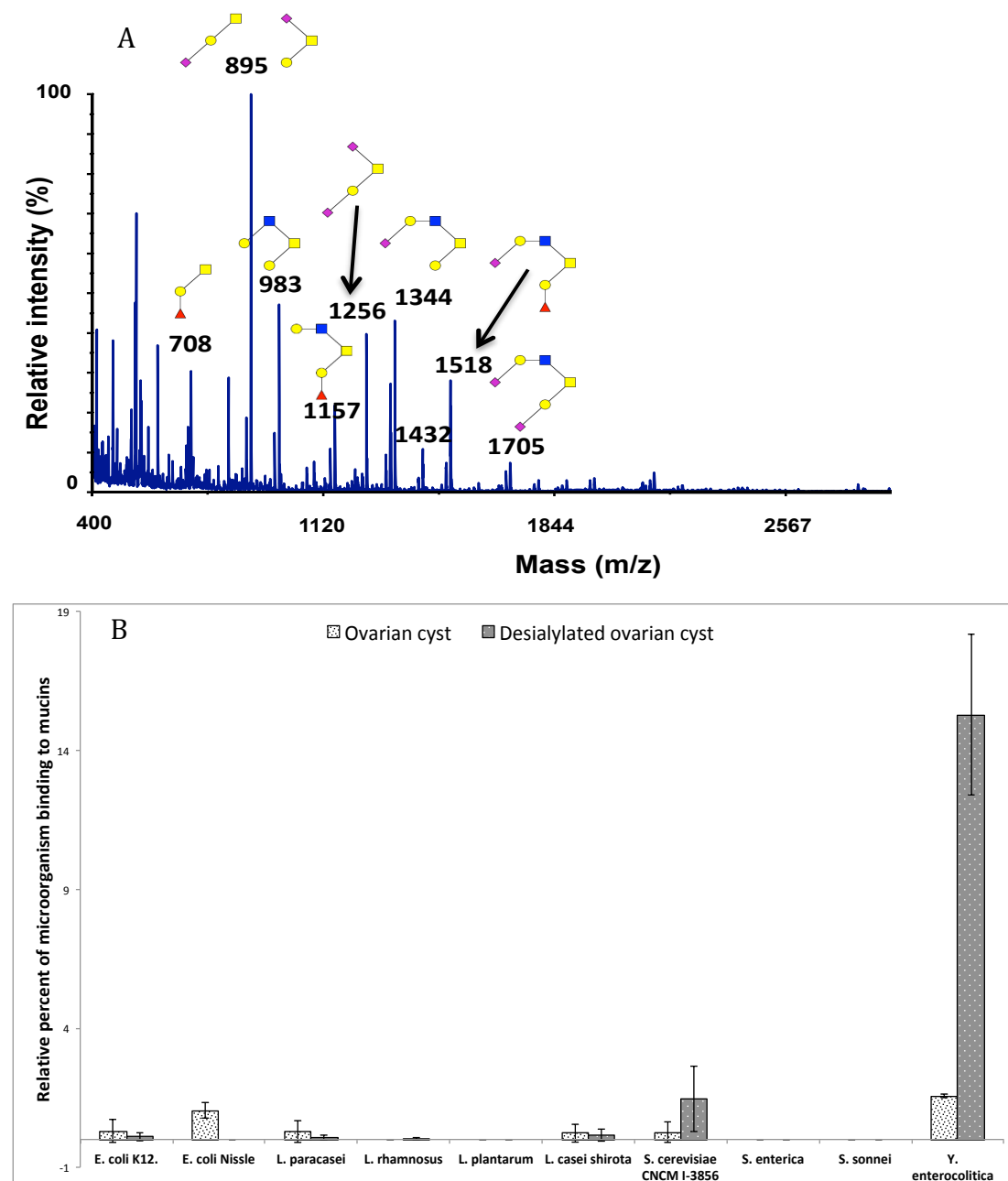


Figure 106. Toutes les mucines sialylées ne sont pas des ligands pour les microorganismes. (A) Spectre MS des O-glycanes perméthylés isolés à partir de mucines de kyste ovarien malin humain, acquis en mode positif $[M + Na]^+$. (B) Adhésion des microorganismes marqués au DAPI aux mucines purifiées de kyste ovarien natif humain (points blancs et noirs) et à leurs homologues désialylées (points gris foncé, blancs). La désialylation chimique des mucines de kystes ovariens augmente de manière significative l'adhésion de *Y. enterocolitica*.

Comme le montre la figure 106A, les O-glycanes de mucines de kyste ovarien présentent une forte proportion de glycanes sialylés (plus de 50% des O-glycanes identifiés).

Cependant, contrairement aux oligosaccharides des mucines intestinales, les glycanes sialylés des kystes ovariens reposent principalement sur une structure de core 1, avec une faible proportion de glycanes sialylés basés sur un core de type 2. Comme le montre la figure 106B, la plupart des microorganismes testés ne présentent aucune adhérence significative avec les O-glycanes présents sur les mucines natives des kystes ovariens. Seule une faible adhérence sur ces mucines peut être détectée pour *E. coli* Nissle 1917 et *Y. enterocolitica*. Lorsque les mucines sont désialylées, deux des microorganismes testés, la bactérie *Y. enterocolitica* et, dans une moindre mesure, la levure *S. cerevisiae* CNCM I-3856, reconnaissent et se fixent aux mucines de kystes ovariens. Ces résultats semblent indiquer que, selon le type de core constituant les O-glycanes, les résidus d'acide sialique peuvent constituer une partie cruciale du site de liaison ou masquer un site potentiel d'adhésion.

IV. Adhésion des microorganismes aux mucines humaines tout au long du tractus gastro-intestinal

Nous avons ensuite évalué l'adhésion des microorganismes aux mucines humaines purifiées tout le long du tractus gastro-intestinal, à savoir l'estomac, le jéjunum, l'iléon (intestin grêle) et le côlon. Comme le montre la figure 107, la plus forte adhésion a toujours été observée pour les mucines du côlon humain, quel que soit le microorganisme testé. Nous avons observé une augmentation de l'adhérence de 1,4 à 4,5 fois aux mucines du côlon par rapport aux mucines jéjunales humaines. La plus faible adhésion est retrouvée pour *L. rhamnosus* et la plus élevée pour *Y. enterocolitica*. Chaque microorganisme testé présente des profils d'adhésion différents aux mucines humaines. Par exemple, la bactérie pathogène *S. sonnei* montre une très forte adhésion aux mucines coliques (comparée aux autres bactéries testées), une adhésion 2,5 fois moindre aux mucines jéjunales, une adhésion 5,8 fois moindre aux mucines gastriques et une diminution de 11 fois sur les mucines iléales. Au contraire, l'adhésion de *L. rhamnosus* aux mucines gastro-intestinales humaines est très faible et peu de différences ont été observées entre les différentes mucines.

Comparativement aux mucines du côlon humain, l'adhésion des microorganismes aux mucines gastriques et iléales reste faible, avec une diminution d'environ 5 à 11 fois pour toutes les bactéries et levures testées.

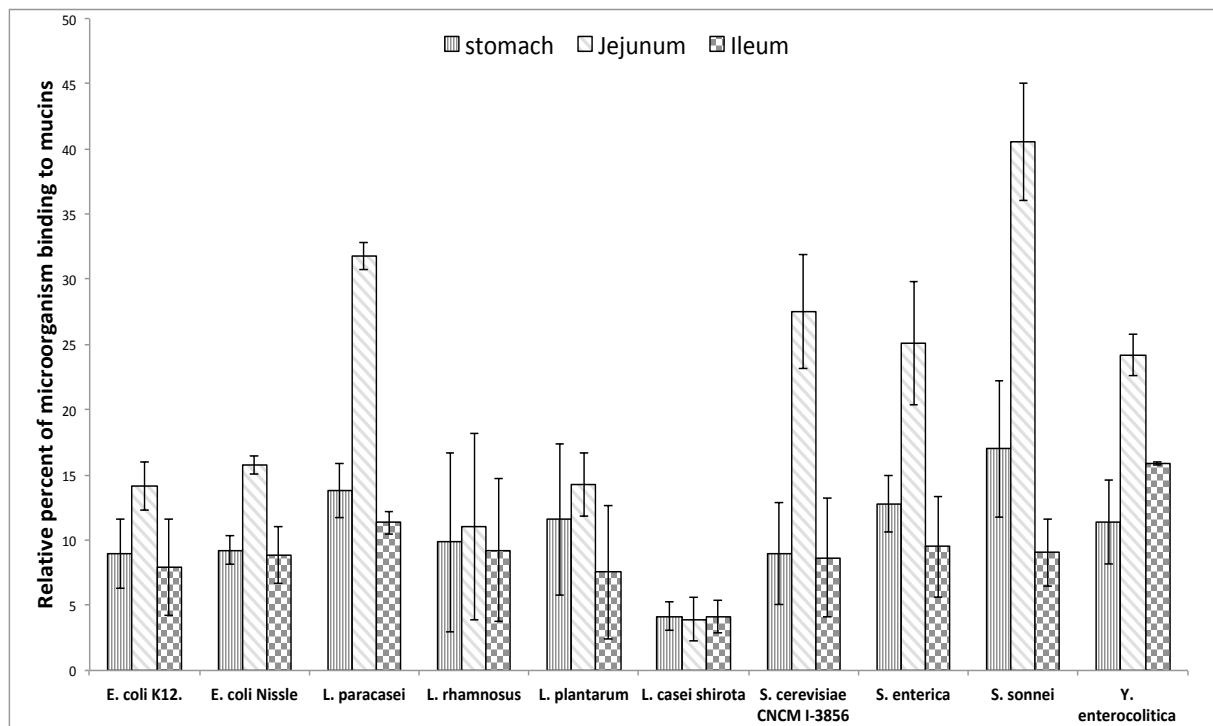


Figure 107. Adhésion des microorganismes aux mucines du tractus gastro-intestinal. L'adhésion des microorganismes marqués au DAPI aux mucines humaines purifiées à partir de l'estomac (bandes verticales), du jéjunum (bandes obliques) et de l'iléon (damier) a été quantifiée. Les micro-organismes se lient préférentiellement aux mucines coliques et aux mucines jéjunales.

Pour mieux comprendre la différence de liaison des microorganismes aux mucines jéjunales humaines par rapport aux mucines iléales et gastriques, nous avons caractérisé le répertoire de glycosylation des différentes mucines (Figure 108). Les mucines gastriques humaines sont principalement constituées de glycanes de core 2. La plupart des oligosaccharides sont neutres et fortement fucosylés. Seules 10% des structures portent des résidus d'acide sialique. Parmi ces oligosaccharides sialylés, les antigènes sialyl TF et disialyl TF, basés sur un core 1, sont les plus exprimés. Environ 3% des oligosaccharides sont des petits glycanes sialylés de core 2. Une caractéristique majeure des mucines gastriques humaines est l'expression des antigènes de groupes sanguins, portés par environ 80% des O-glycanes. Dans le jéjunum, les glycanes sont basés sur un core 1, un core 2 ou un core 3. Environ 45 à 50% des O-glycanes sont sialylés, les oligosaccharides sialylés étant majoritairement basés sur des core 1 et 3 et les résidus d'acide sialique sont greffés en α 2,3 sur le Gal ou en α 2,6 sur la GalNAc du point d'attache. Environ 35 à 40% des oligosaccharides portent des antigènes de groupes sanguins. Dans l'iléon, les oligosaccharides sont principalement neutres et fortement fucosylés, mais contrairement aux mucines gastriques, ils sont principalement basés sur un core 3, avec quelques glycanes basés sur un core 4 (GlcNAc β 1-3 (GlcNAc β 1-6) GalNAc). Environ 55%

des oligosaccharides portent des déterminants de groupes sanguins ou des Lewis et seulement 30% des glycanes sont sialylés. La plupart des résidus d'acide sialique sont liés en α 2-6 au premier résidu de GalNAc et portés par une structure de core 3.

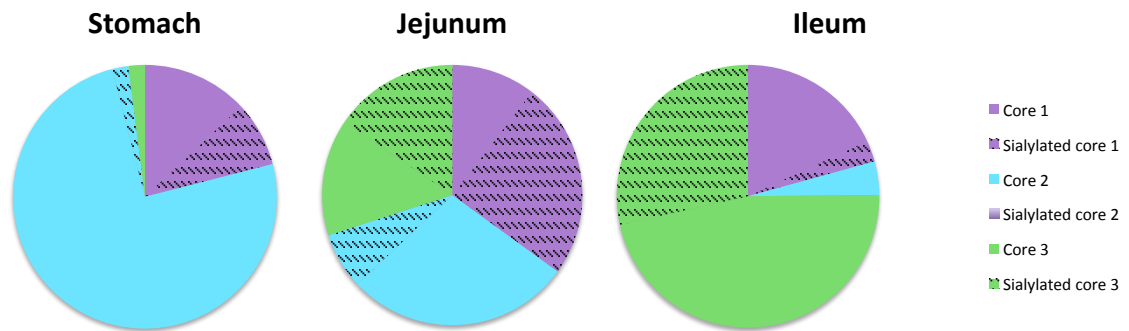


Figure 108. Caractéristiques structurales de la glycosylation des mucines gastriques, jéjunales et iléales humaines. Illustration schématique de la répartition des oligosaccharides sialylés et non sialylés basés sur des core 1, 2 ou 3.

CHAPITRE



5

Discussion et perspectives

La mucoviscidose est la plus répandue des maladies autosomales récessives létales dans la population Caucasienne. Le pronostic de cette pathologie est conditionné principalement par des infections respiratoires chroniques à *P. aeruginosa* responsables d'exacerbations de la symptomatologie pulmonaire délétères sur l'état général et nutritionnel des patients. Contrairement aux autres pathogènes qui peuvent être éradiqués, *P. aeruginosa* est capable de s'adapter au mucus visqueux qui tapisse les poumons des patients atteints de mucoviscidose, de s'y multiplier et de former des biofilms résistants aux antibiotiques et aux mécanismes de défense immunitaire. Les raisons de cette adaptation ainsi que celles de l'extrême vulnérabilité des patients à *P. aeruginosa* ne sont toujours pas élucidées. Notre hypothèse, à l'origine de ces travaux de thèse, était que les altérations de la composition biochimique du mucus pulmonaire créaient un environnement favorable à la colonisation du mucus par la bactérie.

Pour valider cette hypothèse, nous avons tout d'abord comparé le phénotype pulmonaire des porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} à la naissance et nous avons ainsi mis en évidence de profondes modifications de la glycosylation des mucines chez les porcelets CFTR^{-/-}. Nous avons ensuite cherché à identifier quels mécanismes moléculaires étaient à l'origine de ces changements de composition biochimique des mucines et nous avons pu démontrer que le dysfonctionnement du canal CFTR jouait un rôle direct sur la sialylation des mucines, en générant très probablement un stress du réticulum endoplasmique. Enfin, nous avons évalué l'impact du changement d'environnement pulmonaire sur la capacité de *P. aeruginosa* à coloniser le tractus respiratoire des porcelets CFTR^{-/-}, ce qui nous a permis de montrer l'importance des acides sialiques dans les étapes d'adhésion de la bactérie aux mucines.

I. Comparaison des phénotypes pulmonaires des porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} à la naissance

Les O-glycanes des mucines jouent un rôle fondamental dans la viscosité et les propriétés rhéologiques des mucines (Demouveau *et al.* 2018). Ce sont également des éléments-clés dans les processus de colonisation ou d'infection bactérienne puisque les oligosaccharides peuvent servir à la fois de ligands et de nutriments pour les bactéries. Nous avons donc dans un premier temps caractérisé les répertoires de glycosylation des mucines respiratoires des porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} en purifiant les mucines à partir de lavages broncho-alvéolaires. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une augmentation significative de la sialylation des mucines provenant des porcelets CFTR^{-/-}.

Chez les patients atteints de mucoviscidose, il est démontré que le mucus est moins hydraté et plus visqueux, ce qui peut potentiellement conduire à une ségrégation plus forte des mucines sécrétées à la surface de l'épithélium. Les travaux de Hoegger *et al.* ont également démontré que le mucus des porcelets CFTR^{-/-} ne se détachait pas des glandes sous-muqueuses (Hoegger *et al.* 2014a). Pour s'assurer que les mucines retrouvées dans les BAL des porcelets CFTR^{-/-} soient bien le reflet de l'ensemble des mucines sécrétées dans la lumière de l'épithélium pulmonaire, nous avons recueilli et purifié les mucines à partir des tissus de trachées et poumons des porcelets. Pour la trachée, nous avons pu séparer les mucines provenant des glandes sous-muqueuses des mucines sécrétées par les cellules à gobelet (même si ces dernières étaient parfois contaminées par quelques glandes sous-muqueuses). Dans les bronches, il n'a pas été possible de séparer les muqueuses et sous-muqueuses du fait de la faible épaisseur des tissus. La quantification relative du niveau d'expression des O-glycanes sialylés le long de l'arbre trachéobronchique a permis de confirmer que les mucines des porcelets CFTR^{-/-} étaient plus sialylées que celles des porcelets CFTR^{+/+}. L'augmentation de cette sialylation a été observée tout le long du tractus respiratoire même si les différences ne sont significatives que dans la trachée. Ceci peut s'expliquer par le fait que les mucines des bronches sont beaucoup plus acides que celles de la trachée, aussi bien chez les CFTR^{-/-} que chez les CFTR^{+/+}.

L'augmentation du pourcentage de sucres sialylés n'a été observée qu'à la surface de la trachée, mais pas dans les glandes sous-muqueuses. Ce résultat est cohérent avec des études

antérieures démontrant que les altérations de la glycosylation des mucines humaines dans la mucoviscidose n'étaient retrouvées que dans les expectorations des patients et n'étaient pas observées dans les sécrétions provenant des glandes sous-muqueuses (Schulz *et al.* 2005 ; Schulz *et al.* 2007). Cela explique également les divergences entre notre étude et les travaux de Tang *et al.* qui ont démontré que le génotype des porcelets n'avait aucun impact sur la glycosylation des mucines pulmonaires (Tang *et al.* 2016). Dans cette étude, seules les sécrétions des glandes sous-muqueuses avaient été analysées car ils avaient stimulé les trachées avec de la méthacholine puis aspiré le liquide périciliaire 5 minutes après la stimulation. La méthacholine est connue pour induire exclusivement la sécrétion des glandes sous-muqueuses.

De nombreuses études, conduites ces trois dernières décennies sur de nombreux modèles cellulaires et animaux de mucoviscidose et chez l'Homme, ont décrit des altérations de la glycosylation des mucines et de certains glycoconjugués dans les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose (Schulz *et al.* 2007 ; Xia *et al.* 2007 ; Chace *et al.* 1983 ; Davril *et al.* 1999 ; Kreda *et al.* 2012). Deux investigations cliniques (Chace *et al.* 1983, Davril *et al.* 1999) ont montré que la sulfatation et la sialylation des mucines respiratoires des patients atteints de mucoviscidose augmentent avec la sévérité de la maladie et que les mucines respiratoires présentent une sialylation plus élevée chez les patients CF que chez les individus non CF sains. D'autres études ont rapporté une grande variation inter-échantillon et/ou n'ont pas détecté de différences statistiquement significatives (Kreda *et al.* 2012). Cette hétérogénéité dans les résultats s'explique très probablement par le fait que dans la plupart des études, les sujets contrôles non CF étaient des patients présentant d'autres pathologies respiratoires comme des bronchites chroniques ; les individus sains ne pouvant pas expectorer (Boat *et al.* 1976; Chace *et al.* 1985; Davril *et al.* 1999; Lamblin *et al.* 1977). La plupart de ces travaux antérieurs ont conclu que les altérations de la glycosylation des mucines dans la mucoviscidose dépendent du processus d'infection et/ou d'inflammation.

Dans notre étude, nous avons analysé la glycosylation des mucines de porcelets nouveau-nés et nous avons montré au préalable qu'il n'y avait aucun signe et aucun marqueur détectable d'une éventuelle inflammation ou infection des tissus des porcelets CFTR^{-/-} à la naissance. Ces travaux constituent donc un nouveau paradigme pour l'augmentation de la sialylation des mucines du tractus respiratoire dans la mucoviscidose, en démontrant que cette altération est préexistante à tout cycle d'inflammation/infection.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué les altérations possibles de la localisation et/ou de la sécrétion des deux principales mucines sécrétées dans les voies respiratoires: MUC5AC et MUC5B. Nous n'avons observé aucune différence d'expression des deux mucines dans les voies respiratoires des porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+}, à la naissance et en absence d'inflammation et d'infection. La distribution de ces deux mucines est similaire chez les porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}. MUC5B est retrouvée dans les glandes sous-muqueuses et dans les cellules à gobelets et MUC5AC uniquement dans les cellules à gobelet bordant la surface de l'épithélium. La localisation est identique chez l'homme ; les gènes codant pour MUC5B sont détectés dès la 13^{ème} semaine de vie fœtale au niveau de l'épithélium trachéal puis majoritairement détectés dans les glandes sous muqueuses à 23 semaines (Reid *et al.* 1997). Nos travaux sont en accord avec ceux publiés sur le modèle de porcelet CFTR développé aux Etats-Unis par Rogers *et al.* (Rogers *et al.* 2008 ; Meyerholz *et al.* 2010; Tang *et al.* 2016).

La clairance muco-ciliaire est un des éléments clés dans la défense et la lutte contre les infections bactériennes au niveau pulmonaire. Nous avons donc évalué l'efficacité du transport muco-ciliaire à éliminer les bactéries des poumons chez les porcelets CFTR^{-/-} à la naissance. Une étude précédente avait déjà mis en évidence une anomalie du transport muco-ciliaire chez les porcs CFTR^{-/-} nouveau-nés du fait d'un mucus collant et visqueux au niveau des canaux des glandes sous-muqueuses (Hoegger *et al.* 2014b). Dans cette étude, le transport muco-ciliaire a été évalué par détection par tomodensitométrie de particules de tantale. Ces particules sont beaucoup plus grandes (350 × 25 µm) que les bactéries (*P. aeruginosa* 0,8 x 3 µm) et ne présentent pas la même affinité pour le mucus (Hoegger *et al.* 2014a; Hoegger *et al.* 2014b). Cette approche ne prend pas en compte l'impact possible d'une stimulation bactérienne sur le transport muco-ciliaire. Par exemple, il a été démontré que l'activation de TLR2, TLR4 et TLR5 qui est impliquée dans la reconnaissance de *P. aeruginosa* (McIsaac *et al.* 2012) augmente les battements ciliaires (Fowler *et al.* 2013 ; Luan *et al.* 2017). En effet, le transport muco-ciliaire défectueux rapporté par Hoegger *et al.* n'a été observé qu'après stimulation cholinergique par la méthacholine, qui stimule la sécrétion de mucus dans les voies respiratoires. Une récente étude montre clairement que ces billes fluorescentes ne lient pas les faisceaux de mucines mais sont plutôt intégrées dans l'ASL et ne reflètent donc pas un transport muco-ciliaire réel (Ermund *et al.* 2017). Notre approche a consisté à évaluer l'efficacité du transport muco-ciliaire en réponse à une infection bactérienne, en tenant compte des facteurs de variabilité mentionnés ci-dessus. En utilisant une souche PAK-Lux de *P. aeruginosa* inoculée dans la trachée de porcelets nouveau-nés, nous avons démontré que le

transport muco-ciliaire est incapable d'éliminer les bactéries pathogènes *in vivo*, dès la naissance.

II. Mécanismes moléculaires régulant la sialylation des mucines respiratoires

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à identifier des mécanismes moléculaires qui pourraient expliquer l'augmentation de sialylation des mucines pulmonaires des porcelets CFTR^{-/-}. Nous avons tout d'abord étudié le niveau d'expression génique et protéique des sialyltransférases ST6GALNAC1 et ST3GAL1. Ces sialyltransférases greffent respectivement un résidu de NeuAc en α 2,6 sur la GalNAc du point d'attache ou en α 2,3 sur un résidu de Gal et sont impliquées dans la biosynthèse du sialyl-TF qui est majoritairement retrouvé au niveau des mucines pulmonaires de porcelets. Aucune variation du niveau d'expression des gènes ou des protéines n'a été observée entre les deux génotypes. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat. Il est possible que les modifications de sialylation des mucines ne soient dues qu'à certains types cellulaires présents au niveau de l'épithélium. Comme nous avons extrait les ARN à partir du tissu entier (et non pas après avoir trié les cellules), le signal de détection a pu être « dilué ». Deux études très récentes ont reporté l'existence de cellules très particulières dans le tractus respiratoire : les ionocytes, qui expriment très fortement la protéine CFTR. Ces cellules se situent à la surface de l'épithélium mais ne représentent qu'environ 1% des cellules épithéliales (Montoro *et al.* 2018 ; Plasschaert *et al.* en 2018). Il est possible également que la quantité protéique de sialyltransférases n'influe pas sur l'activité de ces dernières dans le cas présent. Les changements d'activité des sialyltransférases pourraient s'expliquer par des changements d'environnement cellulaire et moléculaire. Il a été démontré que le liquide de surface des voies aériennes (ASL) est plus acide dans les modèles animaux atteints de mucoviscidose (Pezzulo *et al.* 2012) et chez l'homme. La perte de sécrétion des ions HCO₃⁻ et Cl⁻ ainsi que l'action d'une adénosine triphosphatase H⁺/ K⁺ non gastrique (ATP12A) contribuent toutes deux à réduire le pH de l'ASL, donnant un mucus déshydraté et plus visqueux et entraînant une altération du transport muco-ciliaire. La diminution du pH pourrait aussi réguler l'activité intracellulaire des glycosyltransférases.

Nous avons ensuite évalué l'impact de l'activité des canaux CFTR sur la sialylation des mucines des voies respiratoires. Pour cela, deux inhibiteurs pharmacologiques bloquant le canal CFTR ont été testés sur des explants de trachées de porcelets CFTR^{+/+} : GlyH101 et CFTR_{inh-172}. Une augmentation significative de la sialylation des mucines a pu être observée dans les échantillons traités avec les inhibiteurs. Les analyses ont été faites à la fois sur les mucines provenant des cellules en gobelet de la surface et sur les mucines sécrétées par les glandes sous-muqueuses. De manière surprenante, nous avons observé une augmentation de la sialylation des mucines provenant des glandes sous-muqueuses non observée chez les porcelets CFTR^{-/-} à la naissance. Contrairement à la surface de l'épithélium, les glandes sous-muqueuses sont innervées de manière complexe et la sécrétion de mucines glandulaires est contrôlée par des neurotransmetteurs basolatéraux, par opposition aux cellules caliciformes de surface qui sécrètent des mucines en réponse à l'ATP ou l'UTP luminaux (Kim 1994). Il a déjà été démontré que la sécrétion des glandes est réduite dans des expériences *ex vivo*, par rapport à des expériences *in vivo* dans lesquelles l'apport sanguin des glandes est intact (Ueki *et al.* 1980). Cela pourrait affecter le renouvellement des mucines des glandes et interférer avec leurs modifications par les sialyltransférases. Dans nos expériences *in vivo*, les glandes sous-muqueuses sont innervées et aucune dérégulation de la sécrétion de mucines n'est attendue chez les porcs CFTR^{-/-}. Ces résultats indiquent un lien direct entre l'activité du canal CFTR et la modification de glycosylation des mucines. Par ailleurs le lien entre CFTR et sialylation des mucines est renforcé par les données obtenues lors de l'analyse de la glycosylation des mucines intestinales qui ont aussi montré une augmentation de la sialylation des mucines du tractus intestinal des porcelets CFTR^{-/-}.

L'augmentation de sialylation des mucines d'échantillons traités avec des inhibiteurs de l'activité du canal CFTR a été reproduite en traitant des cellules nasales de patients avec de la thapsigargine qui est un inhibiteur des pompes à calcium du réticulum endoplasmique. Il se pourrait que le dysfonctionnement du canal CFTR génère un stress du réticulum entraînant une modification de sialylation des mucines. Ces résultats semblent cohérents avec l'analyse transcriptomique des poumons de porcelets CFTR^{-/-} réalisée dans le cadre de cette thèse. Cette analyse n'a révélé que très peu de différences entre les deux groupes d'animaux mais nous avons quand même pu observer une expression plus forte de certains transcrits tels que TRIB3, CHAC1 et DUOX2 chez les porcelets CFTR^{-/-}. CHAC1 et TRIB3 codent pour deux protéines impliquées dans la réponse UPR dont le but est d'augmenter les capacités de repliement, de maturation, voire de dégradation du réticulum endoplasmique (Mungrue *et al.*

2009). Une corrélation entre le phénotype CF et la réponse UPR a déjà été rapportée précédemment (Blohmke *et al.* 2012).

III. Impact de l'environnement pulmonaire sur la capacité de *Pseudomonas aeruginosa* à infecter le tractus respiratoire des porcelets CFTR^{-/-}

La première étape de la colonisation bactérienne dans un tissu est le plus souvent une étape d'adhésion de la bactérie au mucus. Nous avons par conséquent comparé la capacité de *P. aeruginosa* à se fixer aux mucines purifiées à partir de trachées de porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+}. Le test d'adhésion que nous avons développé pour étudier l'adhésion des bactéries sur des mucines purifiées immobilisées sur des membranes de nitrocellulose a clairement mis en évidence une adhésion préférentielle de *P. aeruginosa* aux mucines sialylées des porcelets CFTR^{-/-}. Après désialylation chimique des mucines, les bactéries sont incapables de se lier aux mucines, suggérant un rôle prédominant des O-glycanes sialylés dans le processus d'adhésion de *P. aeruginosa* au mucus. Ce résultat est en accord avec des études antérieures montrant que de nombreuses souches de *P. aeruginosa*, qu'elles soient mucoïdes ou non, sont capables de reconnaître les résidus d'acide sialique à la surface des cellules ou sur les mucines et en particulier les oligosaccharides de type sialyl Lewis^x (Ramphal et Pyle 1983, Scharfman *et al.*, 2001, Scharfman *et al.*, 1999, Xia *et al.*, 2007) et que l'adhésion de *P. aeruginosa* aux mucines se produit par une interaction entre les glycanes sialylés et la coiffe FliD du flagelle bactérien (Arora *et al.*, 1998). La caractérisation biochimique et structurale des O-glycanes portés par les mucines des voies respiratoires des porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} a confirmé un niveau plus élevé de sialylation des mucines des porcelets CFTR^{-/-}, ce qui pourrait expliquer la fixation préférentielle de *P. aeruginosa* à ces mucines de porcelets CFTR^{-/-}.

Dans le cadre de la thèse, un modèle de culture primaire de cellules épithéliales bronchiques polarisées issues de porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+}, cultivées à l'interface air-liquide, a été développé. Nous avons ainsi pu démontrer que la croissance de *P. aeruginosa* était plus forte dans les cellules des porcelets CFTR^{-/-} que dans celles issues des CFTR^{+/+}. Ces résultats indiquent que l'environnement pulmonaire, et particulièrement le mucus sialylé, des porcelets CFTR^{-/-} semble être un environnement favorable pour l'adhésion et la colonisation du pathogène.

L'importance des acides sialiques dans le processus d'infection de *P. aeruginosa* a également été mis en évidence dans nos études de caractérisation des mucines respiratoires des porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+} infectés par le pathogène. Nous avons en effet démontré une très forte augmentation de la sialylation des mucines après infection, et ce quelque soit le génotype. De plus, les O-glycanes sialylés dont l'expression augmente fortement chez les CFTR^{+/+} après infection (et chez les CFTR^{-/-}) sont les mêmes que ceux exprimés constitutivement chez les CFTR^{-/-} à la naissance avant infection. Des études précédentes ont montré que les bactéries sont capables de réguler la glycosylation des mucines afin de se créer une niche écologique favorable (Joncquel Chevalier Curt *et al.* 2015). Ces résultats suggèrent donc que l'existence de ces O-glycanes sialylés dès la naissance pourrait constituer un avantage pour la colonisation du tractus respiratoire par *P. aeruginosa* et pourraient être un facteur prédisposant à l'infection dans la mucoviscidose.

L'analyse de l'expression des mucines dans les tissus pulmonaires des porcelets infectés indique une forte sécrétion des mucines au niveau de la lumière trachéale. Ces mucines composées de MUC5AC et de MUC5B sont organisées sous forme de strates et sont certainement sécrétées rapidement après l'infection dans la lumière de l'épithélium pour constituer une barrière physique de protection (Ridley et Thornton 2018).

IV. Conclusion générale et perspectives

En conclusion, nous rapportons ici pour la première fois une augmentation précoce de la sialylation des mucines respiratoires dans les poumons de porcelets CFTR^{-/-}, associée à une adhésion plus forte de *P. aeruginosa* aux mucines sialylées. Ce modèle expérimental, qui reproduit étroitement la maladie humaine, a permis de démontrer que ces altérations apparaissent dès la naissance, c'est-à-dire avant qu'une infection ou une inflammation ne soit détectée. Nous avons également démontré en utilisant deux modes différents d'infections *in vivo* ou *in vitro* avec des bactéries vivantes que la clairance muco-ciliaire est déficiente à la naissance chez les animaux CFTR^{-/-}. Les cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques dérivées des mêmes tissus montrent que la croissance de *P. aeruginosa* est favorisée dans les cellules des porcelets CFTR^{-/-}.

Cette augmentation de la sialylation, qui peut également résulter de l'inflammation chez des personnes non atteintes de mucoviscidose, pourrait être bénéfique pour la défense de l'hôte,

car elle pourrait permettre une meilleure élimination, via la clairance muco-ciliaire et l'adhésion des bactéries aux mucines, des agents pathogènes inhalés. Cependant, dans les poumons de personnes atteintes de mucoviscidose, ces propriétés altérées des mucines peuvent être préjudiciables car elles sont associées avec une diminution de l'efficacité de la clairance muco-ciliaire, une diminution des défenses immunitaires permettant d'éliminer les pathogènes et une meilleure adhésion des bactéries. Cela a pour conséquence une augmentation du temps de résidence des bactéries vivantes, leur permettant de s'échapper de la couche de mucus et de survivre suffisamment longtemps dans le liquide périciliaire pour infecter les tissus voisins. Nous proposons que ces trois propriétés contribuent de manière coopérative à la colonisation bactérienne et au développement de l'inflammation pulmonaire observée dans la mucoviscidose (Figure 109).

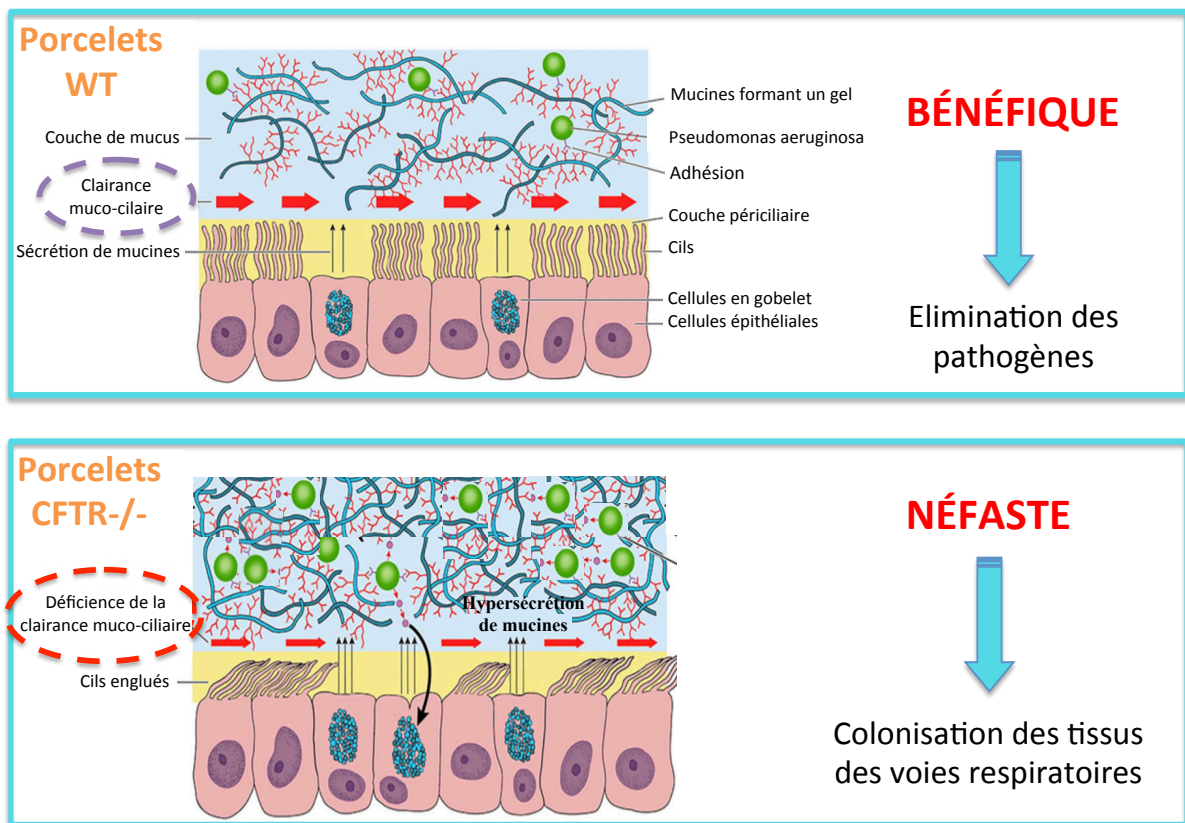


Figure 109. L'environnement pulmonaire des porcelets CFTR^{-/-} facilite la colonisation de *P. aeruginosa*.

Ce travail de thèse a permis de mieux comprendre comment *P. aeruginosa* est capable de croître et de survivre dans les poumons CFTR^{-/-} dont la composition biochimique du mucus est profondément altérée dès la naissance. Les données obtenues à partir de ces études fournissent de nouvelles pistes pour la conception de glycomimétiques sialylés ou de peptidomimétiques ciblant *P. aeruginosa* et pour le développement de nouvelles stratégies

thérapeutiques pour le traitement des infections bactériennes. Pouvoir diminuer le taux de O-glycanes sialylés dans les poumons pourrait également être bénéfique sur le plan thérapeutique pour les patients atteints de mucoviscidose en aidant à combattre l'adhérence bactérienne au mucus.

Plusieurs perspectives peuvent être envisagées pour poursuivre ce travail. Tout d'abord, afin de mieux décrypter les mécanismes conduisant à l'hypersialylation des mucines sécrétées à la surface des cellules en gobelet, il serait intéressant de comparer le transcriptomes des ionocytes pulmonaires (qui expriment fortement le CFTR) provenant des porcelets CFTR^{-/-} et CFTR^{+/+}. Des travaux préliminaires réalisés par l'équipe du Dr Pascal Barbry sur un porcelet CFTR^{-/-} et un CFTR^{+/+} semblent indiquer qu'un grand nombre de gènes varie entre les 2 génotypes, contrairement à ce que nous avons observé en réalisant le transcriptome global du poumon des porcelets. Parmi ces gènes, ceux codant pour les protéines ST3Gal1, ST6GalNAc2 et MUC5AC sont surexprimés dans les ionocytes de porcelets CFTR^{-/-} contrairement à ceux codant pour les protéines MUC5B et CFTR (Figure 110). Ces changements d'expression de gènes codant pour des glycosyltransférases pourraient expliquer les changements de sialylation des mucines de porcelets CFTR^{-/-}. Il faudrait, par immunohistochimie, pouvoir vérifier si les mucines sécrétées à proximité des ionocytes sont très fortement sialylées. Pour cela, il faudrait marquer des coupes sériées à l'aide d'anticorps anti-Foxi1 pour détecter la présence de CFTR et à l'aide de lectines SNA ou MAA ou alors par coloration PAS/BA des mucines.

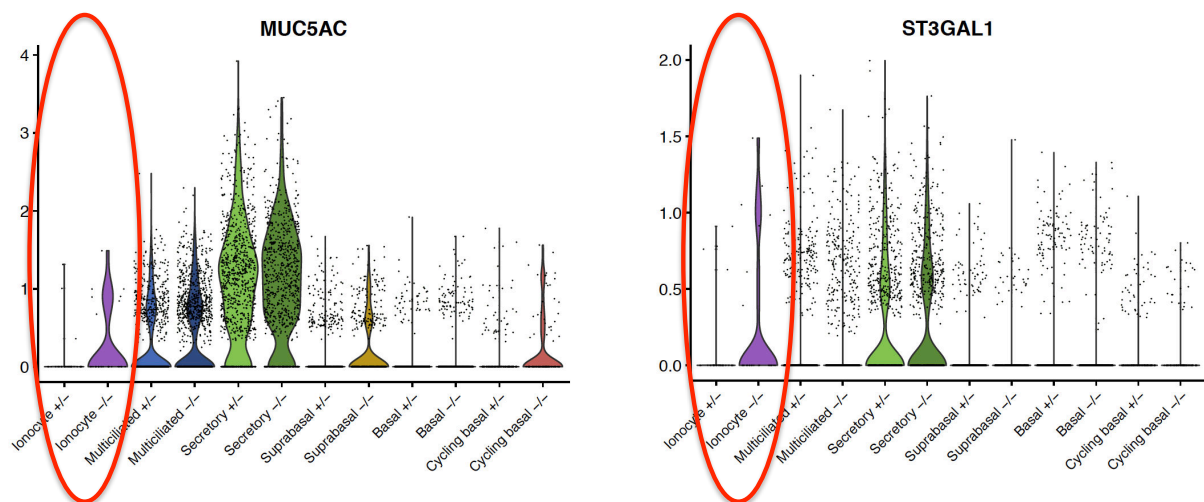


Figure 110 : Analyse des transcrits de MUC5AC et ST3GAL1 dans les ionocytes pulmonaires de porcelets CFTR^{+/+} et CFTR^{-/-}

Nos résultats préliminaires semblent indiquer que le flagelle de *P. aeruginosa* est capable de se fixer aux antigènes sialylTF et disialylTF. Pour confirmer ces résultats, nous envisageons d'étudier les paramètres physico-chimiques de l'interaction entre le flagelle et les oligosaccharides par résonance plasmonique de surface (SPR) et par cristallographie en co-cristallisant si possible le flagelle avec son ligand. Ces travaux devraient permettre de définir des glycomimétiques ou des peptidomimétiques efficaces pour empêcher *P. aeruginosa* de se fixer aux mucines et de coloniser le mucus.

D'un point de vue plus fondamental, il serait intéressant de pouvoir déterminer si les changements de sialylation des mucines en réponse à l'infection par *P. aeruginosa* sont majoritairement une réponse de l'hôte comme moyen de défense ou alors une régulation de la glycosylation par la bactérie pour se créer une niche favorable. Nous envisageons pour cela de co-infecter des cellules Calu-3 cultivées en interface air-liquide par différentes souches de *P. aeruginosa* inactivées ou non à la chaleur, par des mutants (Δ pilA, Δ FliC etc...), par des glycoconjugués purifiés (LPS, pili, flagelle), et par des surnageants de culture bactériens (contenant les métabolites de *P. aeruginosa*). Ce travail devrait nous permettre d'évaluer le rôle des différents glycoconjugués et des métabolites bactériens sur la sialylation des mucines et nous permettre de déterminer si des isolats cliniques, des souches mucoïdes ou non mucoïdes ont le même effet ou non.

Nous avons démontré que la sialylation des mucines est altérée dès la naissance des porcelets CFTR^{-/-}, avant les cycles d'inflammation et/ou d'infection et que ces modifications peuvent constituer un facteur de prédisposition à l'infection par *P. aeruginosa*. Sachant que *P. aeruginosa* n'est que très rarement le pathogène primo-colonisateur des poumons de patients atteints de mucoviscidose, il serait intéressant d'évaluer l'impact de cette sialylation sur la primo-colonisation du tractus respiratoire par *S. aureus* et sur la persistance de cette bactérie dans les poumons CF.

Le modèle de porcelet CFTR^{-/-} est un modèle animal très difficile à entretenir et très coûteux. Un nouveau modèle de rat KO est en cours de développement. Le gène CFTR est délété par l'utilisation d'une paire d'endonucléases à doigt de zinc (ZFN ; Tuggle *et al.*, 2014). Dans la mesure où l'organisation de l'épithélium respiratoire du rat est proche de celle de l'Homme, il serait intéressant de vérifier si les mêmes altérations de sialylation des mucines sont observées chez les rats CFTR^{-/-} à la naissance. Si c'est le cas, ce modèle permettrait d'évaluer l'efficacité de glycomimétiques ou de peptidomimétiques pour lutter contre l'infection à *P. aeruginosa*.

CHAPITRE



6

Bibliographie

-A-

Abou Alaiwa M. H., Reznikov R.R., Gansemer N.D., Sheets K.A., Horswill A.R., Stoltz D.A., Zabner J., Welsh M.J. pH modulates the activity and synergism of the airway surface liquid antimicrobials β -defensin-3 and LL-37. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 18703–18708 (2014).

Adamo R., Sokol S., Soong G., Gomez M.I., Prince A. Pseudomonas aeruginosa Flagella Activate Airway Epithelial Cells through asialoGM1 and Toll-Like Receptor 2 as well as Toll-Like Receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**, 627–634 (2004).

Aleksandrov A.A., Aleksandrov L.A. Riordan J.R. CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel. *Pflugers Arch.* **453**, 693–702 (2007).

Allen L., Dockrell D.H., Pattery T., Lee D.G., Cornelis P., Hellewell P.G., Whyte M.K. Pyocyanin Production by Pseudomonas aeruginosa Induces Neutrophil Apoptosis and Impairs Neutrophil-Mediated Host Defenses In Vivo. *The Journal of Immunology* **174**, 3643–3649 (2005).

Allen M.S. Surgery of the Trachea. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg* **48**, 231–237 (2015).

Ambort D., Van Der Post S., Johansson M.E.V., MacKenzie J., Thomsson E., Kregel U., Hansson G.C. Function of the CysD domain of the gel-forming MUC2 mucin. *Biochemical Journal* **436**, 61–70 (2011).

Andersen D.H. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease a clinical and pathologic study. *Am J Dis Child.* **56**, 344-399 (1938).

Andersen D.H. & Hodges R.G. Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. *Am J Dis Child* **72**, 62–80 (1946).

Andrianifahanana M., Moniaux N., Batra S.K. Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1765**, 189–222 (2006).

Arora S.K., Ritchings B.W., Almira E.C., Lory S., Ramphal R. The Pseudomonas aeruginosa Flagellar Cap Protein, FliD, Is Responsible for Mucin Adhesion. *Infection and Immunity* **66**, 1000–1007 (1998).

Arora S.K., Bangera M., Lory S., Ramphal, R. A genomic island in Pseudomonas aeruginosa carries the determinants of flagellin glycosylation. *PNAS* **98**, 9342–9347 (2001).

Arora S.K., Wolfgang M.C., Lory S., Ramphal R. Sequence Polymorphism in the Glycosylation Island and Flagellins of Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Bacteriology* **186**, 2115–2122 (2004).

Asker N., Axelsson M.A., Olofsson S.O., Hansson G.C. Human MUC5AC mucin dimerizes in the rough endoplasmic reticulum, similarly to the MUC2 mucin. *Biochem. J.* **335**, 381–387 (1998).

-B-

Bansil R. & Turner B. S. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **124**, 3–15 (2018).

- Barker A.P., Vasil A.I., Filloux A., Ball G., Wilderman P.J., Vasil M.L. A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol. Microbiol.* **53**, 1089–1098 (2004).
- Bell S.L., Xu G., Khatri I.A., Wang R., Rahman S., Forstner J.F. N-linked oligosaccharides play a role in disulphide-dependent dimerization of intestinal mucin Muc2. *Biochem. J.* **373**, 893–900 (2003).
- Billard L., Le Berre R., Pilorgé L., Payan C., Héry-Arnaud G., Vallet S. Viruses in cystic fibrosis patients' airways. *Crit. Rev. Microbiol.* **43**, 690–708 (2017).
- Birket S., Tuggle K., Chu K., Harris, W.T., Tearney G., Fanucchi M., Sorscher E.J., Rowe, S.M. The CFTR^{-/-} rat is susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Pediatric Pulmonology* **50**, 242–242 (2015).
- Birket S.E., Chu K.K., Houser G.H., Liu L., Fernandez C.M., Solomon G.M., Lin V., Shastry S., Mazur M., Sloane P.A., Hanes J., Grizzle W.E., Sorscher E.J., Tearney G.J., Rowe S.M. Combination therapy with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators augment the airway functional microanatomy. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **310**, L928-939 (2016).
- Birket S.E., Davis J.M., Fernandez C.M., Tuggle K.L., Oden A.M., Chu K.K., Tearney G.J., Fanucchi M.V., Sorscher E.J., Rowe S.M. Development of an airway mucus defect in the cystic fibrosis rat. *JCI Insight* **3** (2018).
- Blohmke C.J., Mayer M.L., Tang A.C., Hirschfeld A.F., Fjell C.D., Sze M.A., Falsafi R., Wang S., Hsu K., CHilvers M.A., Hogg J.C., Hancock R.E., Turvey S.E. Atypical activation of the unfolded protein response in cystic fibrosis airway cells contributes to p38 MAPK-mediated innate immune responses. *J Immunol* **189**, 5467-75 (2012).
- Boat T.F., Cheng P.W., Wood, R.E. Tracheobronchial mucus secretion in vivo and in vitro by epithelial tissues from cystic fibrosis and control subjects. *Mod Probl Paediatr* **19**, 141–152 (1976).
- Bonser L.R., Zlock L., Finkbeiner W., Erle D.J. Epithelial tethering of MUC5AC-rich mucus impairs mucociliary transport in asthma. *Journal of Clinical Investigation* **126**, 2367–2371 (2016).
- Bonvin E., Le Rouzic P., Bernaudin J.F., Cottart C.H., Vandebrouck C., Crié A., Leal T., Clement A., Bonora M. Congenital tracheal malformation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *J. Physiol. (Lond.)* **586**, 3231–3243 (2008).
- Bragonzi A., Paroni M., Pirone L., Coladarci I., Ascenzioni F., Bevivino A. Environmental *Burkholderia cenocepacia* Strain Enhances Fitness by Serial Passages during Long-Term Chronic Airways Infection in Mice. *Int J Mol Sci* **18**, (2017).
- Brimer C.D. & Montie T.C. Cloning and Comparison of fliC Genes and Identification of Glycosylation in the Flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-Type Strains. *J Bacteriol* **180**, 3209–3217 (1998).
- Bruscia, E.M., Zhang P., Barone C., Scholte B.J., Homer R., Krause D.S., Egan M.E. Increased susceptibility of Cfr^{-/-} mice to LPS-induced lung remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **310**, L711–L719 (2016).
- Brunelli R., Papi M., Arcovito G., Bompiani A., Castagnola M., Parasassi T., Sampaiolese B., Vincenzoni F., De Spirito M. Globular structure of human ovulatory cervical mucus. *FASEB J.* **21**, 3872–3876 (2007).
- Bucior I., Pielage J.F., Engel J.N. *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. *PLoS Pathog* **8** (2012).
- Burns J.L., Emerson J., Kuypers J., Campbell A.P., Gibson R.L., McNamara S., Worell K., Englund J.A. Respiratory viruses in children with cystic fibrosis: viral detection and clinical findings. *Influenza Other Respir Viruses* **6**, 218–223 (2012).

Burrows L.L. *Pseudomonas aeruginosa* Twitching motility : type IV pili in action. Annual review of microbiology (2012).

Bustamante-Marin X.M. & Ostrowski L.E. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, (2017).

Byrd J.C. & Bresalier R.S. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **23**, 77–99 (2004).

Byrd M.S., Sadovskaya I., Vinogradov E., Lu H., Sprinkle A.B., Richardson S.H., Ma L., Ralston B., Parsek M.R., Anderson E.M., Lam J.S., Wozniak D.J. Genetic and Biochemical Analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl Exopolysaccharide Reveal Overlapping Roles for Polysaccharide Synthesis Enzymes in Psl and LPS Production. *Mol Microbiol* **73**, 622–638 (2009).

-C-

Caci E., Caputo A., Hinspeter A., Arous N., Fanen P., Sonawane N., Verkman A.S., Ravazzolo R., Zegarra-Moran O., Galletta L.J. Evidence for direct CFTR inhibition by CFTR(inh)-172 based on Arg347 mutagenesis. *Biochem J* **413**, 135-42 (2008).

Cantin A.M., Fells G.A., Hubbard R.C. & Crystal R.G. Antioxidant macromolecules in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract. *Journal of Clinical Investigation* **86**, 962–971 (1990).

Cao X., Bansil R., Bhaskar K.R., Turner B.S., LaMont J.T., Niu N., Afdhal N.H. pH-dependent conformational change of gastric mucin leads to sol-gel transition. *Biophys. J.* **76**, 1250–1258 (1999).

Carlson D.M. Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *J. Biol. Chem.* **243**, 616–626 (1968).

Carraway K.L., Funes M., Workman H. C. & Sweeney C. Contribution of membrane mucins to tumor progression through modulation of cellular growth signaling pathways. *Curr. Top. Dev. Biol.* **78**, 1–22 (2007).

Carnoy C., Ramphal R., Scharfman A., Lo-guidice J.M., Houdret N., Klein A., Galabert C., Lamblin G., Roussel P. Altered Carbohydrate Composition of Salivary Mucins from Patients with Cystic Fibrosis and the Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **9**, 323–334 (1993).

Carnoy C., Scharfman A., Van Brussel E., Lamblin G., Ramphal R., Roussel P. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane adhesins for human respiratory mucus glycoproteins. *Infect Immun* **62**, 1896–1900 (1994).

Celli J.P., Turner B.S., Afdhal N.H., Ewoldt R.H., McKinley G.H., Bansil R., Erramilli S. Rheology of gastric mucin exhibits a pH-dependent sol-gel transition. *Biomacromolecules* **8**, 1580-6 (2007).

Chace K.V., Leahy D.S., Martin R., Carubelli R., Flux M., Sachdev G.P. Respiratory mucous secretions in patients with cystic fibrosis: relationship between levels of highly sulfated mucin component and severity of the disease. *Clinica Chimica Acta* **132**, 143–155 (1983).

Chace K.V., Flux M., Sachdev G.P. Comparison of physicochemical properties of purified mucus glycoproteins isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis and asthmatic patients. *Biochemistry* **24**, 7334-41 (1985).

Cigana C., Lorè N.I., Riva C., De Fino I., Spagnuolo L., Sipione B., Rossi G., Nonis A., Cabrini G., Bragonzi A. Tracking the immunopathological response to *Pseudomonas aeruginosa* during respiratory infections. *Sci Rep* **6**, 21465 (2016).

Clarke L.L., Grubb B.R., Gabriel S.E., Smithies O., Koller B.H., Boucher R.C. Defective epithelial chloride transport in a gene targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science.* **257**(5073):1125-8 (1992).

Colomb F., Krzewinski-Recchi M.A., El Machhour F., Mensier E., Jaillard S., Steenackers A., Harduin-Lepers A., Lafitte J.J., Delannoy P., Groux-Degroote S. TNF regulates sialyl-Lewis^x and 6-sulfo-sialyl-Lewis^x expression in human lung through up-regulation of ST3GAL4 transcript isoform BX. *Biochimie* **94**, 2045–2053 (2012).

Colomb F., Vidal O., Bobowski M., Krzewinski-Recchi M.A., Harduin-Lepers A., Mensier E., Jaillard S., Lafitte J.J., Delannoy P., Groux-Degroote S. TNF induces the expression of the sialyltransferase ST3Gal IV in human bronchial mucosa via MSK1/2 protein kinases and increases FliD/sialyl-Lewis^x-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Journal* **457**, 79–87 (2014).

Colvin K.M., Gordon V.D., Murakami K., Borlee B.R., Wozniak D.J., Wong G.C., Parsek M.R. The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* **7**, (2011).

Colvin K.M., Irie Y., Tart C.S., Urbano R., Whitney J.C., Ryder C., Howell P.L., Wozniak D.J., Parsek M.R. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol* **14**, (2012).

Cone R.A. Barrier properties of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 75–85 (2009).

Craig Cohen J., Lundblad L.K., Bates J.H., Levitzky M., Larson J.E. The ‘Goldilocks Effect’ in Cystic Fibrosis: identification of a lung phenotype in the cftr knockout and heterozygous mouse. *BMC Genet* **5**, 21 (2004).

Crawford R.R., Prescott E.T., Sylvester C.F., Higdon A.N., Shan J., Kilberg M.S., Mungrue I.N. Human CHAC1 protein degrades glutathione, and mRNA induction is regulated by the transcription factors ATF4 and ATF3 and a bipartite ATF/CRE regulatory element. *J Biol Chem* **290**, 15878–15891 (2015).

Crost E.H., Tailford L.E., Monestier M., Swarbreck D., Henrissat B., Crossman L.C., Juge N. The mucin-degradation strategy of *Ruminococcus gnavus*: The importance of intramolecular trans-sialidases. *Gut Microbes* **7**, 302–312 (2016).

-D-

Dalemans W., Barbry P., Champigny G., Jallat S., Dott K., Dreyer D., Crystal R.G., Pavirani A., Lecocq J.P., Lazdunski M. Altered chloride ion channel kinetics associated with the $\Delta F508$ cystic fibrosis mutation. *Nature* **354**, 526–528 (1991).

Darnell M.E.R., Plant E.P., Watanabe H., Byrum R., St Claire M., Ward J.M., Taylor D.R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in vaccinated ferrets. *J. Infect. Dis.* **196**, 1329–1338 (2007).

Darrah R.J., Bederman I.R., Mitchell A.L., Hodges C.A., Campanaro C.K., Drumm M.L., Jacono F.J. Ventilatory pattern and energy expenditure are altered in cystic fibrosis mice. *J Cyst Fibros* **12**, 345–351 (2013).

Darrah R. J., Mitchell A.L., Campanaro C.K., Barbato E.S., Litman P., Sattar A., Hodges C.A., Drumm M.L., Jacono F.J. Early pulmonary disease manifestations in cystic fibrosis mice. *J. Cyst. Fibros.* **15**, 736–744 (2016).

Darrah R., Bederman I., Vitko M., Valerio D.M., Drumm M.L., Hodges C.A. Growth deficits in cystic fibrosis mice begin in utero prior to IGF-1 reduction. *PLoS One* **12**, (2017).

Dasgupta N., Wolfgang M.C., Goodman A.L., Arora S.K., Jyot J., Lory S., Ramphal R. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* **50**, 809–824 (2003).

Davril M., Degroote S., Humbert P., Galabert C., Dumur V., Lafitte J., Lamblin G., Roussel P. The sialylation of bronchial mucins secreted by patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis is related to the severity of airway infection. *Glycobiology* **9**, 311–321 (1999).

Davies J.R., Svitacheva N., Lannefors L., Kornfält R., Carlstedt I. Identification of MUC5B, MUC5AC and small amounts of MUC2 mucins in cystic fibrosis airway secretions. *Biochem J* **344**, 321–330 (1999).

Davis C.W. & Lazarowski E. Coupling of airway ciliary activity and mucin secretion to mechanical stresses by purinergic signaling. *Respiratory Physiology & Neurobiology* **163**, 208–213 (2008).

Davidson D.J. & Rolfe M. Mouse models of cystic fibrosis. *Trends in Genetics* **17**, S29–S37 (2001).

DeBeer D., Stoodley P., Roe F., Lewandowski Z. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology and Bioengineering* **43**, 1131–1138 (1994).

DeBoeck K., Amaral M.D. Progress in therapies for cystic fibrosis. *The Lancet Respiratory Medicine* **4**, 662–674 (2016).

Dekker J., Rossen J.W.A., Büller H.A., Einerhand A.W.C. The MUC family: an obituary. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 126–131 (2002).

Delmotte P., Degroote S., Merten M.D., Van Seuning I., Bernigaud A., Figarella C., Roussel P., Périni J.M. Influence of TNF α on the sialylation of mucins produced by a transformed cell line MM-39 derived from human tracheal gland cells. (2001).

Delmotte P., Degroote S., Lafitte J., Lamblin G., Périni J., Roussel P. Tumor necrosis factor alpha increases the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases responsible for the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewis x epitopes in the human bronchial mucosa. *J. Biol. Chem.* **277**, 424–431 (2002).

Demouveau B., Gouyer V., Gottrand F., Narita T., Desseyn, J.L. Gel-forming mucin interactome drives mucus viscoelasticity. *Advances in Colloid and Interface Science* **252**, 69–82 (2018).

Desseyn J.L., Aubert J.P., Porchet N., Laine A. Evolution of the large secreted gel-forming mucins. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 1175–1184 (2000).

Desseyn J.L. Mucin CYS domains are ancient and highly conserved modules that evolved in concert. *Mol. Phylogenet. Evol.* **52**, 284–292 (2009).

Devine P.L., McKenzie I.F. Mucins: structure, function, and associations with malignancy. *Bioessays* **14**, 619–625 (1992).

Dhanisha S.S., Guruvayoorappan C., Drishya S., Abeesh P. Mucins: Structural diversity, biosynthesis, its role in pathogenesis and as possible therapeutic targets. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **122**, 98–122 (2018).

Di Bonaventura G., Spedicato I., D'Antonio D., Robuffo I., Piccolomini R. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 151–160 (2004).

Di Sant'Agnes P., Darling R.C., Perara G.A., Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *AMA Am J Dis Child.* **86**, 618-9; discussion, 619 (1953).

Drumm M.L., Konstan M.W., Schluchter M.D., Handler A., Pace R., Zou F., Zariwala M., Fargo D., Xu A., Dunn J.M., Darrah R.J., Dorfman R., Sandford A.J., Corey M., Zielenski J., Durie P., Goddard K., Yankaskas J.R., Wright F.A., Knowles M.R. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1443–1453 (2005).

-E-

Ehre C., Rossi A.H., Abdullah L.H., De Pestel K., Hill S., Olsen J.C., Davis C.W. Barrier role of actin filaments in regulated mucin secretion from airway goblet cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **288**, C46-56 (2005).

Engelhardt, J. F., Yankaskas J.R., Ernst S.A., Yang Y., Marino C.R., Boucher R.C., Cohn J.A., Wilson J.M. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat. Genet.* **2**, 240–248 (1992).

Ermund A., Meiss L.N., Rodriguez-Pineiro A.M., Bähr A., Nilsson H.E., Trillo-Muyo S., Ridley C., Thornton D.J., Wine J.J., Hebert H., Klymiuk N., Hansson G.C. The normal trachea is cleaned by MUC5B mucin bundles from the submucosal glands coated with the MUC5AC mucin. *Biochem Biophys Res Commun.* **492**, 331-337 (2017).

Estrellas P.S., Alionte L.G., Hobden J.A. A *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a contact lens-induced acute red eye (CLARE) is protease-deficient. *Curr. Eye Res.* **20**, 157–165 (2000).

-F-

Fanconi G., Uehlinger E., Knauer C. Das coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiektasien. *Wien Med Wschr* **86**:753-756 (1936).

Farber S., Shwachman H., Maddock C.L. Pancreatic function and disease in early life. I. Pancreatic Enzyme activity and the celiac syndrome. *J Clin Invest.* **22**(6):827-38 (1943).

Fischer H. Mechanisms and function of DUOX in epithelia of the lung. *Antioxid Redox Signal* **11**, 2453-65 (2009).

Filloux A., Vallet I. Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *ms* **19**, 77–83 (2003).

Flass T., Narkewicz M.R. Cirrhosis and other liver disease in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **12**, 116–124 (2013).

Foley B.T., Moehring J.M., Moehring T.J. Mutations in the elongation factor 2 gene which confer resistance to diphtheria toxin and *Pseudomonas* exotoxin A. Genetic and biochemical analyses. *J. Biol. Chem.* **270**, 23218–23225 (1995).

Fowler C.J., Olivier K.N., Leung J.M., Smith C.C., Huth A.G., Root H., Kuhns D.B., Logun C., Zelazny A., Frein C.A., Daub J., Haney C., Shelhamer J.H., Bryant C.E., Holland S.M. Abnormal nasal nitric oxide production, ciliary beat frequency, and Toll-like receptor response in pulmonary nontuberculous mycobacterial disease epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 1374-81 (2013).

Franklin M.J., Nivens D.E., Weadge J.T., Howell P.L. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol* **2**, (2011).

Freeze H.H. Genetic defects in the human glycome. *Nature Reviews Genetics* **7**, 537–551 (2006).

Friedman L., Kolter R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology* **51**, 675–690 (2004).

Frizzell R.A., Hanrahan J.W. Physiology of Epithelial Chloride and Fluid Secretion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2**, (2012).

Fukuda, M., Kawakubo M., Ito Y., Kobayashi M., Lee H., Nakayama J. Assay of human gastric mucin as a natural antibiotic against *Helicobacter pylori*. *Meth. Enzymol.* **415**, 164–179 (2006).

-G-

Gadsby D.C., Vergani P., Csanády L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* **23**; 440(7083), 477-83, (2006).

Gagné-Thivierge C., Barbeau J., Levesque R.C., Charette S.J. A new approach to study attached biofilms and floating communities from *Pseudomonas aeruginosa* strains of various origins reveals diverse effects of divalent ions. *FEMS Microbiol Lett* **365**, (2018).

- Galloway D.R. Pseudomonas aeruginosa elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Molecular Microbiology* **5**, 2315–2321 (1991).
- Gelfond D., Borowitz D. Gastrointestinal complications of cystic fibrosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 333–342; quiz e30-31 (2013).
- Gerbe F. & Jay P. Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal Immunol* **9**, 1353–1359 (2016).
- Ghafoor A., Hay I.D., Rehm B.H.A. Role of Exopolysaccharides in Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation and Architecture ∇ . *Appl Environ Microbiol* **77**, 5238–5246 (2011).
- Gibson R.L., Burns J.L., Ramsey B.W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 918–951 (2003).
- Gibson-Corley K.N., Meyerholz D.K., Engelhardt J.F. Pancreatic pathophysiology in cystic fibrosis. *J. Pathol.* **238**, 311–320 (2016).
- Gilks C.B., Reid P.E., Clement P.B., Owen D.A. Simple procedure for assessing relative quantities of neutral and acidic sugar in mucin glycoproteins : its use in assessing cyclical changes in cervical mucins. *J Clin Pathol* **41**, 1021-4 (1988).
- Gloag E.S., German G.K., Stoodley P., Wozniak D.J. Viscoelastic properties of Pseudomonas aeruginosa variant biofilms. *Sci Rep* **8**, (2018).
- Godl K., Johansson M.E., Lidell M.E., Mörgelin M., Karlsson H., Olson F.J., Gum J.R. jr, Kim Y.S., Hansson G.C. The N Terminus of the MUC2 Mucin Forms Trimers That Are Held Together within a Trypsin-resistant Core Fragment. *J. Biol. Chem.* **277**, 47248–47256 (2002).
- Golovkine G., Faudry E., Bouillot S., Elsen S., Attrée I., Huber P. Pseudomonas aeruginosa Transmigrates at Epithelial Cell-Cell Junctions, Exploiting Sites of Cell Division and Senescent Cell Extrusion. *PLoS Pathog* **12**, (2016).
- Govan J.R. & Nelson J.W. Microbiology of cystic fibrosis lung infections: themes and issues. *J R Soc Med* **86 Suppl 20**, 11–18 (1993).
- Groux-Degroote S., Krzewinski-Recchi M., Cazet A., Vincent A., Lehoux S., Lafitte J., Van Seuning I., Delannoy P. IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewis^x epitopes in the human bronchial mucosa. *Biochemical Journal* **410**, 213–223 (2008).
- Grubb B.R., Vick R.N., Boucher R.C. Hyperabsorption of Na⁺ and raised Ca²⁺-mediated Cl⁻ secretion in nasal epithelia of CF mice. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **266**, C1478–C1483 (1994).
- Grubb B.R. & Boucher R.C. Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis. *Physiol. Rev.* **79**, S193-214 (1999).
- Gum J.R., Hicks J.W., Toribara N.W., Siddiki B., Kim Y.S. Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* **269**, 2440–2446 (1994).
- Gum J.R. jr, Ho J.J., Pratt W.S., Hicks J.W., Hill A.S., Vinall L.E., Robertson A.M., Swallow D.M., Kim Y.S. MUC3 human intestinal mucin. Analysis of gene structure, the carboxyl terminus, and a novel upstream repetitive region. *J. Biol. Chem.* **272**, 26678–26686 (1997).
- Gum J.R., Crawley S.C., Hicks J.W., Szymkowski D.E., Kim Y.S. MUC17, a novel membrane-tethered mucin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 466–475 (2002).

-H-

Hauser A.R. & Ozer E.A. *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Reviews Microbiology* (2011).

Hauser A.R. The Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by Injection. *Nat Rev Microbiol* **7**, 654–665 (2009).

Hayashi N., Nishizawa H., Kitao S., Deguchi S., Nakamura T., Fujimoto A., Shikata M., Gotoh N. *Pseudomonas aeruginosa* injects type III effector ExoS into epithelial cells through the function of type IV pili. *FEBS Lett.* **589**, 890–896 (2015).

Heck L.W., Alarcon P.G., Kulhavy R.M., Morihara K., Russel M.W., Mestecky J.F. Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *The Journal of Immunology* **144**, 2253–2257 (1990).

Hentzer M., Teitzel G.M., Balzer G.J., Heydorn A., Molin S., Givskov M., Parsek M.R. Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. *J Bacteriol* **183**, 5395–5401 (2001).

Hoegger, M.J., Fischer A.J., McMenimen J.D., Ostedgaard L.S., Tucker A.J., Awadalla M.A., Moninger T.O., Michalski A.S., Hoffman E.A., Zabner J., Stoltz D.A., Welsh M.J. Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis. *Science* **345**, 818–822 (2014a).

Hoegger M.J., Awadalla M., Namati E., Itani O.A., Fischer A.J., Tucker A.J., Adam R.J., McLennan G., Hoffman E.A., Stoltz D.A., Welsh M.J. Assessing mucociliary transport of single particles in vivo shows variable speed and preference for the ventral trachea in newborn pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 2355–60 (2014b).

Hofsteenge J., Mueller D.R., De Beer T., Loeffler A., Richter W.J., Vliegthart J.F.G. New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry* **33**, 13524–13530 (1994).

Hounsell E.F., Davies M.J., Renouf D.V. O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconj. J.* **13**, 19–26 (1996).

Howitt M.R., Lavoie S., Michaud M., Blum A.M., Tran S.V., Weinstock J.V., Gallini C.A., Redding K., Margolskee R.F., Osborne L.C., Artis D., Garrett W.S. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science* **351**, 1329–1333 (2016).

-I-

Iglewski B.H., Liu P.V., Kabat D. Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian elongation factor 2 in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* **15**, 138–144 (1977).

Ishibashi Y., Inouye Y., Okano T., Taniguchi, A. Regulation of sialyl-Lewis x epitope expression by TNF- α and EGF in an airway carcinoma cell line. *Glycoconjugate Journal* **22**, 53–62 (2005).

Itoh Y., Kamata-Sakurai M., Denda-Nagai K., Nagai S., Tsuiji M., Ishii-Schrade K., Okada K., Goto A., Fukayama M., Irimura T. Identification and expression of human epiglycanin/MUC21: a novel transmembrane mucin. *Glycobiology* **18**, 74–83 (2008).

Iwai T., Zhang Y., Gotoh M., Iwasaki H., Kudo T., Togayachi A., Ishizuka Y., Nakanishi H., Narimatsu H. Molecular Cloning and Characterization of a Novel UDP-GlcNAc:GalNAc-peptide β 1,3- N-Acetylglucosaminyltransferase (β 3Gn-T6), an Enzyme Synthesizing the Core 3 Structure of O-Glycans. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 12802–12809 (2002).

-J-

Jeffries J.L., Jia J., Choi W., Choe S., Miao J., Xu Y., Powell R., Lin J., Kuang Z., Gaskins H.R., Lau G.W. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin modulates mucin glycosylation with sialyl-Lewisx to increase binding to airway epithelial cells. *Mucosal Immunol* **9**, 1039–1050 (2016).

Jensen P. Ø., Bjarnsholt T., Phipps R., Rasmussen T.B., Calum H., Christoffersen L., Moser C., Williams P., Pressler T., Givskov M., Høiby N. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, Engl.)* **153**, 1329–1338 (2007).

Jennings L.K., Storek K.M., Ledvina H.E., Coulon C., Marmont L.S., Sadovskaya I., Secor P.R., Tseng B.S., Scian M., Filloux A., Wozniak D.J., Howell P.L., Parsek M.R. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 11353–11358 (2015).

Joba W. & Hoffmann W. Similarities of integumentary mucin B.1 from *Xenopus laevis* and prepro-von Willebrand factor at their amino-terminal regions. *J. Biol. Chem.* **272**, 1805–1810 (1997).

Johansson M.E., Gustafsson J.K., Sjöberg K.E., Petersson J., Holm L., Sjövall H., Hansson G.C. Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PLoS ONE* **5**, e12238 (2010).

Johansson M.E., Larsson J.M.H. & Hansson G.C. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108 Suppl 1**, 4659–4665 (2011).

Johansson M.E. & Hansson, G.C. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 639–649 (2016).

Jonquel Chevalier Curt, M. Lecointe, K.; Mihalache, A.; Rossez, Y.; Gosset, P.; Léonard, R.; Robbe-Masselot, C. Alteration or adaptation, the two roads for human gastric mucin glycosylation infected by *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* **25**, 617–631 (2015).

Juge N. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol.* **20**, 30–39 (2012).

Ju T. & Cummings R.D. Chaperone mutation in Tn syndrome: Protein glycosylation. *Nature* **437**, 1252–1252 (2005).

-K-

Keiser N.W. & Engelhardt J.F. New animal models of cystic fibrosis: what are they teaching us? *Curr Opin Pulm Med* **17**, 478–483 (2011).

Kent G., Oliver M., Foskett J.K., Frndova H., Durie P., Forstner J., Forstner G.G., Riordan J.R., Percy D., Buchwald M. Phenotypic abnormalities in long-term surviving cystic fibrosis mice. *Pediatr. Res.* **40**, 233–241 (1996).

Kerem B.S., Buchanan J.A., Durie P., Corey M.L., Levison H., Rommens J.M., Buchwald M., Tsui L.C. DNA marker haplotype association with pancreatic sufficiency in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet.* **44**, 827–34 (1989).

Kesimer M., Ehre C., Burns K.A., Davis C.W., Sheehan J.K., Pickles R.J. Molecular organization of the mucins and glycocalyx underlying mucus transport over mucosal surfaces of the airways. *Mucosal Immunology* **6**, 379–392 (2013).

Kim K.C., Zheng Q.X., Wilson A.K., Lee B.C., Berman J.S. Binding kinetics of ATP gamma S35 on cultured primary tracheal surface epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **10**, 154–9 (1994).

Kipnis E., Sawa T., Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* **36**, 78–91 (2006).

Kirkham S., Sheehan J.K., Knight D., Richardson P.S., Thornton D.J. Heterogeneity of airways mucus : variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *10* (2002).

Klymiuk N., Mundhenk L., Kraehe K., Wuensch A., Plog S., Emrich D., Langenmayer M.C., Stehr M., Holzinger A., Kröner C., Richter A., Kessler B., Kurome M., Eddicks M., Nagashima H., Heinritzi K., Gruber A.D., Wolf E. Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. *Journal of Molecular Medicine* **90**, 597–608 (2012).

Krammer, F., Hai R., Yondola M., Tan G.S., Leyva-Grado V.H., Ryder A.B., Miller M.S., Rose J.K., Palese P., García-Sastre A., Albrecht R.A. Assessment of influenza virus hemagglutinin stalk-based immunity in ferrets. *J. Virol.* **88**, 3432–3442 (2014).

Kreda S.M., Davis C.W., Rose M.C. CFTR, Mucins, and Mucus Obstruction in Cystic Fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, (2012).

-L-

Lachowicz-Scroggins M.E. Yuan S., Kerr S.C., Dunican E.M., Yu M., Carrington S.D., Fahy J.V. Abnormalities in MUC5AC and MUC5B Protein in Airway Mucus in Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **194**, 1296–1299 (2016).

Lamblin, G. Lhermitte M., Lafitte J.J., Filliat M., Degand P., Roussel P. Comparative study of bronchial mucins isolated from the sputum of patients suffering from cystic fibrosis or other chronic bronchial diseases (author's transl). *Bull Eur Physiopathol Respir* **13**, 175–190 (1977).

Lamblin, G., Degroote S., Perini J.M., Delmotte P., Scharfman A., Davril M., Lo-Guidice J.M., Houdret N., Dumur V., Klein A., Rousse P. Human airway mucin glycosylation: a combinatorial of carbohydrate determinants which vary in cystic fibrosis. *Glycoconj. J.* **18**, 661–684 (2001).

Lau G.W., Hassett D.J., Ran H., Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine* **10**, 599–606 (2004).

Lazatin J.O., Glick M.C., Scanlin T.F. Fucosylation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Glycosylation & Disease* **1**, 263–270 (1994).

Lidell M.E., Johansson M.E., Hansson G.C. An autocatalytic cleavage in the C terminus of the human MUC2 mucin occurs at the low pH of the late secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **278**, 13944–13951 (2003).

Lidell M.E., Hansson, G.C. Cleavage in the GDPH sequence of the C-terminal cysteine-rich part of the human MUC5AC mucin. *Biochem. J.* **399**, 121–129 (2006).

Lo-Guidice J.M., Wieruszkeski J.M., Lemoine J., Verbert A., Roussel P., Lamblin G. Sialylation and sulfation of the carbohydrate chains in respiratory mucins from a patient with cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.* **269**, 18794–18813 (1994).

Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol* **7**, (2016).

Loxham M. & Davies D.E. Phenotypic and genetic aspects of epithelial barrier function in asthmatic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **139**, 1736–1751 (2017).

Luan X., Belev G., Tam J.S., Jagadeeshan S., Hassan N., Gioino P., Grishchenko N., Huang Y., Carmalt J.L., Duke T., Jones T., Monson B., Burmester M., Simovich T., Yilmaz O., Campanucci V.A., Machen T.E., Chapman L.D., Ianowski J.P. Cystic fibrosis swine fail to secrete airway surface liquid in response to inhalation of pathogens. *Nat Commun.* **8**, 786 (2017).

-M-

Ma J., Rubin B.K. & Voynow J.A. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest* **154**, 169–176 (2018).

Macao B., Johansson D.G.A., Hansson G.C., Härd T. Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 71–76 (2006).

Mahenthiralingam E., Campbell M.E. & Speert D.P. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* **62**, 596–605 (1994).

Mall M.A. & Boucher R.C. Pathophysiology of cystic fibrosis lung disease. *European Respiratory Monograph* **64**, 1–13 (2014).

Martens E.C., Neumann M. & Desai M.S. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier. *Nat. Rev. Microbiol.* (2018).

May T.B. & Chakrabarty A.M. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends in Microbiology* **2**, 151–157 (1994).

Mazola Y., China G. & Musacchio A. Integrating Bioinformatics Tools to Handle Glycosylation. *PLoS Comput Biol* **7**, (2011).

McClure C.D. & Schiller N.L. Inhibition of Macrophage Phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids In Vitro and In Vivo. *Current Microbiology* **33**, 109–117 (1996).

McCullagh C.M., Jamieson A.M., Blackwell J. & Gupta R. Viscoelastic properties of human tracheobronchial mucin in aqueous solution. *Biopolymers* **35**, 149–159 (1995).

McGuckin M.A., Eri R.D., Das I., Lourie R. & Florin T.H. ER stress and the unfolded protein response in intestinal inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **298**, G820–G832 (2010).

McIsaac S.M., Stadnyk A.W., Lin T.J. Toll-like receptors in the host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection and cystic fibrosis. *J. Leukoc. Biol.* 2012 **92**, 977–85 (2012).

Meyerholz D.K., Stoltz D.A., Namati E., Ramachandran S., Pezzulo A.A., Smith A.R., Rector M.V., Suter M.J., Kao S., McLennan G., Tearney G.J., Zabner J., McCray P.B. Jr, Welsh M.J. Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function produces abnormalities in tracheal development in neonatal pigs and young children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010 **182**, 1251–61 (2010).

Minamino T., Imada K. & Namba K. Molecular motors of the bacterial flagella. *Current Opinion in Structural Biology* **18**, 693–701 (2008).

Moens S. & Vanderleyden J. Functions of bacterial flagella. *Crit. Rev. Microbiol.* **22**, 67–100 (1996).

Montie T.C., Doyle-Huntzinger D., Craven R.C. & Holder I.A. Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. *Infection and Immunity* **38**, 1296–1298 (1982).

Montoro D.T. Haber A.L., Biton M., Vinarsky V., Lin B., Birket S.E., Yuan F., Chen S., Leung H.M., Villoria J., Rogel N., Burgin G., Tsankov A.M., Waghray A., Slyper M., Waldman J., Nguyen L., Dionne D., Rozenblatt-Rosen O., Tata P.R., Mou H., Shivaraju M., Bihler H., Mense M., Tearney G.J., Rowe S.M., Engelhardt J.F., Regev A., Rajagopal J. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* **560**, 319–324 (2018).

Morales M.M., Capella M.A.M. & Lopes A.G. Structure and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Brazilian journal of medical and biological research* **32**, 1021–1028 (1999).

Muanprasat C., Sonawane N.D., Salinas D., Taddei A., Galiotta L.J., Verkman A.S. Discovery of glycine hydrazide pore-occluding CFTR inhibitors: mechanism, structure-activity analysis and in vivo efficacy. *J Gen Physiol* **124**, 125-37 (2004).

Muchekehu R.W. & Quinton P.M. A new role for bicarbonate secretion in cervico-uterine mucus release. *J. Physiol. (Lond.)* **588**, 2329–2342 (2010).

Muhlebach M.S. & Noah T.L. Endotoxin activity and inflammatory markers in the airways of young patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 911–915 (2002).

Mungrue I.N., Pagnon J., Kohannim O., Gargalovic P.S., Lusic A.J. CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade. *J Immunol* **182**, 466-76 (2009).

-N-

Nath S. & Mukherjee P. Muc1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med* **20**, 332–342 (2014).

Natividad J.M.M. & Verdu E.F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacological Research* **69**, 42–51 (2013).

Noach I., Ficko-Blean E., Pluvinage B., Stuart C., Jenkins M.L., Brochu D., Buenbrazo N., Wakarchuk W., Burke J.E., Gilbert M., Boraston A.B. Recognition of protein-linked glycans as a determinant of peptidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E679–E688 (2017).

-O-

Ohman D.E. & Chakrabarty A.M. Utilization of human respiratory secretions by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* of cystic fibrosis origin. *Infect. Immun.* **37**, 662–669 (1982).

Oliver M.G. & Specian R.D. Cytoskeleton of intestinal goblet cells: role of actin filaments in baseline secretion. *Am. J. Physiol.* **259**, G991-997 (1990).

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. Mild and Moderate Asthma Is Associated with Airway Goblet Cell Hyperplasia and Abnormalities in Mucin Gene Expression. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 517–523 (2001).

Ostedgaard L.S., Meyerholz D.K., Chen J.H., Pezzulo A.A., Karp P.H., Rokhlina T., Ernst S.E., Hanfland R.A., Reznikov L.R., Ludwig P.S., Rogan M.P., Davis G.J., Dohrn C.L., Wohlford-Lenane C., Taft P.J., Rector M.V., Hornick E., Nassar B.S., Samuel M., Zhang Y., Richter S.S., Uc A., Shilyansky J., Prather R.S., McCray P.B. Jr, Zabner J., Welsh M.J., Stoltz D.A. The $\Delta F508$ Mutation Causes CFTR Misprocessing and Cystic Fibrosis-Like Disease in Pigs. *Sci Transl Med* **3**, 74ra24 (2011).

Ostedgaard L.S., Moninger T.O., McMenimen J.D., Sawin N.M., Parker C.P., Powers L.S., Gansemer N.D., Bouzek D.C., Cook D.P., Meyerholz D.K., Abou Alaiwa M.H., Stoltz D.A., Welsh M.J. Gel-forming mucins form distinct morphologic structures in airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 6842–6847 (2017).

Owen C.D., Tailford L.E., Monaco S., Šuligoj T. Vaux L., Lallement R., Khedri Z., Yu H., Lecointe K., Walshaw J., Tribolo S., Horrex M., Bell A., Chen X., Taylor G.L., Varki A., Angulo J., Juge N. Unravelling the specificity and mechanism of sialic acid recognition by the gut symbiont *Ruminococcus gnavus*. *Nat Commun* **8**, 2196 (2017).

-P-

Pack R.J., Al-Ugaily L.H. & Morris G. The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study. *J Anat* **132**, 71–84 (1981).

Parkins M.D. & Floto R.A. Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **14**, 293–304 (2015).

Perez-Vilar J. C-Mannosylation of MUC5AC and MUC5B Cys subdomains. *Glycobiology* **14**, 325–337 (2004).

Pernet E., Guillemot L., Burgel P.R., Martin C., Lambeau G., Sermet-Gaudelus I., Sands D., Leduc D., Morand P.C., Jeammet L., Chignard M., Wu Y., Touqui L. *Pseudomonas aeruginosa* eradicates *Staphylococcus aureus* by manipulating the host immunity. *Nat Commun* **5**, 5105 (2014).

Pezzulo A.A., Tang X.X., Hoegger M.J., Abou Alaiwa M.H., Ramachandran S., Moninger T.O., Karp P.H., Wohlford-Lenane C.L., Haagsman H.P., van Eijk M., Bánfi B., Horswill A.R., Stoltz D.A., McCray P.B. Jr, Welsh M.J., Zabner J. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* **487**, 109–113 (2012).

Pigny P., Guyonnet-Duperat V., Hill A.S., Pratt W.S., Galiegue-Zouitina S., d'Hooge M.C., Laine A., Van-Seuningen I., Degand P., Gum J.R., Kim Y.S., Swallow D.M., Aubert J.P., Porchet N. Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics* **38**, 340–352 (1996).

Pihet M., Carrere J., Cimon B., Chabasse D., Delhaes L., Symoens F., Bouchara J.P. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. *Med. Mycol.* **47**, 387–397 (2009).

Plasschaert L.W., Žilionis R., Choo-Wing R., Savova V., Knehr J., Roma G., Klein A.M., Jaffe A.B. A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* **560**, 377–381 (2018).

Plog S., Mundhenk L., Bothe M.K., Klymiuk N. & Gruber A.D. Tissue and Cellular Expression Patterns of Porcine CFTR: Similarities to and Differences From Human CFTR. *J Histochem Cytochem* **58**, 785–797 (2010).

Pompilio, A., Crocetta V., Confalone P., Nicoletti M., Petrucca A., Guarnieri S., Fiscarelli E., Savini V., Piccolomini R., Di Bonaventura G. Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol.* **10**, 102 (2010).

Pullan R.D. Thomas G.A., Rhodes M., Newcombe R.G., Williams G.T., Allen A., Rhodes J. Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* **35**, 353–359 (1994).

-Q-

Quinton P.M. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev.* **79**, S3-S22 (1999).

-R-

Raclawska D.S., Ttofali F., Fletcher A.A., Harper D.N., Bochner B.S., Janssen W.J., Evans C.M. Mucins and Their Sugars. Critical Mediators of Hyperreactivity and Inflammation. *Ann Am Thorac Soc* **13 Suppl 1**, S98-99 (2016).

Ramphal, R. & Pyle, M. Adherence of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* to acid-injured tracheal epithelium. *Infect Immun* **41**, 345–351 (1983).

Rao S. & Grigg J. New insights into pulmonary inflammation in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* **91**, 786–788 (2006).

Ratjen, F. Comes G., Paul K., Posselt H.G., Wagner T.O., Harms K.; German Board of the European Registry for Cystic Fibrosis (ERCF). Effect of continuous antistaphylococcal therapy on the rate of *P. aeruginosa* acquisition in patients with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **31**, 13–16 (2001).

Ratjen F., Paul K., van Koningsbruggen S., Breitenstein S., Rietschel E., Nikolaizik W. DNA concentrations in BAL fluid of cystic fibrosis patients with early lung disease: influence of treatment with dornase alpha. *Pediatr. Pulmonol.* **39**, 1–4 (2005).

Recktenwald C.V. & Hansson G.C. The Reduction-insensitive Bonds of the MUC2 Mucin Are Isopeptide Bonds. *J. Biol. Chem.* **291**, 13580–13590 (2016).

Reid C.J., Gould S., Harris A. Developmental expression of mucin genes in the Human respiratory tract. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **17**, 592–598 (1997).

Ridley C., Kirkham S., Williamson S.J., Davis C.W., Woodman P., Thornton D.J.. Biosynthesis of the polymeric gel-forming mucin MUC5B. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **310**, L993–L1002 (2016).

Ridley C. & Thornton D.J. Mucins: the frontline defence of the lung. *Biochemical Society Transactions* BST20170402 (2018).

Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J.L., Drumm M.L., Iannuzzi M.C., Collins F.S., Tsui L. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Erratum in: *Science* **29**, 245(4925):1437 (1989).

Robbe C., Capon C., Coddeville B. & Michalski J.C. Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochem. J.* **384**, 307–316 (2004).

Robinson N.P., Venning L., Kyle H. & Widdicombe J.G. Quantitation of the secretory cells of the ferret tracheobronchial tree. *J. Anat.* **145**, 173–188 (1986).

Rogers C.S., Stoltz D.A., Meyerholz D.K., Ostedgaard L.S., Rokhlina T., Taft P.J., Rogan M.P., Pezzulo A.A., Karp P.H., Itani O.A., Kabel A.C., Wohlford-Lenane C.L., Davis G.J., Hanfland R.A., Smith T.L., Samuel M., Wax D., Murphy C.N., Rieke A., Whitworth K., Uc A., Starner T.D., Brogden K.A., Shilyansky J., McCray P.B. Jr, Zabner J., Prather R.S., Welsh M.J. Disruption of the CFTR Gene Produces a Model of Cystic Fibrosis in Newborn Pigs. *Science* **321**, 1837–1841 (2008).

Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D., Hidaka N., Zsiga M., Buchwald M., Riordan J.R., Tsui L., Collins F.S. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**(4922):1059–65 (1989).

Rose M.C. Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **263**, L413–L429 (1992).

Rose M.C. & Voynow J.A. Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease. *Physiological Reviews* **86**, 245–278 (2006).

Rosen B.H., Chanson M., Gawenis L.R., Liu J., Sofoluwe A., Zoso A., Engelhardt J.F. Animal and model systems for studying cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* **17**, S28–S34 (2018).

Roussel P., Lamblin G. & Degand P. Heterogeneity of the carbohydrate chains of sulfated bronchial glycoproteins isolated from a patient suffering from cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.* **250**, 2114–2122 (1975).

-S-

Scharfman A., Degroote S., Beau J., Lamblin G., Roussel P., Mazurier J. Pseudomonas aeruginosa binds to neoglycoconjugates bearing mucin carbohydrate determinants and predominantly to sialyl-Lewis x conjugates. *Glycobiology* **9**, 757–764 (1999).

Scharfman A., Arora S.K., Delmotte P., Van Brussel E., Mazurier J., Ramphal R., Roussel P. Recognition of Lewis x Derivatives Present on Mucins by Flagellar Components of Pseudomonas aeruginosa. *Infect Immun* **69**, 5243–5248 (2001).

Schirm M., Arora S.K., Verma A., Vinogradov E., Thibault P., Ramphal R., Logan S.M. Structural and genetic characterization of glycosylation of type a flagellin in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **186**, 2523–2531 (2004).

Schulz B.L., Sloane A.J., Robinson L.J., Sebastian L.T., Glanville A.R., Song Y., Verkman A.S., Harry J.L., Packer N.H., Karlsson N.G. Mucin glycosylation changes in cystic fibrosis lung disease are not manifest in submucosal gland secretions. *Biochem J* **387**, 911-9 (2005).

Schulz B.L., Sloane A.J., Robinson L.J., Prasad S.S., Lindner R.A., Robinson M., Bye P.T., Nielson D.W., Harry J.L., Packer N.H., Karlsson N.G. Glycosylation of sputum mucins is altered in cystic fibrosis patients. *Glycobiology* **17**, 698–712 (2007).

Schwiebert E.M., Benos D.J., Egan M.E., Stutts M.J., Guggino W.B. CFTR Is a Conductance Regulator as well as a Chloride Channel. *Physiological Reviews* **79**, S145–S166 (1999).

Segonds C., Chabanon G. Burkholderia cepacia: dangers of a phytopathogen organism for patients with cystic fibrosis. *Annales de Biologie Clinique*. Volume 59, issue 3 (2001).

Sehgal A., Presente A., Engelhardt J.F. Developmental expression patterns of CFTR in ferret tracheal surface airway and submucosal gland epithelia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **15**, 122–131 (1996).

Sermet-Gaudelus I., Bianchi M.L., Garabédian M., Aris R.M., Morton A., Hardin D.S., Elkin S.L., Compston J.E., Conway S.P., Castanet M., Wolfe S., Haworth C.S. European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines. *J. Cyst. Fibros.* **10 Suppl 2**, S16-23 (2011).

Sheppard D.N., Welsh M.J. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* **79**, S23-45 (1999).

Silberberg, A. On mucociliary transport. *Biorheology* **27**, 295–307 (1990).

Snouwaert J.N., Brigman K.K., Latour A.M., Malouf N.N., Boucher R.C., Smithies O., Koller B.H. An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* **257**, 1083-8 (1992).

Song W.S. & Yoon S.I. Crystal structure of FliC flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* and its implication in TLR5 binding and formation of the flagellar filament. *Biochem Biophys Res Commun* **444**, 109-15 (2014).

Stanley P., Schachter H., Taniguchi N., N-Glycans. *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press (2009).

Sternberg L.R., Byrd J.C., Yunker C.K., Dudas S., Hoon V.K., Bresalier R.S. Liver colonization by human colon cancer cells is reduced by antisense inhibition of MUC2 mucin synthesis. *Gastroenterology* **116**, 363–371 (1999).

Stoltz D.A., Meyerholz D.K., Pezzulo A.A., Ramachandran S., Rogan M.P., Davis G.J., Hanfland R.A., Wohlford-Lenane C., Dohrn C.L., Bartlett J.A., Nelson G.A. 4th, Chang E.H., Taft P.J., Ludwig P.S., Estin M., Hornick E.E., Launspach J.L., Samuel M., Rokhlina T., Karp P.H., Ostedgaard L.S., Uc A., Starner T.D., Horswill A.R., Brogden K.A., Prather R.S., Richter S.S., Shilyansky J., McCray P.B. Jr, Zabner J., Welsh M.J. Cystic Fibrosis Pigs Develop Lung Disease and Exhibit Defective Bacterial Eradication at Birth. *Science Translational Medicine* **2**, 29ra31-29ra31 (2010).

Stoltz D.A., Meyerholz D.K., Welsh M.J. Origins of cystic fibrosis lung disease. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1574–1575 (2015).

Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J., Brinkman F.S., Hufnagle W.O., Kowalik D.J., Lagrou M., Garber R.L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L.L., Coulter S.N., Folger K.R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K., Wu Z., Paulsen I.T., Reizer J., Saier M.H., Hancock R.E., Lory S., Olson M.V. Complete genome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 6 (2000).

Strous G.J. & Dekker J. Mucin-type glycoproteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**, 57–92 (1992).

Stutts, M., Canessa C.M., Olsen J.C., Hamrick M., Cohn J.A., Rossier B.C., Boucher R.C. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* **269**, 847–850 (1995).

Sun, X., Sui H., Fisher J.T., Yan Z., Liu X., Cho H.J., Joo N.S., Zhang Y., Zhou W., Yi Y., Kinyon J.M., Lei-Butters D.C., Griffin M.A., Naumann P., Luo M., Ascher J., Wang K., Frana T., Wine J.J., Meyerholz D.K., Engelhardt J.F. Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis. *J Clin Invest* **120**, 3149–3160 (2010).

-T-

Tachibana K., Nakamura S., Wang H., Iwasaki H., Tachibana K., Maebara K., Cheng L., Hirabayashi J., Narimatsu H. Elucidation of binding specificity of Jacalin toward O-glycosylated peptides: quantitative analysis by frontal affinity chromatography. *Glycobiology* **16**, 46–53 (2006).

Tang A.C., Turvey S.E., Alves M.P., Regamey N., Tümmler B., Hartl D. Current concepts: host-pathogen interactions in cystic fibrosis airways disease. *European Respiratory Review* **23**, 320–332 (2014).

Tang, X.X., Ostedgaard L.S., Hoegger M.J., Moninger T.O., Karp P.H., McMenimen J.D., Choudhury B., Varki A., Stoltz D.A., Welsh M.J. Acidic pH increases airway surface liquid viscosity in cystic fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* **126**, 879–891 (2016).

Tarran R., Grubb B.R., Parsons D., Picher M., Hirsh A.J., Davis C.W., Boucher R.C. The CF salt controversy: in vivo observations and therapeutic approaches. *Mol. Cell* **8**, 149–158 (2001).

Tarran R. & Boucher R.C. Thin-film measurements of airway surface liquid volume/composition and mucus transport rates in vitro. *Methods Mol. Med.* **70**, 479–492 (2002).

Touati K., Nguyen L.D.N., Delhaes L. The airway colonization by opportunistic filamentous fungi in patients with cystic fibrosis: recent updates. *Curr Fungal Infect Rep.* **8**, 302–311 (2014).

Toribara N.W., Gum J.R. Jr, Culhane P.J., Lagace R.E., Hicks J.W., Petersen G.M., Kim Y.S. MUC-2 human small intestinal mucin gene structure. Repeated arrays and polymorphism. *J. Clin. Invest.* **88**, 1005–1013 (1991).

Treize A.E. & Buchwald M. In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* **353**, 434–437 (1991).

Tsui L.C., Buchwald M., Barker D., Braman J.C., Knowlton R., Schumm J.W., Eiberg H., Mohr J., Kennedy D., Plavsic N., Zsiga M., Markiewicz D., Akots G., Brown V., Helms C., Gravius T., Parker C., Rediker K., Donis-Keller H. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science.* **29**, 230(4729):1054-7 (1985).

Tsui L.C. & Durie P. Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. *Hospital Practice* **32**, 115–142 (1997).

Tsui L.C. & Dorfman R. The Cystic Fibrosis Gene: A Molecular Genetic Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3** (2013).

Tuggle K.L., Birket S.E., Cui X., Hong J., Warren J., Reid L., Chambers A., Ji D., Gamber K., Chu K.K., Tearney G., Tang L.P., Fortenberry J.A., Du M., Cadillac J.M., Bedwell D.M., Rowe S.M., Sorscher E.J., Fanucchi M.V. Characterization of Defects in Ion Transport and Tissue Development in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-Knockout Rats. *PLoS One* **9**, (2014).

-U-

Ueki I., German V.F., Nadel J.A. Micropipette measurement of airway submucosal gland secretion. Autonomic effects. *Am Rev Respir Dis.* **121**, 351-7 (1980).

-V-

Van Klinken B.J., Dekker J., van Gool S.A., van Marle J., Büller H.A., Einerhand A.W. MUC5B is the prominent mucin in human gallbladder and is also expressed in a subset of colonic goblet cells. *Am. J. Physiol.* **274**, G871-878 (1998).

Varki A., Freeze H.H., Gagneux P. Evolution of Glycan diversity. *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press (2009).

Vasseur P., Vallet-Gely I., Soscia C., Genin S., Filloux A. The pel genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology (Reading, Engl.)* **151**, 985–997 (2005).

Verma, A., Schirm M., Arora S.K., Thibault P., Logan S.M., Ramphal R. Glycosylation of b-Type Flagellin of *Pseudomonas aeruginosa*: Structural and Genetic Basis. *Journal of Bacteriology* **188**, 4395–4403 (2006).

Von Moltke J., Ji M., Liang H.E., Locksley R.M. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. *Nature* **529**, 221–225 (2016).

-W-

Walther T., Karamanska R., Chan R.W.Y., Chan M.C.W., Jia N., Air G., Hopton C., Wong M.P., Dell A., Malik Peiris J.S., Haslam S.M., Nicholls J.M. Glycomic analysis of Human respiratory tract tissues and correlation with influenza virus infection. *PLoS Pathog* **9** (2013).

Waters V., Atenafu E.G., Lu A., Yau Y., Tullis E., Ratjen F. Chronic *Stenotrophomonas maltophilia* infection and mortality or lung transplantation in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* **12**, 482-6 (2013).

Welsh MJ & Smith AE. Cystic fibrosis. *Sci Am.* **273**, 52-9 (1995).

Welsh D.A. & Mason C.M. HOST DEFENSE IN RESPIRATORY INFECTIONS. *Medical Clinics of North America* **85**, 1329–1347 (2001).

Welsh K.G., Rousseau K., Fisher G., Bonser L.R., Bradding P., Brightling C.E., Thornton D.J., Gaillard E.A.. MUC5AC and a Glycosylated Variant of MUC5B Alter Mucin Composition in Children With Acute Asthma. *Chest* **152**, 771–779 (2017).

Wickström C. & Carlstedt I. N-terminal cleavage of the salivary MUC5B mucin. Analogy with the Van Willebrand propeptide? *J. Biol. Chem.* **276**, 47116–47121 (2001).

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. Mouse models of cystic fibrosis: Phenotypic analysis and research applications. *Journal of Cystic Fibrosis* **10**, S152–S171 (2011).

Williams S.J., Wreschner D.H., Tran M., Eyre H.J., Sutherland G.R., McGuckin M.A. Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 18327–18336 (2001).

Wilson I.B., Gavel Y., von Heijne G. Amino acid distributions around O-linked glycosylation sites. *Biochem. J.* **275**, 529–534 (1991).

Woods D.E., Sokol P.A., Bryan L.E., Storey D.G., Mattingly S.J., Vogel H.J., Ceri H. In vivo regulation of virulence in *Pseudomonas aeruginosa* associated with genetic rearrangement. *J. Infect. Dis.* **163**, 143–149 (1991).

Wreschner D.H., McGuckin M.A., Williams S.J., Baruch A., Yoeli M., Ziv R., Okun L., Zaretsky J., Smorodinsky N., Keydar I., Neophytou P., Stacey M., Lin H.H., Gordon S. Generation of ligand-receptor alliances by 'SEA' module-mediated cleavage of membrane-associated mucin proteins. *Protein Sci.* **11**, 698–706 (2002).

-X-

Xia B., Sachdev G.P., Cummings R.D. Pseudomonas aeruginosa mucoid strain 8830 binds glycans containing the sialyl-Lewis x epitope. *Glycoconjugate Journal* **24**, 87–95 (2007).

-Z-

Zulianello L., Canard C., Köhler T., Caille D., Lacroix J.S., Meda P. Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary Human Airway Epithelia by Pseudomonas aeruginosa. *Infect Immun* **74**, 3134–3147 (2006).

CHAPITRE



Annexes

CONGRÈS ET CONFÉRENCES

- International conference on cystic fibrosis à Tours le 26 et 27 novembre 2015
- 17^{ème} Colloque français jeunes chercheurs VLM à Paris le 9 février 2016
- Journée André Verbert à Lille le 5 septembre 2016
- La microscopie en transmission au service de la recherche et des applications en sciences de la vie et des matériaux le 23 novembre 2016
- Le métier d'enseignant-chercheur à Villeneuve d'Ascq le 14 décembre 2016
- 18^{ème} Colloque français jeunes chercheurs VLM à Paris le 14 février 2017
- 12th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium à Dubrovnik du 6 au 9 mai 2017
- Journée André Verbert à Villeneuve d'Ascq le 14 septembre 2017
- 2nd GlyCoCom 2018 and 1st Human Glycome Project Meeting à Dubrovnik du 3 au 6 octobre 2018

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

- Ringot Destrez B, Caballero I, Si-Tahar M, Barbry P, Guillon A, Klymiuk N, Léonard R, Robbe Masselot C. Le porc CF: un modèle unique pour décrypter les altérations de glycosylation des mucines pulmonaires. **Congrès jeunes chercheurs Vaincre La Mucoviscidose, Février 2016, Paris, France**
- Ringot Destrez B, Caballero I, Si-Tahar M, Barbry P, Guillon A, Berry M, Pons N, Klymiuk N, Léonard R, Robbe Masselot C. Altérations biochimiques des mucines pulmonaires des porcelets nouveau-nés CFTR^{-/-} : un lien avec la déficience muco-ciliaire? **Congrès jeunes chercheurs Vaincre La Mucoviscidose, Février 2017, Paris, France**
- Ringot Destrez B, Caballero I, Si-Tahar M, Barbry P, Guillon A, Berri M, Pons N, Klymiuk N, Léonard R, Robbe Masselot C. Deciphering the onset of Cystic Fibrosis lung disease. **12th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium-Translational Glycobiology from bench to bedside, Mai 2017, Dubrovnik, Croatie. Prix du meilleur poster**
- Ringot Destrez B, Caballero I, Si-Tahar M, Barbry P, Guillon A, Berri M, Pons N, Klymiuk N, Léonard R, Robbe Masselot C. Deciphering the onset of Cystic Fibrosis lung disease. **Journée André Verbert, septembre 2017, Lille.**

ARTICLE PUBLIÉ

- **Ringot-Destrez B**, D'Alessandro Z, Lacroix JM, Mercier-Bonin M, Léonard R, Robbe-Masselot C. A Sensitive and Rapid Method to Determine the Adhesion Capacity of Probiotics and Pathogenic Microorganisms to Human Gastrointestinal Mucins. *Microorganisms* 2018, 6. pii: E49.

ARTICLE EN SOUMISSION

- Caballero[#] I., **Ringot-Destrez[#] B.**, Si-Tahar M., Barbry P., Guillon A., Lantier I., Berri M., Chevalerey C., Fleurot I., Barc C., Ramphal R., Pons N., Paquet A., Lebrigand K., Baron C., Bähr A., Klymiuk N., Léonard R., Robbe-Masselot C. Sialylation of airway mucins in newborn cystic fibrosis pigs: a new paradigm.

ARTICLES REALISÉS DANS LE CADRE DE COLLABORATIONS

- Mihalache A, Delplanque JF, **Ringot-Destrez B.**, Wavelet C, Gosset P, Nunes B, Groux-Degroote S, Léonard R, Robbe-Masselot C. Structural Characterization of Mucin O-Glycosylation May Provide Important Information to Help Prevent Colorectal Tumor Recurrence. *Front Oncol.* 2015; 5:217.
- Da Silva S, Robbe-Masselot C, Raymond A, Mercade-Loubière M, Salvador-Cartier C, **Ringot B.**, Léonard R, Fourquaux I, Ait-Belgnaoui A, Loubière P, Théodorou V, Mercier-Bonin M. Spatial Localization and Binding of the Probiotic *Lactobacillus farciminis* to the Rat Intestinal Mucosa: Influence of Chronic Stress. *PLoS One.* 2015; 10:e0136048.
- Fernandez N., Wrzosek L., Radziwill-Bienkowska J.M., **Ringot-Destrez B.**, Duviau M.P., Noordine M.L., Laroute V., Robert V., Cherbuy C., Daveran-Mingot M.L., Coccagn-Bousquet M., Léonard R., Robbe-Masselot C., Rul F., Ogier-Denis E., Thomas M., Mercier-Bonin M. Characterization of Mucus-Related Properties of *Streptococcus thermophilus*: From Adhesion to Induction. *Front Physiol* **9** (2018)

REVUE

- **Ringot-Destrez B.**, Kalach N, Mihalache A, Gosset P, Michalski JC, Léonard R, Robbe-Masselot C. How do they stick together? Bacterial adhesins implicated in the binding of bacteria to the human gastrointestinal mucins. *Biochem Soc Trans.* 2017; 45:389-399. Review.



Article

A Sensitive and Rapid Method to Determine the Adhesion Capacity of Probiotics and Pathogenic Microorganisms to Human Gastrointestinal Mucins

Béline Ringot-Destrez ¹, Zéa D'Alessandro ¹, Jean-Marie Lacroix ¹, Muriel Mercier-Bonin ² ,
Renaud Léonard ¹ and Catherine Robbe-Masselot ^{1,3,*}

¹ Univ.lille, CNRS, UMR8576-UGSF-Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F59000 Lille, France; belinda.ringot@gmail.com (B.R.-D.); zea.dalessandro@etudiant.univ-lille1.fr (Z.D.); Jean-marie.lacroix@univ-lille.fr (J.M.L.); renaud.leonard@univ-lille1.fr (R.L.)

² Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, 31000 Toulouse, France; muriel.mercier-bonin@inra.fr

³ Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Campus CNRS de la Haute Borne, 50 avenue de Halley, 59658 Villeneuve d'Ascq, France

* Correspondence: catherine.robbe@univ-lille1.fr; Tel.: +33-362-531-719; Fax: +33-320-436-555

Received: 30 March 2018; Accepted: 28 May 2018; Published: 29 May 2018



Abstract: Mucus is the habitat for the microorganisms, bacteria and yeast that form the commensal flora. Mucins, the main macromolecules of mucus, and more specifically, the glycans that cover them, play essential roles in microbial gastrointestinal colonization. Probiotics and pathogens must also colonize mucus to have lasting positive or deleterious effects. The question of which mucin-harboured glycan motifs favour the adhesion of specific microorganisms remains very poorly studied. In the current study, a simple test based on the detection of fluorescent-labeled microorganisms raised against microgram amounts of mucins spotted on nitrocellulose was developed. The adhesion of various probiotic, commensal and pathogenic microorganisms was evaluated on a panel of human purified gastrointestinal mucins and compared with that of commercially available pig gastric mucins (PGM) and of mucins secreted by the colonic cancer cell line HT29-MTX. The latter two proved to be very poor indicators of adhesion capacity on intestinal mucins. Our results show that the nature of the sialylated cores of O-glycans, determined by MALDI MS-MS analysis, potentially enables sialic acid residues to modulate the adhesion of microorganisms either positively or negatively. Other identified factors affecting the adhesion propensity were O-glycan core types and the presence of blood group motifs. This test should help to select probiotics with enhanced adhesion capabilities as well as deciphering the role of specific mucin glycotopes on microbial adhesion.

Keywords: bacterial adhesion; mucin; O-glycosylation; sialic acids; probiotics; bacterial pathogens

1. Introduction

According to the FAO/WHO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations/World Health Organisation), probiotics are live microorganisms which, when taken in adequate amounts, can provide health benefits to the host [1]. Most current probiotics used belong to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, with a few other species, such as *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, and *Streptococcus* sp. Probiotics are known to exert numerous beneficial effects, helping to prevent or treat a variety of health problems or diseases, such as diarrhea caused by infections or antibiotics, irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease and allergic disorders. They play a role in reducing the incidence of common upper respiratory tract infections and help to manage vaginal infections. They are presumed to modulate the commensal intestinal flora. The mechanisms of action displayed by these

phylogenetically diverse microorganisms range from immunomodulation [2,3] and epithelial barrier maintenance [4] to direct antagonism with pathogens via bacteriocin production [5,6] and competitive exclusion [7,8]. Short chain fatty acids, such as formic, acetic, propionic, butyric and lactic acids, are produced by probiotics during carbohydrate catabolism and play an important role in the decrease of pH that inhibits the growth of enteric pathogens [9,10].

As for the intestinal commensal microbiota residing in close association to the host epithelial mucus, adhesion to intestinal mucosa is expected to be a crucial property for ingested probiotics. The increased host–bacterial interactions favoured by bacterial adhesion are thought to enable health benefits to the host. Probiotics can also prevent the attachment of pathogens to the intestinal mucus [11].

The mammalian gastrointestinal tract is covered by mucus, a viscoelastic gel that lines and protects the intestinal epithelium, separating it from the lumen content. The large intestine is covered with a bilayer of mucus, with the outer layer providing a habitat for bacteria, whereas the inner layer maintains them at a safe distance from the epithelial surface and is devoid of microorganisms under healthy conditions [12]. The mucus thickness varies along the intestine, being thicker in the colon than in the small intestine [13]. This mucus traps and transports bacteria and is a rich source of nutrients used for bacterial metabolism and growth [14]. The main constituents of mucus are mucins, which are produced, stored and released by goblet cells. Mucins are large glycoproteins in which the glycans constitute more than 80% of the molecular mass. To date, 20 human MUC genes have been assigned to the MUC gene family, some of them belonging to the secreted gel-forming mucin family, whereas the others are classified in the membrane-bound family [15].

The expression of mucins is organ- and tissue-dependent. In the adult human stomach, two mucins, MUC5AC and MUC6, are secreted by different categories of cell types. MUC5AC is highly expressed in mucous neck cells at the surface of the gastric epithelium [16,17], whereas MUC6 is expressed in mucous neck cells and the principal cells of the body and in pyloric glands of the antrum [16,18,19]. In the small intestine and the colon, the mucus layer mainly consists of MUC2 [12], even though low levels of MUC5B can also be found [20].

In humans, MUC2 is coated with more than 100 different *O*-linked glycan chains [21–23]. Mucin oligosaccharides can serve both as binding sites and energy sources for intestinal microbiota and the differences in mucin glycosylation determined along the intestine [22] and between individuals can influence the tropism of some bacteria for specific regions of the gastrointestinal tract [24] as well as the host specificity in terms of microbiota [25].

O-glycosylation of mucins is initiated by the addition of *N*-acetyl-galactosamine (GalNAc) to Ser and Thr residues and further proceeds with sequential addition of monosaccharides: galactose (Gal), *N*-acetyl-glucosamine (GlcNAc), Fucose (Fuc), GalNAc and sialic acid residues [26]. Sulphate residues are also found in the periphery of *O*-glycans. Three regions may be distinguished within mucin *O*-glycans, in direct correlation with their biosynthesis: the core, backbone and peripheral regions [27]. The core region corresponds to the first GalNAc mono- or di-substituted with α - or β -Gal, β -GlcNAc and α -GalNAc. This complex pattern of core types can be further complicated by the addition of *N*-acetyl-neuraminic acid (NeuAc) which is potentially linked to the first GalNAc residue. In animals, *N*-acetyl-glycolyl acid residues can be found in place of NeuAc. The backbone regions consist of alternating Gal and GlcNAc in β 1–3 (for the type 1 chains) and β 1–4 (for the type 2 chains) linkages [28]. Fuc, Gal, GalNAc and NeuAc residues are the four monosaccharides found at the periphery or at internal positions of the poly-lactosamine backbones. Sulphate residues are also found to substitute Gal, GalNAc or GlcNAc residues. The peripheral region characterizes the mucin by conferring a specific charge to the molecule as well as having antigenic properties.

Glycosylation of mucins varies along the gastrointestinal tract of healthy human individuals. In the human stomach, more than 70 different oligosaccharides are carried by mucins. These are mostly neutral and highly fucosylated based on a core of 2-Gal β 1–3[GlcNAc β 1–6]GalNAc [29].

In contrast to gastric mucins, human intestinal mucin *O*-glycans are mainly based on sialylated core 3 structures (GlcNAc β 1–3GalNAc) [22]. Extensive differences in the glycosylation patterns

of mucins along the intestinal tract have been described [30,31], characterized by the presence of decreasing gradients of fucose and ABH blood group expression from the ileum to the rectum as well as an increasing acidic gradient [21]. The high degree of diversity in the expression of glycans in the different parts of the intestine creates an enormous repertoire of potential binding sites for microorganisms that could explain the regio-specific colonization of bacteria in the human gut.

In this context, we developed a rapid and sensitive test for the characterization of the binding capacities of probiotic microorganisms to human purified mucins spotted on a nitrocellulose membrane, allowing us to compare the adhesion of probiotics to mucins with that of commensal bacteria known to colonize mucus and pathogenic bacteria known to interact with the epithelial mucosa and/or mucins. Five different probiotic bacteria and one yeast were used in this study. The *E. coli* strain, Nissle 1917, has proven to be efficient in the treatment for maintaining remission in ulcerative colitis [32] and helps to stop acute diarrhea in infants and toddlers [33]. Lactobacilli have long been considered to be good for health and due to their beneficial and protechnological properties, numerous *Lactobacillus* species are used as probiotics with recognized effects in the treatment of gastrointestinal disease [34]. Members of the *Lactobacillus plantarum* species have been found to reduce the concentration of cholesterol and fibrinogen and reduce the risk of cardiovascular disease and atherosclerosis [35]. *Lactobacillus rhamnosus* displays a wide array of probiotic properties, including the reduction of diarrhea, atopic eczema and respiratory infections [36]. *Lactobacillus paracasei* improve nutrition and aid gastrointestinal and respiratory disease prevention and therapy [37]. The *Lactobacillus casei* strain, Shirota, may favourably affect metabolic abnormalities in obese subjects [38]. The yeast, *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856, is recommended to improve the symptoms of irritable bowel disease [39].

The *E. coli* strain, K12, was used as a positive control for adhesion to mucins, as it is a commensal bacterium that colonizes the intestinal mucosa. Three intestinal pathogens were evaluated, all of them expressing outer membrane proteins able to bind to mucosa: *Yersinia enterocolitica*, which causes abdominal pain, diarrhea, vomiting and weight loss [40,41]; *Shigella sonnei*, which is responsible for bloody diarrhea [42] and *Salmonella enterica*, which is among the most important agents responsible for food outbreaks occurring worldwide [43].

The correlation between the adhesion levels of each microorganism tested and the O-glycan pattern of mucins points to important features that mediate the specific binding action of each studied species.

2. Methods

2.1. Bacteria and Yeast Culture

Lactobacillus rhamnosus, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus plantarum* were grown in Lactobacilli MRS broth (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). *E. coli* K12 and Nissle 1917, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* and *Yersinia enterocolitica* were grown in LB medium. All of the abovementioned strains were a kind gift from the "Institut de microbiologie du CHRU de Lille". *Saccharomyces cerevisiae* (sold by Lesaffre, Marcq-en-Barœul, France, under the name Ibsium) was grown in YEP medium (Yeast Extract Peptone: peptone 20 g/L, yeast extract 10 g/L) complemented by 2% glucose. All cultures were performed for 16 h at 37 °C under shaking. *L. casei* Shirota was directly obtained by centrifugation of commercially available Yakult at 3500 g for 10 min, followed by two washes with PBS. This product claims to contain exclusively *L. casei* Shirota.

2.2. Isolation and Purification of Mucins from Human Tissues and Cell Lines

Human mucins were purified from different regions of the gastrointestinal tract and from malignant ovarian cysts. Human adult stomachs, jejunums, ileums and colons were obtained from the France Transplant Association from kidney donors, in accordance with protocols approved by the National Ethical Committee. Samples of mucosa were snap-frozen in liquid nitrogen and stored in liquid nitrogen until use. Malignant ovarian cyst mucins were collected by Dr Bara in accordance with

protocols approved by the National Ethical Committee. The use of human tissues for this study was approved by the local hospital ethics committee and the French Ministry of Higher Education and Research (DC-2008-242).

Mucins from HT29-MTX were obtained by collecting the culture medium of cells after 21 days of growth. HT29-MTX were maintained in standard Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium supplemented with 10% (*v/v*) heat-in-activated foetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 unit/mL penicillin and 100 unit/mL streptomycin at 37 °C in 5% CO₂.

Mucins were solubilized in 4 M guanidine chloride solution containing 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 10 mM benzamidine, 5 mM *N*-ethylmaleimide, 0.1 mg/mL soy bean trypsin inhibitor and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride.

CsCl was added to an initial density of 1.4 g/mL and mucins were purified by isopycnic density-gradient centrifugation (Beckman Coulter LE80 K ultracentrifuge; 70.1 Ti rotor, 417,600 g at 15 °C for 72 h). Fractions of 1 mL were collected from the bottom of the tube and analyzed for periodic acid-Schiff (PAS) reactivity and density. The mucin-containing fractions were pooled, dialyzed against water and lyophilized. Pig gastric mucin type III (PGM) was supplied by Sigma-Aldrich.

2.3. Release of Oligosaccharides from Mucin by Alkaline Borohydride Treatment

Mucins were submitted to β -elimination under reductive conditions (0.1 M KOH, 1 M KBH₄ for 24 h at 45 °C) and the mixture of oligosaccharide alditols was dried on a rotavapor (Buchi, Flawil, Switzerland) at 45 °C. Borate salts were eliminated by several co-evaporations with methanol before purification by cation exchange chromatography (Dowex 50 \times 2, 200–400 mesh, H + form).

2.4. Permethylation and Mucin Glycosylation Analysis by MALDI TOF MS

Permethylation of the mixture of oligosaccharide alditols was carried out with the sodium hydroxide procedure described by Ciucanu and Kerek [44]. Briefly, oligosaccharides were incubated for 2 h at room temperature in 200 μ L of dimethylsulfoxide, a spatula tip of sodium hydroxide and 300 μ L of iodomethane. After derivatization, the reaction products were dissolved in 1 mL of acetic acid solution (5%, *v/v*) and further purified on a C18 Sep-Pak column (Oasis HLB, Waters, Milford, MA, USA). The cartridge was preconditioned with 3 mL of methanol. After washing the cartridge with 4 mL of 5% methanol, glycans were eluted in 4 mL of methanol. Permethylated oligosaccharides were analyzed by MALDI TOF MS in positive ion reflective mode as [M+Na]⁺. Quantification through the relative percentage of each oligosaccharide was calculated based on the integration of peaks on MS spectra.

2.5. 1-D Bacterial Overlay

The 1-D bacterial overlay procedure was adapted from Odenbreit et al. [45]. In brief, purified mucins (1 μ g/ μ L in PBS or 4 M guanidine chloride in PBS) were spotted on dry nitrocellulose membranes using a Bio-Dot SF (Biorad Hercules, CA, USA) which were saturated with PFBB (Protein Free Blocking Buffer) (Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA) for 1 h. Bovine serumalbumin at 1 μ g/ μ L was used as a negative control. Bacteria were labeled either with 2.5 μ g/mL DAPI or 50 μ M syto9 in PBS for 15 min or with FITC at 0.1 mg/mL (for Gram– bacteria) or 0.2 mg/mL (Gram+ bacteria) in carbonate buffer (NaCl 0.15 M, NaHCO₃ 0.1 M) for 1 h. Labeled bacteria were collected by centrifugation at 3000 \times g for 5 min, washed three times in PBS, suspended in 1 mL of blocking buffer and added to the membrane in blocking buffer. In the case of FITC, an additional step, involving 2 h of incubation in blocking solution before the final three washes, was included to reduce the background signal. After incubation for 1 h at room temperature in the dark, followed by three washes of membranes in PBS containing 0.5% Tween 20, the fluorescence of adherent bacteria was detected by a ChemiGenius 2 imaging system (Syngene, Frederick, MD, USA). Mucins were chemically desialylated for 1 h at 80 °C in a 0.05 M trifluoroacetic acid (TFA) solution.

2.6. Statistical Analysis

Data are reported as means \pm SDs of at least 3 replicates. Student's *t*-test was used for statistical analysis.

3. Results

3.1. Development of a New Assay to Evaluate the Adhesion of Microorganisms on Mucins

Teams working on microorganism adhesion to mucins mainly use 96-welled plates coated with mucins. These assays usually require high amounts of mucins and are not suitable for bacteria like *Pseudomonas aeruginosa* which have a tendency to adhere to plastic. To circumvent these limitations, a new assay was developed using nitrocellulose membrane as a support. Mucins were spotted on a nitrocellulose membrane that was further blocked with a saturating agent to avoid the unspecific binding of microorganisms. Several blocking reagents were tested in this study—5% milk powder in PBS, 0.5% BSA in PBS and PFBB (Pierce protein free blocking buffer) with which the best signal/noise ratio was obtained. Bacteria were labelled with fluorescent dyes before incubation on the membrane. DAPI was preferred to FITC and syto9, which, respectively need long labelling times and are associated with fast loss of the fluorescent, as already mentioned by Stiefel et al. [46]. DAPI was therefore chosen for further experiments. The results obtained with *L. paracasei* are shown in Figure 1. Clear differences in fluorescence can be observed depending on the mucin coated, with mucins from the colon indicating much higher adhesion than mucins from other sources. No signal was detected with the negative control, bovine serum albumin (BSA).

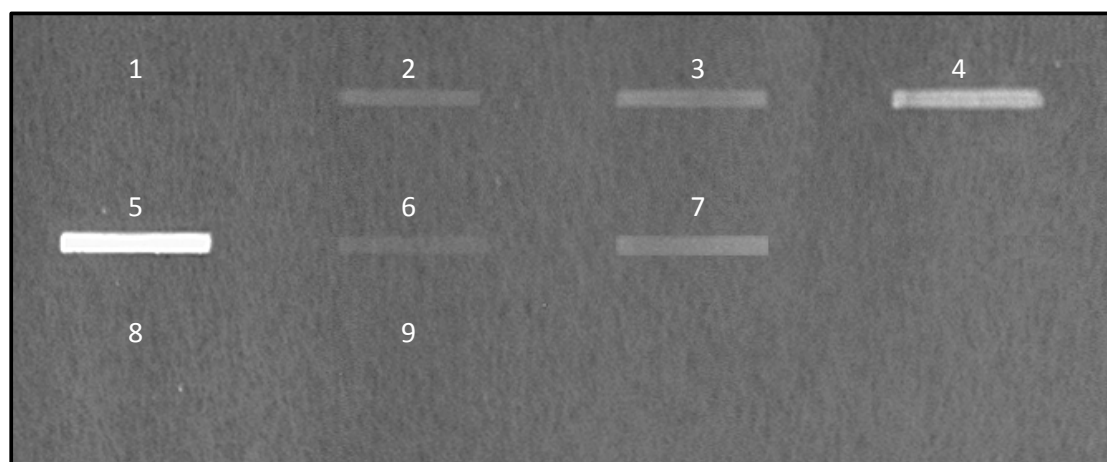


Figure 1. Adhesion of DAPI-labeled *L. paracasei* on mucins. Purified mucins were spotted on nitrocellulose membrane before incubation with DAPI-labeled bacteria. Fluorescence signaling was detected using the Chemigenius2 Bio-imaging system before quantification with GeneTools software. Spotted samples were BSA (1); pig gastric mucin (2); and human mucins purified from ileum (3); jejunum (4); colon (5); stomach (7) and ovarian cysts (8). After chemical removal of sialic acids, mucins from human colon and ovarian cysts were spotted respectively at positions (6) and (9).

To establish the optimal conditions required to obtain a strong signal without using excessive amounts of purified mucins, mucins from human jejunums, ileums and colons were spotted at quantities ranging from 1 μ g to 20 μ g and the signal obtained with DAPI labelled *E. coli* K12 was quantified. As shown in Figure 2, above 2 μ g of coated mucins, the signal proportionally increased with the amount of mucin spotted on the membrane until approximately 10 μ g of mucins. The level of fluorescence only slightly increased between 10 μ g and 20 μ g, suggesting that it is not necessary to increase the amount of mucin spotted on the membrane above this range, as the gain of signal will then be negligible. For the following experiments, mucins were systematically spotted at a quantity of 20 μ g.

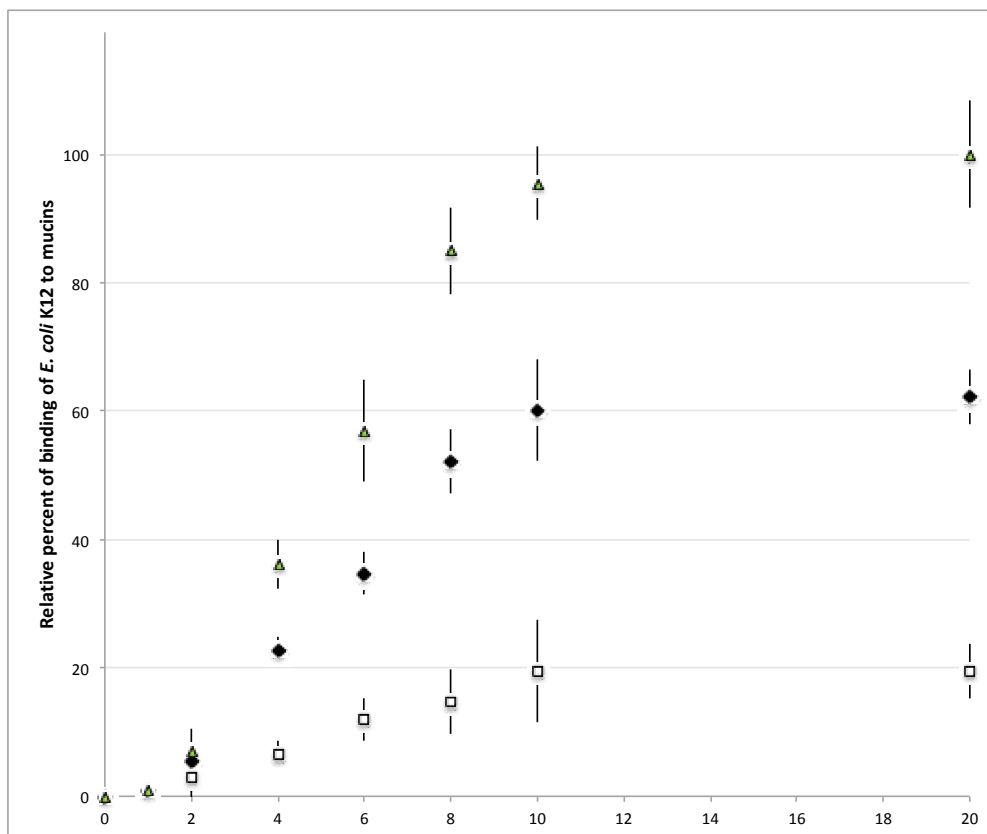


Figure 2. Relationship between the intensity of fluorescence and the number of mucins spotted. Mucins from the human colon (Δ), jejunum (\blacklozenge) and ileum (\square) were spotted at different quantities on nitrocellulose membrane and the signal of bound fluorescent-labeled *E. coli* K12 was quantified. Above 20 μg of mucins per spot of 9 mm^2 , the signal reaches a plateau.

3.2. Adhesion of Microorganisms on Commercially Available Pig Gastric Mucins (PGM) or Mucins from HT29-MTX Cell Lines Does Not Reflect Adhesion on Human Intestinal Mucins

Most assays developed to evaluate the capacity of adhesion of bacteria or yeasts on mucins use PGM as the standard material, taking for granted that the adhesion on this material will reflect the overall affinity of the microorganisms for mucins. As seen in Figure 1, the results obtained with PGM are poorly informative. Even though a signal is detectable with PGM for all tested bacteria while no signal is seen with BSA used as a negative control, the difference of binding between bacteria described as only transiently passing through the gastrointestinal tract (*L. casei Shirota*) and bacteria known to colonize mucus (the commensal *E. coli* K12) is very low.

Mucus and mucins from the mucus-secreting HT29-MTX intestinal epithelial cell lines are also widely used to investigate the adhesion of microorganisms. In this study, we first compared the binding of bacteria or yeasts on PGM, HT29-MTX and purified human intestinal mucins. As seen in Figure 3, the level of adhesion obtained with human intestinal mucins was considerably higher than with PGM or HT29-MTX. Given the reported differences in binding, which vary depending on the origin and site of the mucin utilized for binding assays, care should be taken in the interpretation of the data when using PGM or HT29-MTX as a unique source of mucin to assay bacteria binding to intestinal mucin. For example, no real difference in the level of adhesion with PGM or HT29-MTX is detected between *L. casei shirota* and *Y. enterocolitica* when the latest clearly binds to intestinal mucins contrary to the first.

As shown in Figure 3, the microorganisms used in this study displayed different patterns of binding to human intestinal mucins. The three pathogens, *S. enterica*, *S. sonnei* and *Y. enterocolitica*,

presented a high capacity for adhesion to colonic mucins. The two strains of *E. coli*, the commensal *E. coli* K12 and the probiotic *E. coli* Nissle 1917, also showed a high rate of binding to human intestinal mucins. Among the other probiotic bacteria tested, only *L. casei* Shirota exhibited no significant adhesion to intestinal mucins. *L. rhamnosus* showed moderate binding, whereas all other bacteria and yeast (*S. cerevisiae*) displayed strong binding capacities.

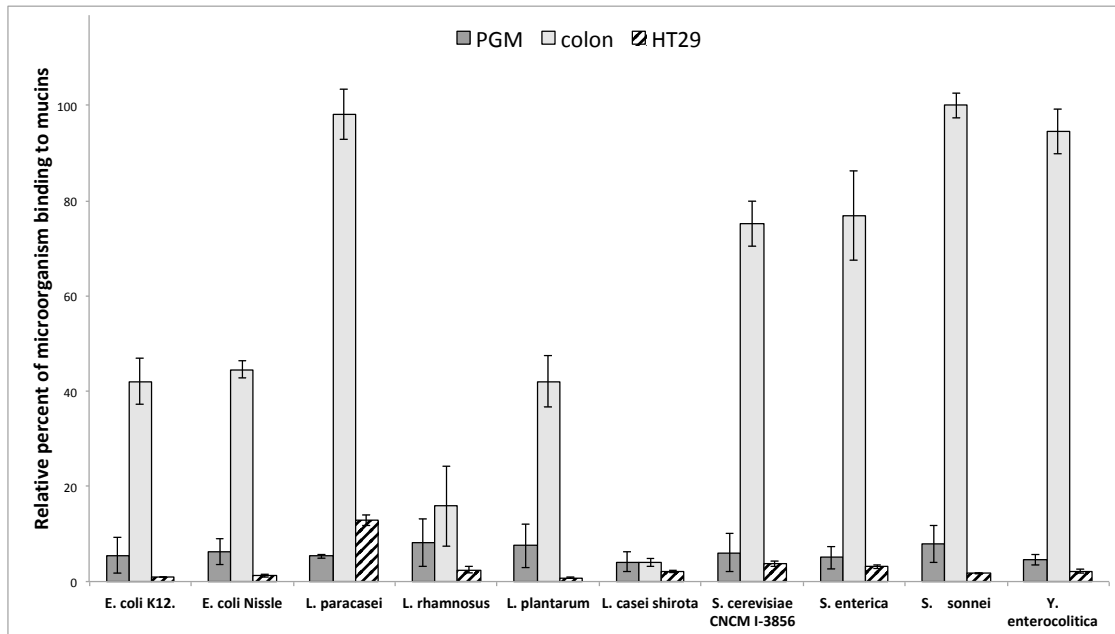


Figure 3. The adhesion of various probiotic and pathogenic microorganisms on commercially available pig gastric mucins or mucins from HT29-MTX cell lines does not reflect the adhesion on human intestinal mucins. The binding of DAPI-labeled microorganisms to pig gastric mucins (dark grey), human purified colonic mucins (light grey) and mucins from HT29-MTX (striped) was quantified by slot-blot overlay assays. No correlation was observed between the level of adhesion of microorganisms to colonic mucins and to HT29-MTX or PGM. Data shown is a representative experiment \pm SD of three replicates.

Bacterial adhesion to mucins mostly mediated by interaction between mucin *O*-glycans and bacterial adhesins. Because bacteria showed differences in their patterns of binding to mucins, we next compared the repertoire of glycosylation of PGM, HT29-MTX and human intestinal mucins. Oligosaccharides were released by reductive β -elimination from the protein backbone, permethylated and analysed by MALDI-TOF-TOF mass spectrometry in the positive ion mode (Figure 4). HT29-MTX mucin *O*-glycans are mainly composed of Thomsen-Friedenreich (TF) (Gal β 1-3GalNAc) at *m/z* 534 and sialyl TF antigens (NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc or Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc) at *m/z* 895, each representing around 35% of the whole *O*-glycans detected in these cells. Fifty-five percent of oligosaccharides were sialylated, with major sialylated glycans identified at *m/z* 691, 895, 1256, 1344 and 1705. The ions at *m/z* 691 corresponded to sialyl Tn antigens (NeuAc α 2-6GalNAc) and the ions at *m/z* 1256 were disialylated TF antigens (NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc). The two other major sialylated glycans corresponded to ions at *m/z* 1344 and 1705 on the MS spectrum (Figure 4A). They were both based on a core 2 glycan (Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc) elongated with a galactose residue on the GlcNAc in the upper branch and carrying one (for the ion at *m/z* 1344) or two sialic acid residues (for the ion at *m/z* 1705). Around 75% of all identified glycans were based on a core 1 structure (Gal β 1-3GalNAc) further elongated by GlcNAc residues or substituted with fucose residues.

Pig gastric mucin oligosaccharides have been well characterized in previous studies [47–49]. They contain a high proportion of core 1 and core 2 *O*-glycans, as illustrated on the MS spectrum by the ions at *m/z* 534 and 708 for the core 1 glycans and the ions at *m/z* 1024, 1331, 1473 and 1647

for the core 2 glycans. Many ions correspond to several structural isomers based either on core 1 or core 2, as shown for the ions at m/z 779, 953, 1157 and 1402. Most of the oligosaccharides from pig gastric mucins are elongated by type 2 lacNAc chains, capped or not, by Fuc α 2 linked to Gal to form blood group H antigen, as seen in the Figure 4B for the ions at m/z 708, 1157 and 1331. An additional GalNAc may be α 1-3 linked to the galactose residue to give a blood group A antigen. This was the case for the ions at m/z 1402 and 1647, for example. Apart from sialyl TF antigens, which are expressed at a very low level, no sialylated oligosaccharides were recovered in pig gastric mucins.

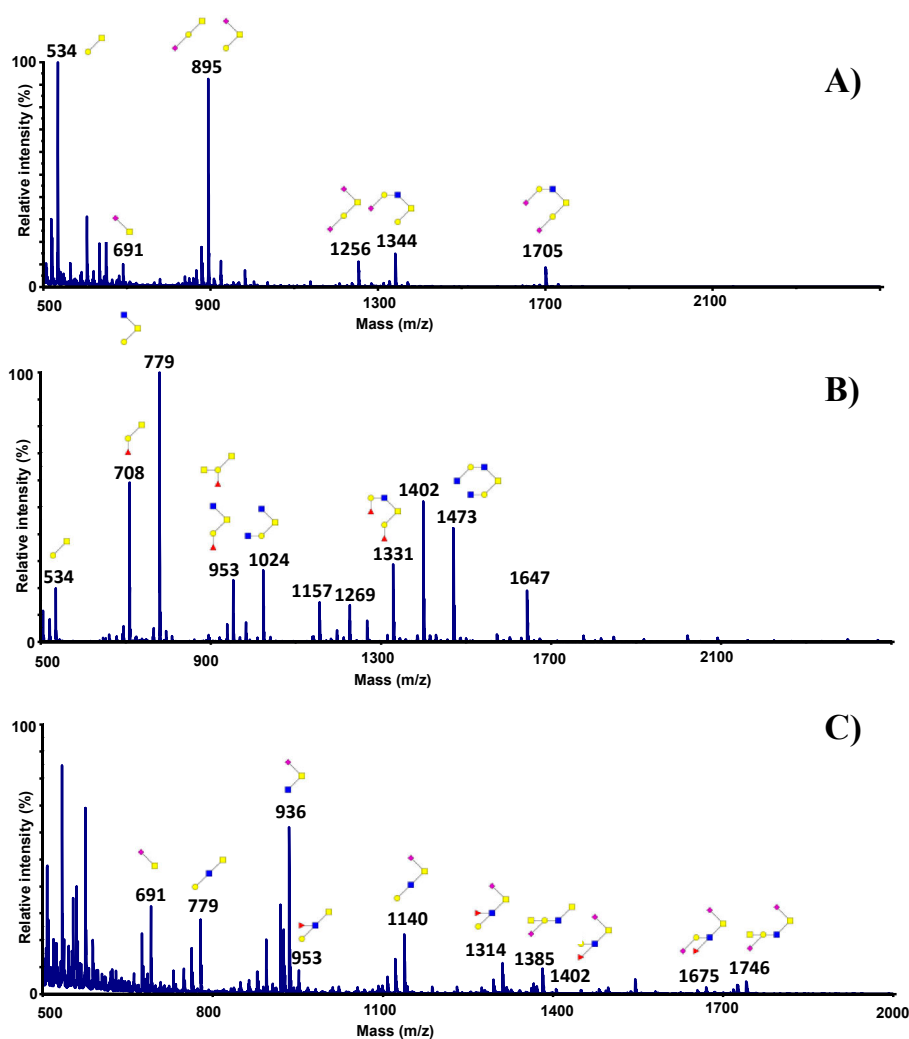


Figure 4. MS spectra of permethylated *O*-glycans isolated from mucins purified from HT29-MTX (A); from pig gastric mucins (B) and from human colonic mucins (C). Mucin *O*-glycans were released from the protein backbone and permethylated before analysis by MALDI-TOF mass spectrometry in the positive ion mode $[M+Na]^+$. Monosaccharide symbols are used according to the Consortium for Functional Glycomics (CFG) nomenclature. Key: fucose (red triangle), GlcNAc (blue square), sialic acid (purple diamond), galactose (yellow circle), GalNAc-ol (yellow square) and sulfate residue (S). Note that for simplified comprehension, only the structure corresponding to the major isomer was drawn on the MS spectrum of PGM. Other isomers with the same monosaccharide composition might be present.

On the contrary, human intestinal mucins are highly acidic and almost all the glycans are based on a core 3 structure (GlcNAc β 1-3GalNAc), as we have previously published [21,22]. Moreover, many of them had sialic acid α 2-6 residues linked to the first GalNAc, as illustrated on the MS spectrum by the ions at m/z 936, 1140, 1314, 1675 and 1746 (Figure 4C). Only few minor glycans possessed core 1 or

core 2 structures. Numerous intestinal mucin O-glycans carry blood group and Lewis antigens, as well as more specific antigens like Sda/Cad determinants (GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-), for example, the ion at m/z 1385.

3.3. Influence of Sialic Acid Residues and/or Core Structure on Bacterial and Yeast Adhesion to Human Mucins

To determine if sialylation could be a key factor in the binding of microorganisms to mucins, we next chemically desialylated human intestinal mucins and compared the level of adhesion of bacteria and yeast to native mucins and their desialylated counterparts (Figure 5A). The removal of sialic acids resulted in a dramatic decrease in the level of adhesion, ranging from 47% for *L. rhamnosus* and 89% for the tested strain of *S. cerevisiae* to up to 96% for *L. paracasei* and 97% for *Y. enterocolitica*. For all the microorganisms tested, the level of binding to desialylated human intestinal mucins was near the same as that of native PGM.

In human intestinal mucins, sialic acids are mainly α 2-6 linked to the first GalNAc, which is also substituted by a GlcNAc residue β 1,3 linked to form a core 3 glycan. To determine whether only the sialic acid residues are important for the binding of microorganisms or if the core structure can play a role in the recognition, we next evaluated the binding of bacteria to malignant human ovarian cyst mucins. As shown in Figure 6A, ovarian cyst mucin O-glycans exhibited a high proportion of sialylated glycans (more than 50% of all the O-glycans identified). However, in contrast to intestinal mucin oligosaccharides, sialylated glycans from ovarian cysts were mainly based on a core 1 structure, with a small proportion of sialylated core 2 glycans. As depicted by Figure 6B, most tested microorganisms showed no significant adhesion with the O-glycan structures found on native mucins from ovarian cysts. Only a low level of adhesion on these mucins was detected for *E. coli* Nissle 1917 and *Y. enterocolitica*. When treated under mild acidic conditions to remove sialic acids from O-glycans, ovarian cystic mucins gained the capacity to be used as a ligand by two of the tested microorganisms, the bacteria *Y. enterocolitica* and to a lower extent, the yeast *S. cerevisiae* CNCM I-3856. These results seem to indicate that depending on the type of core harboured by mucin O-glycans, sialic acid residues can either constitute a crucial part of the binding site or mask a potential site of adhesion.

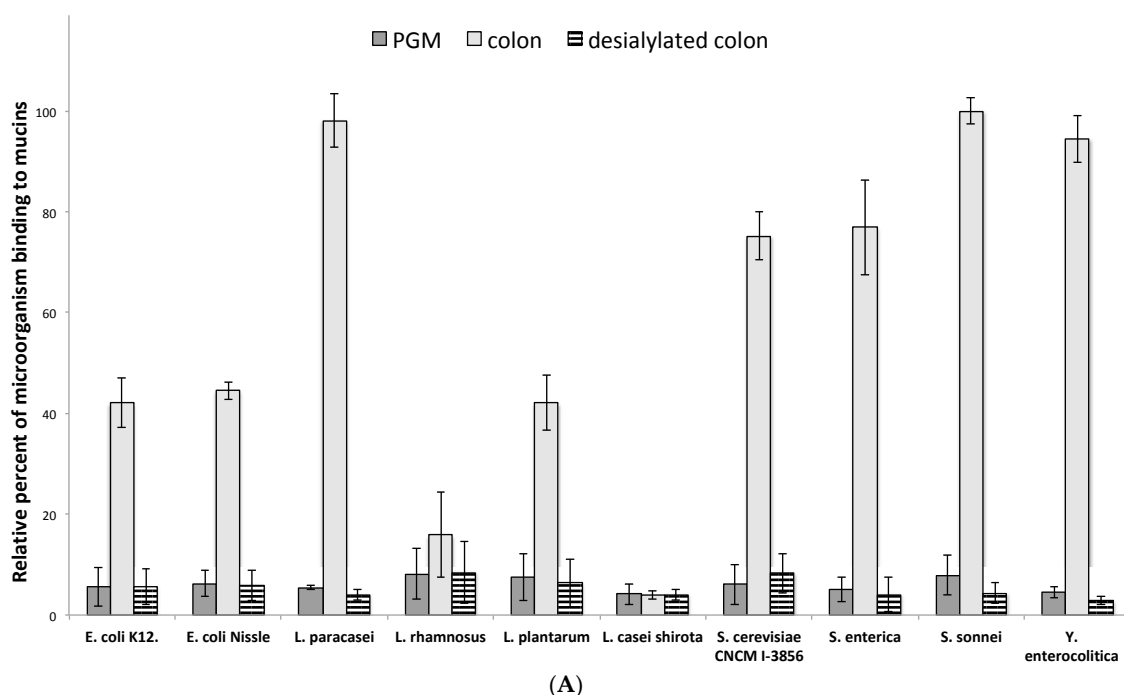


Figure 5. Cont.

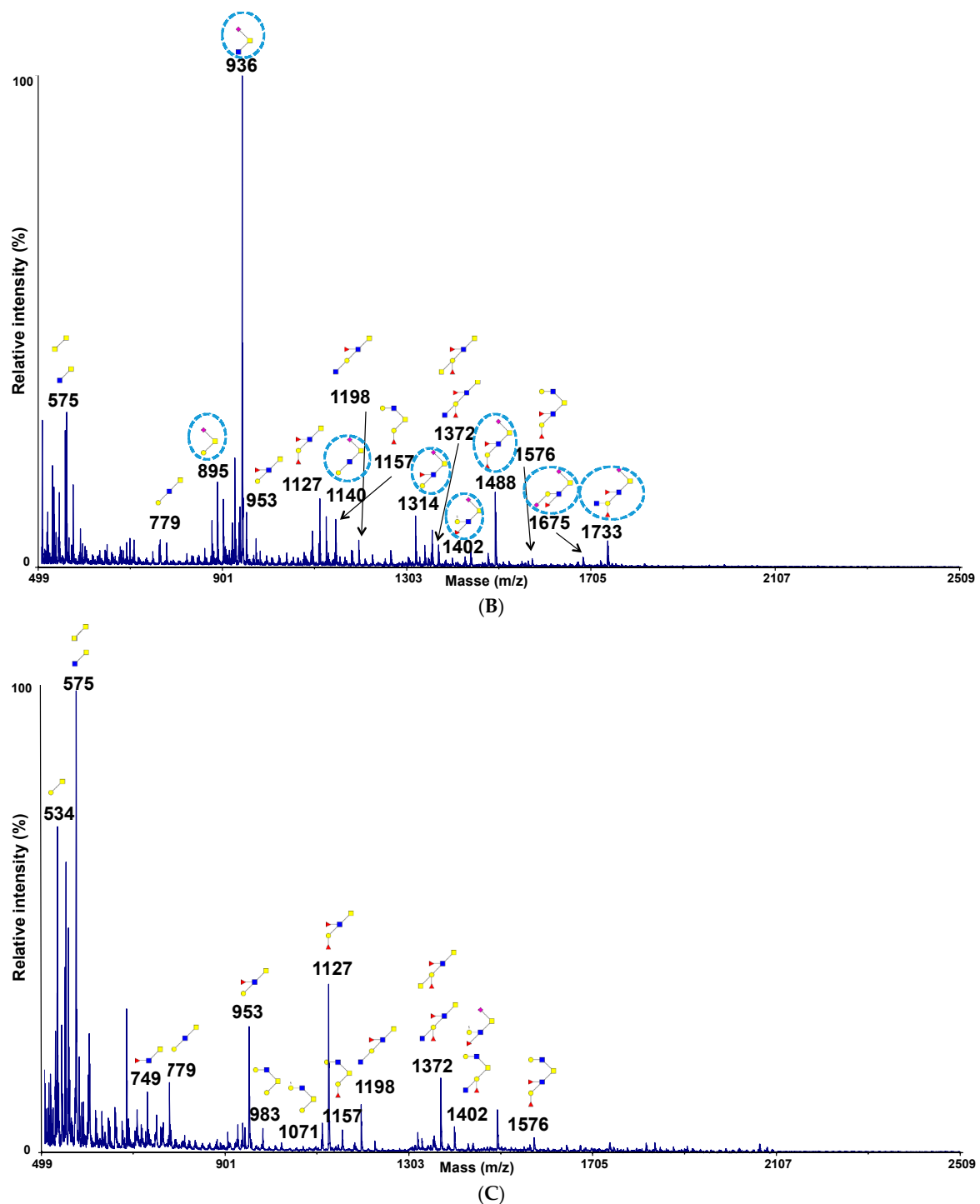


Figure 5. Influence of sialic acid residues on the adhesion of microorganisms to human mucins. (A) Bacteria and yeast preferentially bind to native human colonic mucins. The binding of DAPI-labeled microorganisms to pig gastric mucin (dark grey), human purified colonic mucins (light grey) and their desialylated counterparts (striped) was quantified by slot-blot overlay assays. A strong decrease of binding was observed for all microorganisms tested after chemical desialylation of mucins, the level of adhesion reaching that of PGM. Data shown is a representative experiment \pm SD of three replicates. (B,C) MS spectra of permethylated O-glycans isolated from native (B) and desialylated human colonic mucins (C), acquired in the positive ion mode $[M+Na]^+$. Monosaccharide symbols are used according to the Consortium for Functional Glycomics (CFG) nomenclature. Key: fucose (red triangle), GlcNAc (blue square), sialic acid (purple diamond), galactose (yellow circle), GalNAc-ol (yellow square) and sulfate residue (S).

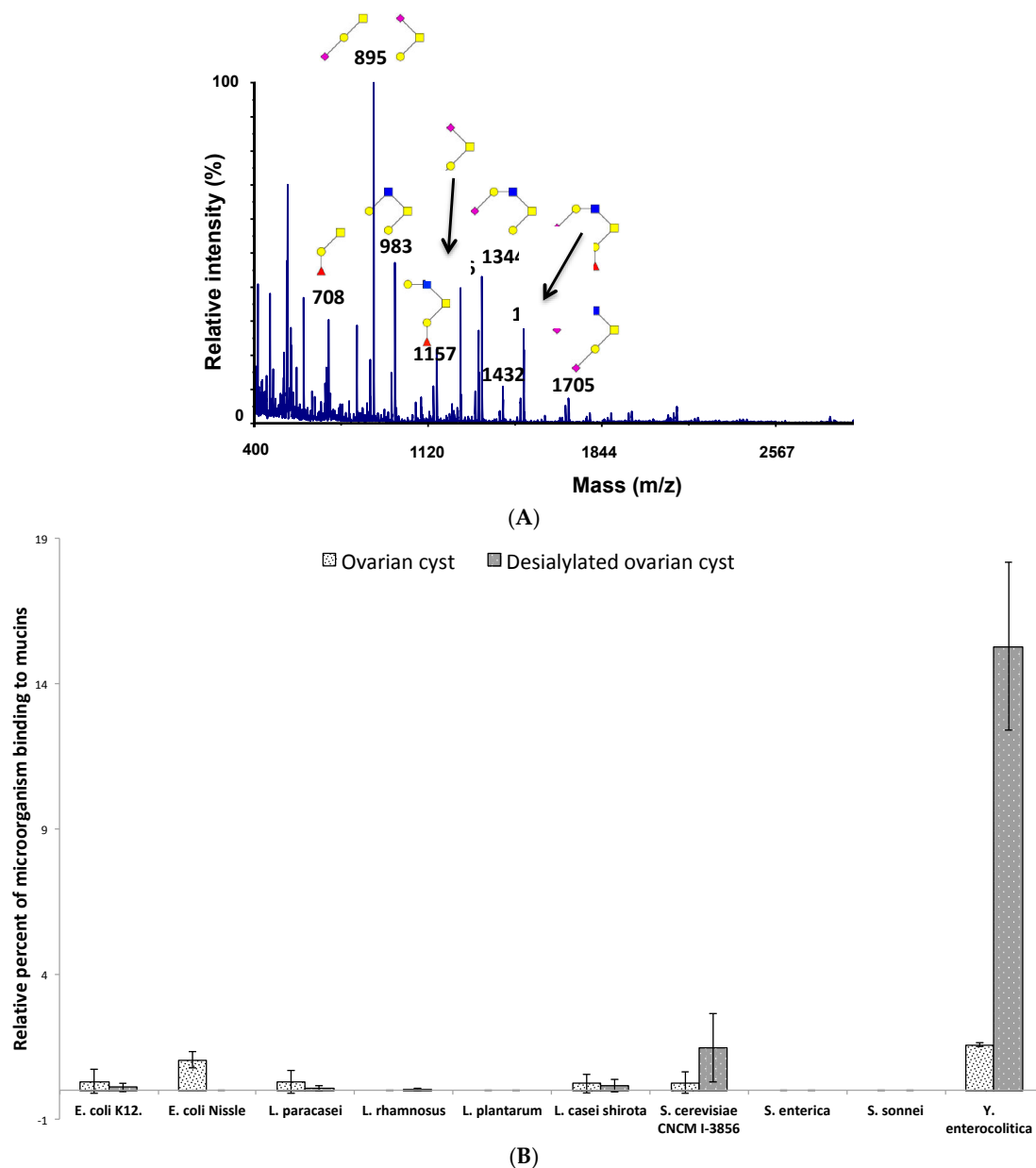


Figure 6. Not all types of sialylated mucin *O*-glycans are ligands for microorganisms. (A) MS spectrum of permethylated *O*-glycans isolated from human malignant ovarian cyst mucins, acquired in the positive ion mode $[M+Na]^+$. Monosaccharide symbols are used according to the Consortium for Functional Glycomics (CFG) nomenclature. Key: fucose (red triangle), GlcNAc (blue square), sialic acid (purple diamond), galactose (yellow circle), GalNAc-ol (yellow square) and sulfate residue (S). (B) Binding of DAPI-labeled microorganisms to human purified native ovarian cyst mucins (white, black dots) and their desialylated counterparts (dark grey, white dots) was quantified by slot-blot overlay assays. Sialic acid residues from ovarian cyst mucin *O*-glycans were not recognized by microorganisms. Chemical desialylation of ovarian cyst mucins significantly increased the binding of *Y. enterocolitica*. Data shown is a representative experiment \pm SD of three replicates.

3.4. Adhesion of Microorganisms to Mucins Purified along the Gastrointestinal Tract

We next evaluated the binding of microorganisms to human mucins purified all along the gastrointestinal tract, i.e., human stomach, human jejunum and ileum (small intestine) and human colon. As shown in Figure 7A, the strongest binding was always observed for human colonic mucins,

whatever the microorganism tested. We noticed a 1.4 to 4.5-fold increased adhesion level to colonic mucins compared to human jejunal mucins, the difference of adhesion being the lowest for *L. rhamnosus* and the highest for *Y. enterocolitica*. Each microorganism tested depicted different patterns of binding to human mucins. For example, the pathogenic bacteria *S. sonnei* showed very strong binding to colonic mucins (compared to the other bacteria tested), a 2.5-fold decreased adhesion to jejunal mucins, a 5.8-fold decreased adhesion to gastric mucins and an 11-fold decrease for ileal mucins. On the contrary, the adhesion of *L. rhamnosus* to human gastrointestinal mucins was very weak and little difference was observed between mucins.

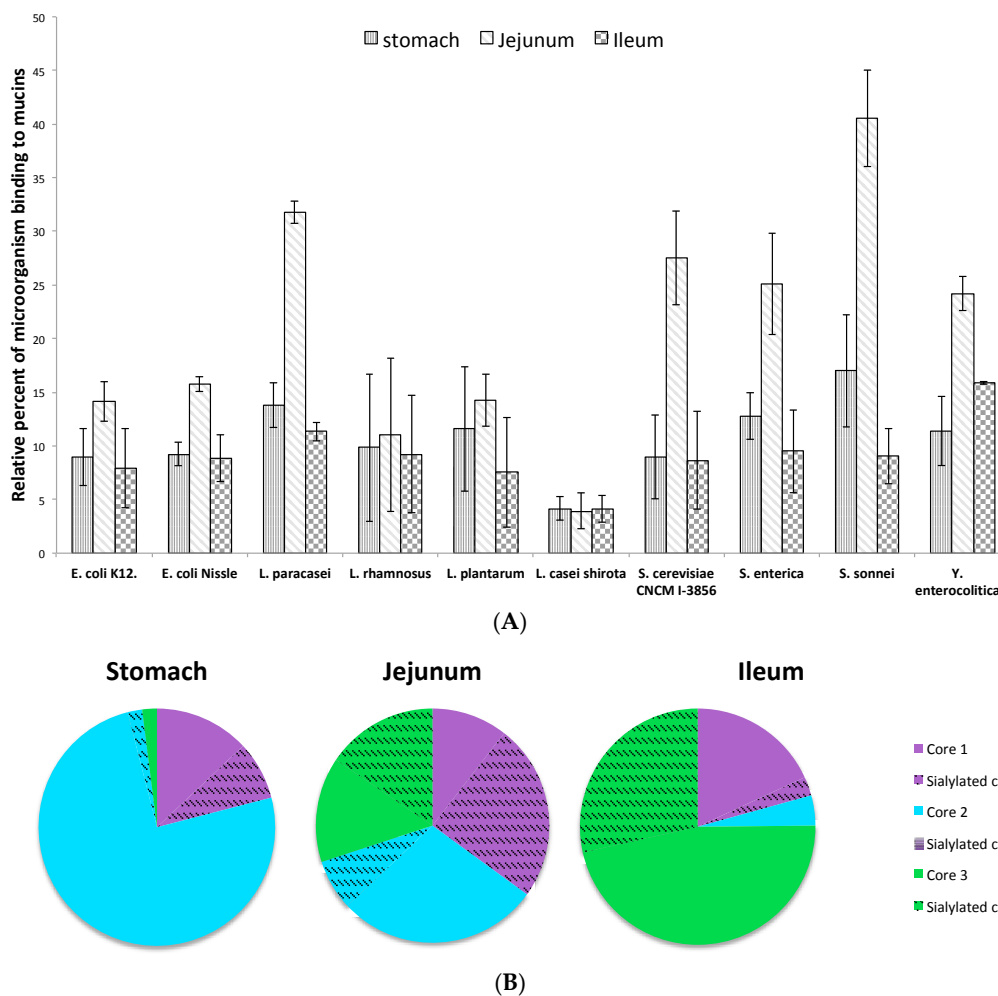


Figure 7. Adhesion of microorganisms along the gastrointestinal tract. **(A)** Binding of DAPI-labeled microorganisms to human purified mucins from the stomach (vertical strips), jejunum (oblique strips) and ileum (chequerwise) was quantified by slot-blot overlay assays. Microorganisms bind preferentially to colonic mucins and to jejunal mucins. Data shown is a representative experiment \pm SD of three replicates. **(B)** Structural features of human gastric, jejunal and ileal mucin glycosylation. Schematic illustration of the repartition of sialylated and non-sialylated oligosaccharides based on core 1, 2 or 3 glycans, carried by mucins.

Compared to human colonic mucins, the binding of microorganisms to gastric and ileal mucins remains weak, with around a 5 to 11-fold decrease for all tested bacteria and yeast.

To better understand the difference in the binding of microorganisms to human jejunal mucins compared to ileal and gastric mucins, we characterized the glycosylation of the different mucins (Figure 7B). Human gastric mucins were mainly based on core 2 glycans. Most of the oligosaccharides were neutral and highly fucosylated. Only 10% of the structures were acidic, carrying

sialic acid residues. Among these sialylated oligosaccharides, sialyl TF and disialyl TF antigens (NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc), based on a core 1 structure, were the most expressed. Around 3% of oligosaccharides were short sialylated core 2 glycans. A major feature of human gastric mucins was the expression of blood group antigens, carried by around 80% of the O-glycans. In the jejunum, glycans were either based on a core 1, core 2 or core 3 structure. Around 45–50% of O-glycans were sialylated, with mainly core 1 and core 3 sialylated oligosaccharides linked at α 2-3 to Gal residues or at α 2-6 to the first GalNAc. Around 35–40% of oligosaccharides carried blood group antigens. In the ileum, oligosaccharides were predominantly neutral and highly fucosylated, but, in contrast to gastric mucins, they were mainly based on a core 3 structure, with some glycans based on a core 4 structure (GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc). Around 55% of the oligosaccharides carried blood group and Lewis determinants and only 30% of glycans were sialylated. Most of the sialic acid residues were α 2-6 linked to the first GalNAc and carried by a core 3 structure.

4. Discussion

The large intestine is lined by two layers of mucus, the innermost of these remaining devoid of microorganisms under healthy conditions. This means that intestinal cells are usually not directly exposed to probiotic or commensal intestinal flora. For this reason, evaluating the efficacy of probiotics on protecting the human intestinal mucosa requires the use of either biological samples or the disposal of cell culture models covered by mucus, which is not the case for the Caco2 cells very often used in studies aimed at evaluating the adhesion of probiotics to the gastrointestinal tract.

Other studies regarding the adhesion properties of potential probiotics within the mucus have either been directly performed on HT29 cell cultures or performed on mucins purified from this material. Our results show that no interpolation can be made regarding the adhesion on colonic mucins from the binding obtained on HT29 purified mucins. HT29 cells are derived from a colic tumour, and it has been shown that glycosylation is strongly affected by carcinogenesis. Indeed, HT29 secreted mucins mostly harbour TF, sialyl TF and disialyl TF antigens based on a core 1 structure, whereas the predominating healthy colonic structures are based on core 3 glycans. Moreover, mucins from mucus secreting HT29 cells are mainly MUC5AC mucins whereas major secreted mucins from the intestine are MUC2 mucins.

An alternative to HT29 mucins commonly found in the literature is pig gastric mucin (PGM). This mucin, also called PGM type-II or type-III, is often erroneously taken as MUC2. Here, again, the results presented show that even if this commercially available mucin is very convenient to use, the adhesion levels obtained with this material do not allow conclusions to be drawn on the binding propensity of microorganisms for intestinal mucins.

The bacterial overlay presented here is suitable for the performance of a fast screen, allowing the identification of probiotics with high mucus adhesion propensity. Nevertheless, it does not have the ability to proclaim that a given microorganism will be able to bind *in vivo* to the areas of the gastrointestinal tract from which purified mucins have been extracted. Indeed, the main criteria for bacteria to be able to reside in a given area of the intestine, is that they are able to reach the mucus of this organ as a living organism. To exert health benefits, the minimum concentration of live probiotic bacteria at point of delivery should be above 10^7 cfu mL⁻¹ [50]. The viability of probiotics must therefore not be altered by the passage through the adverse acidic environments of the stomach and the entry into the duodenum that not only involves a change in pH, but also exposes microorganisms to bile salts which act as detergents, causing cell damage and cytotoxicity [51,52]. Actually, less than 10% of the strains tested can grow in the gastrointestinal tract [53] and gut microorganisms have evolved highly conserved mechanisms for tolerance to gastrointestinal stresses [54,55]. In some cases, the adhesive properties of bacteria to mucins are positively affected by the passage through the stomach and duodenum and their adhesion propensity may be increased compared to the same types of bacteria that are not submitted to the harsh pH treatments [56].

The dramatic loss of microorganism adhesion observed when intestinal mucins were chemically desialylated (Figure 5A) emphasizes the role played by sialic acids in this process. The involvement of sialic acid in the binding of gut microorganisms to mucins is well documented. For instance, the recently described adhesin domain, CBM40, present in the human gut symbiont *Ruminococcus gnavus* is specific towards sialoglycans with a millimolar binding affinity towards α 2,3- or α 2,6-sialyllactose. It also mediates adhesion to mucins [57]. In another study [58], the crucial role played by sialic acid residues bound to mucin O-glycans on the adhesion observed for two lactobacilli strains and one bifidobacteria strain was assessed. Lactobacillus exhibits numerous mechanisms for adhesion to mucus, among which mucus-binding proteins (MUBs) have been well characterized. The MUB proteins contain repeated functional domains (Mub repeats), which share homology with the Pfam-MucBP (mucin-binding protein) domains (PF06458). Mub repeats have been shown to adhere to pig gastric mucins and hen intestinal mucus [59]. Adhesion assays of MUB from *Lactobacillus reuteri* on mammalian tissue sections and a mucus-secreting intestinal cell line demonstrated the binding of MUB to sialylated mucin glycans [60]. The importance of sialic acid in mucin binding has also been assessed for bacteroidetes, whose adhesin NanU has been demonstrated to bind to Neu5Ac with high affinity in *Bacteroides fragilis* [61].

The importance of sialic acids in adhesion to mucins also applies to pathogenic bacteria. The best-documented example is *Helicobacter pylori* which shows the influence of blood group motives containing O-glycans at the surface of the gastric mucosa, recognized by the adhesin BabA. Upon infection by *H. pylori*, the rate of sialylated mucins, scarce in a healthy stomach, increases significantly [62–64]. Glycans harboured on these mucins present the motif, SLex, the specific ligand for sialic acid-binding adhesin (SabA) [65]. Pathogens like *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus mitis* present the capacity to adhere to sialylated mucins via serine rich region proteins (SRR proteins) [66] or Hsa adhesin [67]. Our results show that the nature of the sialylated core of O-glycans potentially enables sialic acid residues to modulate the adhesion of microorganisms, either positively or negatively. This should be further studied on a broader range of bacteria and on purified O-glycan structures.

In this study, we demonstrated that sialylated core 3 glycans are key factors in the binding of intestinal commensals, probiotics and pathogens to mucins. However, we also showed that microorganisms have the ability to bind, to a lesser extent, to gastric mucins, which are mainly composed of non-sialylated core 2 O-glycans. These results may be explained by the high expression of blood group antigens on gastric mucins. Indeed, several studies have reported the capacity of bacterial adhesins to recognize blood group determinants. For example, FedF, the adhesion on F18 fimbriae from shiga-secreting *E. coli*, binds to ABH type 1 and sulphated H type 2 blood group antigens [68]. Family 1 of solute-binding proteins from Bifidobacterium, which is part of the ABC transporters, has been identified as able to bind mucin O-glycans, human milk oligosaccharides and blood group antigens [69]. Blood group antigens are also expressed by mucins from the jejunum and ileum and may be recognized by microorganisms, thus at least partly explaining their binding.

In conclusion, we have developed a rapid and sensitive assay to evaluate the binding of microorganisms to mucins, with smaller amounts of material than in conventional mucin binding experiments. We have demonstrated its efficiency to study biologically relevant interactions between mucin glycotopes and bacteria. The use of human mucins rather than mucins derived from cell culture or from commercial sources is crucial to identify the exact oligosaccharide structures involved in bacteria–host crosstalk. This will help to clarify the molecular mechanisms of O-glycan mediated interactions in infectious diseases as well as selecting probiotics with a high capacity for mucus adhesion and colonization.

Author Contributions: B.R.D., Z.D., J.M.L., M.M.B., R.L. and C.R.M. contributed to the conception and design of the experiments. B.R.D., Z.D., R.L. and C.R.M. performed the experiments. B.R.D., Z.D., J.M.L., M.M.B., R.L. and C.R.M. analyzed and interpreted the data. B.R.D., J.M.L., M.M.B., R.L. and C.R.M. prepared the manuscript draft.

Acknowledgments: We are indebted to the Research Federation FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires) for providing the scientific and technical environment conducive to achieving this work. We thank Eric Oswald and Jean-Philippe Nougayrede for kindly providing us *E. coli* Nissle 1917 strain. This work was supported by Association Vaincre la Mucoviscidose (Grant N° RF20150501357) and Association Grégory Lemarchal (Grant N° RIF20160501690).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 506–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Arunachalam, K.; Gill, H.S.; Chandra, R.K. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur. J. Clin. Nutr.* **2000**, *54*, 263–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Gill, H.S.; Rutherford, K.J.; Cross, M.L. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: An investigation of age-related immunological changes. *J. Clin. Immunol.* **2001**, *21*, 264–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Madsen, K.; Cornish, A.; Soper, P.; McKaigney, C.; Jijon, H.; Yachimec, C.; Doyle, J.; Jewell, L.; De Simone, C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* **2001**, *121*, 580–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ben Braïek, O.; Cremonesi, P.; Morandi, S.; Smaoui, S.; Hani, K.; Ghrairi, T. Safety characterisation and inhibition of fungi and bacteria by a novel multiple enterocin-producing *Enterococcus lactis* 4CP3 strain. *Microb. Pathog.* **2018**, *118*, 32–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Vasilchenko, A.S.; Vasilchenko, A.V.; Valyshev, A.V.; Rogozhin, E.A. A Novel High-Molecular-Mass Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium*: Biochemical Features and Mode of Action. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Hecht, A.L.; Casterline, B.W.; Earley, Z.M.; Goo, Y.A.; Goodlett, D.R.; Bubeck Wardenburg, J. Strain competition restricts colonization of an enteric pathogen and prevents colitis. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 1281–1291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Carter, A.; Adams, M.; La Ragione, R.M.; Woodward, M.J. Colonisation of poultry by *Salmonella* Enteritidis S1400 is reduced by combined administration of *Lactobacillus salivarius* 59 and *Enterococcus faecium* PXN-33. *Vet. Microbiol.* **2017**, *199*, 100–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Macfarlane, G.T.; Macfarlane, S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *J. AOAC Int.* **2012**, *95*, 50–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Fukuda, S.; Toh, H.; Hase, K.; Oshima, K.; Nakanishi, Y.; Yoshimura, K.; Tobe, T.; Clarke, J.M.; Topping, D.L.; Suzuki, T.; et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **2011**, *469*, 543–547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Mukherjee, S.; Ramesh, A. Bacteriocin-producing strains of *Lactobacillus plantarum* inhibit adhesion of *Staphylococcus aureus* to extracellular matrix: Quantitative insight and implications in antibacterial therapy. *J. Med. Microbiol.* **2015**, *64*, 1514–1526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Johansson, M.E.V.; Ambort, D.; Pelaseyed, T.; Schütte, A.; Gustafsson, J.K.; Ermund, A.; Subramani, D.B.; Holmén-Larsson, J.M.; Thomsson, K.A.; Bergström, J.H.; et al. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 3635–3641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Atuma, C.; Strugala, V.; Allen, A.; Holm, L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: Thickness and physical state in vivo. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2001**, *280*, G922–G929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kim, Y.S.; Ho, S.B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2010**, *12*, 319–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Desseyn, J.L.; Aubert, J.P.; Porchet, N.; Laine, A. Evolution of the large secreted gel-forming mucins. *Mol. Biol. Evol.* **2000**, *17*, 1175–1184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ho, S.B.; Robertson, A.M.; Shekels, L.L.; Lyftogt, C.T.; Niehans, G.A.; Toribara, N.W. Expression cloning of gastric mucin complementary DNA and localization of mucin gene expression. *Gastroenterology* **1995**, *109*, 735–747. [[CrossRef](#)]

17. Reis, C.A.; David, L.; Nielsen, P.A.; Clausen, H.; Mirgorodskaya, K.; Roepstorff, P.; Sobrinho-Simões, M. Immunohistochemical study of MUC5AC expression in human gastric carcinomas using a novel monoclonal antibody. *Int. J. Cancer* **1997**, *74*, 112–121. [[CrossRef](#)]
18. De Bolós, C.; Garrido, M.; Real, F.X. MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. *Gastroenterology* **1995**, *109*, 723–734. [[CrossRef](#)]
19. Bartman, A.E.; Buisine, M.P.; Aubert, J.P.; Niehans, G.A.; Toribara, N.W.; Kim, Y.S.; Kelly, E.J.; Crabtree, J.E.; Ho, S.B. The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissues. *J. Pathol.* **1998**, *186*, 398–405. [[CrossRef](#)]
20. Van Klinken, B.J.; Dekker, J.; van Gool, S.A.; van Marle, J.; Büller, H.A.; Einerhand, A.W. MUC5B is the prominent mucin in human gallbladder and is also expressed in a subset of colonic goblet cells. *Am. J. Physiol.* **1998**, *274*, G871–G878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Robbe, C.; Capon, C.; Maes, E.; Rousset, M.; Zweibaum, A.; Zanetta, J.-P.; Michalski, J.-C. Evidence of regio-specific glycosylation in human intestinal mucins: Presence of an acidic gradient along the intestinal tract. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46337–46348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Robbe, C.; Capon, C.; Coddeville, B.; Michalski, J.-C. Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochem. J.* **2004**, *384*, 307–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Larsson, J.M.H.; Karlsson, H.; Sjövall, H.; Hansson, G.C. A complex, but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn. *Glycobiology* **2009**, *19*, 756–766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Koropatkin, N.M.; Cameron, E.A.; Martens, E.C. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 323–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Donaldson, G.P.; Lee, S.M.; Mazmanian, S.K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 20–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bennett, E.P.; Mandel, U.; Clausen, H.; Gerken, T.A.; Fritz, T.A.; Tabak, L.A. Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* **2012**, *22*, 736–756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hounsell, E.F.; Davies, M.J.; Renouf, D.V. O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconj. J.* **1996**, *13*, 19–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Fukuda, M.; Carlsson, S.R.; Klock, J.C.; Dell, A. Structures of O-linked oligosaccharides isolated from normal granulocytes, chronic myelogenous leukemia cells, and acute myelogenous leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 12796–12806. [[PubMed](#)]
29. Rossez, Y.; Maes, E.; Lefebvre Darroman, T.; Gosset, P.; Ecobichon, C.; Joncquel Chevalier Curt, M.; Boneca, I.G.; Michalski, J.-C.; Robbe-Masselot, C. Almost all human gastric mucin O-glycans harbor blood group A, B or H antigens and are potential binding sites for *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* **2012**, *22*, 1193–1206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Capon, C.; Maes, E.; Michalski, J.C.; Leffler, H.; Kim, Y.S. Sd(a)-antigen-like structures carried on core 3 are prominent features of glycans from the mucin of normal human descending colon. *Biochem. J.* **2001**, *358*, 657–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Podolsky, D.K. Oligosaccharide structures of human colonic mucin. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 8262–8271. [[PubMed](#)]
32. Kruis, W.; Schütz, E.; Fric, P.; Fixa, B.; Judmaier, G.; Stolte, M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **1997**, *11*, 853–858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Henker, J.; Laass, M.; Blokhin, B.M.; Bolbot, Y.K.; Maydannik, V.G.; Elze, M.; Wolff, C.; Schulze, J. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur. J. Pediatr.* **2007**, *166*, 311–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Salvetti, E.; O’Toole, P.W. The Genomic Basis of Lactobacilli as Health-Promoting Organisms. *Microbiol. Spectr.* **2017**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Liu, C.-J.; Wang, R.; Gong, F.-M.; Liu, X.-F.; Zheng, H.-J.; Luo, Y.-Y.; Li, X.-R. Complete genome sequences and comparative genome analysis of *Lactobacillus plantarum* strain 5-2 isolated from fermented soybean. *Genomics* **2015**, *106*, 404–411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Douillard, F.P.; Ribbera, A.; Xiao, K.; Ritari, J.; Rasinkangas, P.; Paulin, L.; Palva, A.; Hao, Y.; de Vos, W.M. Polymorphisms, Chromosomal Rearrangements, and Mutator Phenotype Development during Experimental Evolution of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 3783–3792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Campieri, M.; Gionchetti, P. Probiotics in inflammatory bowel disease: New insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative? *Gastroenterology* **1999**, *116*, 1246–1249. [[CrossRef](#)]
38. Naito, E.; Yoshida, Y.; Kunihiro, S.; Makino, K.; Kasahara, K.; Kounoshi, Y.; Aida, M.; Hoshi, R.; Watanabe, O.; Igarashi, T.; et al. Effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota-fermented milk on metabolic abnormalities in obese prediabetic Japanese men: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Biosci. Microbiota Food Health* **2018**, *37*, 9–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Spiller, R.; Pélerin, F.; Cayzele Decherf, A.; Maudet, C.; Housez, B.; Cazaubiel, M.; Jüsten, P. Randomized double blind placebo-controlled trial of *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 in irritable bowel syndrome: Improvement in abdominal pain and bloating in those with predominant constipation. *United Eur. Gastroenterol. J.* **2016**, *4*, 353–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Cover, T.L.; Aber, R.C. *Yersinia enterocolitica*. *N. Engl. J. Med.* **1989**, *321*, 16–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Saebø, A.; Lassen, J. Acute and chronic gastrointestinal manifestations associated with *Yersinia enterocolitica* infection. A Norwegian 10-year follow-up study on 458 hospitalized patients. *Ann. Surg.* **1992**, *215*, 250–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Aslam, A.; Gossman, W.G. *Shigella* (Shigellosis). In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2018.
43. Zhang, J.S.; Guri, A.; Corredig, M.; Morales-Rayas, R.; Hassan, A.; Griffiths, M.; LaPointe, G. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain JFR1 attenuates *Salmonella* adhesion to human intestinal cells in vitro. *Food Res. Int.* **2016**, *90*, 147–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ciucanu, I.; Kerek, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **1984**, *131*, 209–217. [[CrossRef](#)]
45. Odenbreit, S.; Swoboda, K.; Barwig, I.; Ruhl, S.; Borén, T.; Koletzko, S.; Haas, R. Outer Membrane Protein Expression Profile in *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 3782–3790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Stiefel, P.; Schmidt-Emrich, S.; Maniura-Weber, K.; Ren, Q. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiol.* **2015**, *15*, 36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Derevitskaya, V.A.; Arbatsky, N.P.; Kochetkov, N.K. The structure of carbohydrate chains of blood-group substance. Isolation and elucidation of the structure of higher oligosaccharides from blood group substance H. *Eur. J. Biochem.* **1978**, *86*, 423–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Karlsson, N.G.; Nordman, H.; Karlsson, H.; Carlstedt, I.; Hansson, G.C. Glycosylation differences between pig gastric mucin populations: A comparative study of the neutral oligosaccharides using mass spectrometry. *Biochem. J.* **1997**, *326*, 911–917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Thomsson, K.A.; Karlsson, N.G.; Hansson, G.C. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry as a tool for the analysis of sulfated oligosaccharides from mucin glycoproteins. *J. Chromatogr. A* **1999**, *854*, 131–139. [[CrossRef](#)]
50. Lee, Y.K.; Salminen, S. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* **1995**, *6*, 241–245. [[CrossRef](#)]
51. Andreïchin, M.A. [Bacterial lesions of the biliary tract in viral hepatitis]. *Zhurnal Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* **1980**, *246*, 72–76.
52. Begley, M.; Gahan, C.G.M.; Hill, C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, *29*, 625–651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Coeuret, V.; Gueguen, M.; Vernoux, J.P. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *97*, 147–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Azcarate-Peril, M.A.; Altermann, E.; Hoover-Fitzula, R.L.; Cano, R.J.; Klaenhammer, T.R. Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 5315–5322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Bruno-Bárcena, J.M.; Andrus, J.M.; Libby, S.L.; Klaenhammer, T.R.; Hassan, H.M. Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal lactobacilli provides protection against hydrogen peroxide toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4702–4710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

56. Bengoa, A.A.; Zavala, L.; Carasi, P.; Trejo, S.A.; Bronsoms, S.; Serradell, M.L.Á.; Garrote, G.L.; Abraham, A.G. Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. *Food Res. Int.* **2018**, *103*, 462–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Owen, C.D.; Tailford, L.E.; Monaco, S.; Šuligoj, T.; Vaux, L.; Lallement, R.; Khedri, Z.; Yu, H.; Lecointe, K.; Walshaw, J.; et al. Unravelling the specificity and mechanism of sialic acid recognition by the gut symbiont *Ruminococcus gnavus*. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 2196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Huang, I.-N.; Okawara, T.; Watanabe, M.; Kawai, Y.; Kitazawa, H.; Ohnuma, S.; Shibata, C.; Horii, A.; Kimura, K.; Taketomo, N.; et al. New screening methods for probiotics with adhesion properties to sialic acid and sulphate residues in human colonic mucin using the Biacore assay. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, *114*, 854–860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Roos, S.; Jonsson, H. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology* **2002**, *148*, 433–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Etzold, S.; Kober, O.I.; Mackenzie, D.A.; Tailford, L.E.; Gunning, A.P.; Walshaw, J.; Hemmings, A.M.; Juge, N. Structural basis for adaptation of lactobacilli to gastrointestinal mucus. *Environ. Microbiol.* **2014**, *16*, 888–903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Phansopa, C.; Roy, S.; Rafferty, J.B.; Douglas, C.W.I.; Pandhal, J.; Wright, P.C.; Kelly, D.J.; Stafford, G.P. Structural and functional characterization of NanU, a novel high-affinity sialic acid-inducible binding protein of oral and gut-dwelling *Bacteroidetes* species. *Biochem. J.* **2014**, *458*, 499–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Joncquel Chevalier Curt, M.; Lecointe, K.; Mihalache, A.; Rossez, Y.; Gosset, P.; Léonard, R.; Robbe-Masselot, C. Alteration or adaptation, the two roads for human gastric mucin glycosylation infected by *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* **2015**, *25*, 617–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Marcos, N.T.; Magalhães, A.; Ferreira, B.; Oliveira, M.J.; Carvalho, A.S.; Mendes, N.; Gilmartin, T.; Head, S.R.; Figueiredo, C.; David, L.; et al. *Helicobacter pylori* induces beta3GnT5 in human gastric cell lines, modulating expression of the SabA ligand sialyl-Lewis x. *J. Clin. Investig.* **2008**, *118*, 2325–2336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Magalhães, A.; Marcos-Pinto, R.; Nairn, A.V.; dela Rosa, M.; Ferreira, R.M.; Junqueira-Neto, S.; Freitas, D.; Gomes, J.; Oliveira, P.; Santos, M.R.; et al. *Helicobacter pylori* chronic infection and mucosal inflammation switches the human gastric glycosylation pathways. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Basis Dis.* **2015**, *1852*, 1928–1939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Mahdavi, J.; Sondén, B.; Hurtig, M.; Olfat, F.O.; Forsberg, L.; Roche, N.; Angstrom, J.; Larsson, T.; Teneberg, S.; Karlsson, K.-A.; et al. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **2002**, *297*, 573–578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Bensing, B.A.; Khedri, Z.; Deng, L.; Yu, H.; Prakobphol, A.; Fisher, S.J.; Chen, X.; Iverson, T.M.; Varki, A.; Sullam, P.M. Novel aspects of sialoglycan recognition by the Siglec-like domains of streptococcal SRR glycoproteins. *Glycobiology* **2016**, *26*, 1222–1234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Urano-Tashiro, Y.; Takahashi, Y.; Oguchi, R.; Konishi, K. Correction: Two Arginine Residues of *Streptococcus gordonii* Sialic Acid-Binding Adhesin Hsa Are Essential for Interaction to Host Cell Receptors. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0161900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Moonens, K.; Bouckaert, J.; Coddens, A.; Tran, T.; Panjikar, S.; De Kerpel, M.; Cox, E.; Remaut, H.; De Greve, H. Structural insight in histo-blood group binding by the F18 fimbrial adhesin FedF. *Mol. Microbiol.* **2012**, *86*, 82–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Garrido, D.; Kim, J.H.; German, J.B.; Raybould, H.E.; Mills, D.A. Oligosaccharide binding proteins from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveal a preference for host glycans. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e17315. [[CrossRef](#)]



Review Article

How do they stick together? Bacterial adhesins implicated in the binding of bacteria to the human gastrointestinal mucins

Béline Ringot-Destrez¹, Nicolas Kalach², Adriana Mihalache^{1,3}, Pierre Gosset³, Jean-Claude Michalski¹, Renaud Léonard¹ and Catherine Robbe-Masselot¹

¹CNRS, UMR 8576, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), Université Lille, F-59000 Lille, France; ²Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille/Faculté Libre de Médecine, Hôpital Saint Philibert, Service Pédiatrie-Gastro-Entérologie, F-59000 Lille, France; and ³Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille/Faculté Libre de Médecine, Hôpital Saint Vincent de Paul, Service d'Anatomie Pathologie, F-59000 Lille, France

Correspondence: Catherine Robbe-Masselot (catherine.robbe@univ-lille1.fr)

The gastrointestinal mucosal surface is the primary interface between internal host tissues and the vast microbiota. Mucins, key components of mucus, are high-molecular-weight glycoproteins characterized by the presence of many O-linked oligosaccharides to the core polypeptide. They play many biological functions, helping to maintain cellular homeostasis and to establish symbiotic relationships with complex microbiota. Mucin O-glycans exhibit a huge variety of peripheral sequences implicated in the binding of bacteria to the mucosal tissues, thereby playing a key role in the selection of specific species and in the tissue tropism displayed by commensal and pathogenic bacteria. Bacteria have evolved numerous strategies to colonize host mucosae, and among these are modulation of expression of cell surface adhesins which allow bacteria to bind to mucins. However, despite well structurally characterized adhesins and lectins, information on the nature and structure of oligosaccharides recognized by bacteria is still disparate. This review summarizes the current knowledge on the structure of epithelial mucin O-glycans and the interaction between host and commensal or pathogenic bacteria mediated by mucins.

Introduction

The number of bacteria constituting the human microbiota is nearly the same as the number of cells in the human body and most of these microorganisms are located in the gastrointestinal tract [1]. This extremely complex living system plays a key role in the protection of the host against mechanical, physical and biological aggressions. This defensive system is permitted by the permanent cross-talk between the microbiota, mucosal barrier and immune system and is based on bacteria–bacteria dialogue, bacteria–mucin interactions and bacteria–epithelial cell cross-talk. The mucus continuously covering the mouth, oesophagus, stomach, small intestine and colon is the interface allowing the dialogue that takes place between the commensal flora and the host. Mucins, which are the main component of the mucus protecting the underlying epithelium, are heavily glycosylated proteins harbouring specific glycan motifs, some of them being recognized by bacterial adhesins and lectins. This review covers the current knowledge on these two partners, mucins and adhesins, so crucial to human–bacteria interactions with a special focus on those for which both the adhesin and the ligand are known.

Received: 14 October 2016
Revised: 16 December 2016
Accepted: 23 January 2017

Version of Record published:
13 April 2017

The gastrointestinal mucus

The gastrointestinal mucus layer

The gastrointestinal mucosa consists of a single layer of columnar epithelial cells tightly linked via intracellular junctions and covered by a layer of secreted mucus. The mucus constitutes the first physical barrier between the lumen and epithelial cells; it serves to protect epithelium from physical, chemical and biological damages, and provides a matrix for a wide range of antimicrobial molecules. The gastrointestinal mucus layer is constantly renewed with an average mucus production of 5–10 l/day [2]. Its thickness varies all along the gastrointestinal tract, being thickest in the stomach and the colon compared with the small intestine. In humans, for example, adherent colonic mucus is thought to measure ~150 μm [3].

The mucus covering the gastrointestinal tract is organized in two layers: a loosely adherent outer layer easily removed and an inner layer firmly attached to the epithelium and devoid of bacteria [3–5]. The gastrointestinal tract is a natural reservoir for commensal microbiota, found exclusively in the outer mucus layer. This mucus traps and transports bacteria, and is a rich source of nutrients used for bacterial metabolism and growth [6]. Mucins are the major structural components of mucus, extensively decorated by O-glycans, which play a key role in the interactions between the host and bacteria.

Gastrointestinal mucins

Mucins are secreted by specialized epithelial cells such as goblet cells that cover and protect many human organs. They are very high-molecular-weight glycoproteins, consisting of a protein backbone containing a central domain of amino acids repeated in tandem with a wide variety of oligosaccharide chains (>50% of the total weight). To date, 20 human MUC genes have been assigned to the MUC gene family, some of them belonging to the secreted gel-forming mucin family, whereas the others are classified in the membrane-bound family [7].



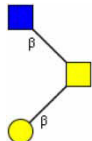



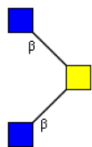

In the adult human stomach, two mucins, MUC5AC and MUC6, are secreted by different categories of cell types. MUC5AC is highly expressed in mucous neck cells of the surface of the gastric epithelium, whereas MUC6 is expressed in mucous neck cells and principal cells of the body and in pyloric glands of the antrum [8–11]. In the small intestine and the colon, the mucus layer mainly consists of MUC2, but low levels of MUC5B can also be found in the colon [12]. The transmembrane mucins MUC3, MUC4, MUC12, MUC13 and MUC17 are constitutively expressed, whereas MUC1 and MUC16 are up-regulated in response to infection and cancer [13,14]. Secreted mucins predominate in works describing the interaction of bacterial adhesins with human mucosa, but transmembrane mucin O-glycans can also serve as a target for bacterial adhesion [15].

Glycosylation of intestinal mucins

O-glycosylation of mucins occurs by the addition of *N*-acetyl-galactosamine (GalNAc) to Ser and Thr residues and further proceeds with sequential addition of monosaccharides: galactose (Gal), *N*-acetyl-glucosamine (GlcNAc), Fucose (Fuc), GalNAc and sialic acid residues [16]. Sulphate residues are also found in the periphery of O-glycans. In mucin O-glycans, three regions may be distinguished, which correspond to the different steps of the O-glycan biosynthesis process: core, backbone and peripheral regions (Table 1) [17,18]. The core region corresponds to the first GalNAc mono- or di-substituted with α - or β -Gal, β -GlcNAc and α -GalNAc. This complex pattern of core types can be further complicated by the structural diversity introduced by sialylation, with *N*-acetyl-neuraminic acid (NeuAc) and *N*-acetyl-glycolyl acid residues being potentially linked to the first GalNAc residue. The backbone regions consist of alternating Gal and GlcNAc in β 1–3 (for the type 1 chains) and β 1–4 (for the type 2 chains) linkages. Fuc, Gal, GalNAc and NeuAc residues are the four monosaccharides found at the periphery or at internal positions of the polylactosamine backbones, most often in the α -anomeric configuration. Sulphate residues are also found, substituting Gal, GalNAc or GlcNAc residues. The peripheral region characterizes the mucin by conferring specific charge to the molecule and antigenic properties. For example, the terminal monosaccharides may form histo-blood group antigens such as A, B, H and Lewis histo-blood group structures: Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, Lewis^y and sialyl Lewis structures [17,18]. Other related carbohydrate antigens such as Sda/Cad antigen (GalNAc attached to Gal also substituted with NeuAc) are also found; their expression is most often tissue-specific or depends on physio-pathological conditions.

Glycosylation of mucins varies all along the gastrointestinal tract of healthy human individuals. In the human stomach, >70 different oligosaccharides are carried by mucins, mostly neutral and highly fucosylated [19]. Only few sialylated glycans are identified and no sulphated glycans are recovered. Almost all the gastric

Table 1 Mucin type O-glycosylation. The different core types of mucin O-glycans

Core type	Structure	Core type	Structure
Core 1		Core 5	
Core 2		Core 6	
Core 3		Core 7	
Core 4		Core 8	

Monosaccharide symbols according to the Consortium for Functional Glycomics (CFG) nomenclature. Key: Fuc (red triangle), GlcNAc (blue square), sialic acid (purple diamond), galactose (yellow circle), GalNAc (yellow square).

O-glycans are constructed on a tetrasaccharide core 2-based structure: $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3[\text{GlcNAc}\beta 1-6]\text{GalNAc}$ [19]. The lower branch is never elongated, except for the presence of blood group A or B antigens. The extreme heterogeneity of gastric mucin glycosylation is mainly due to the elongation of the upper branch with several lactosaminic units, mainly of type 2, and substitution by peripheral residues such as blood group A, B

Table 2 Examples of backbone chains found on mucin O-glycans


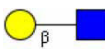
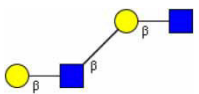
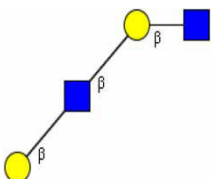
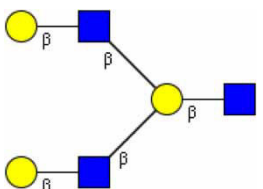
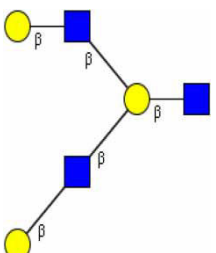
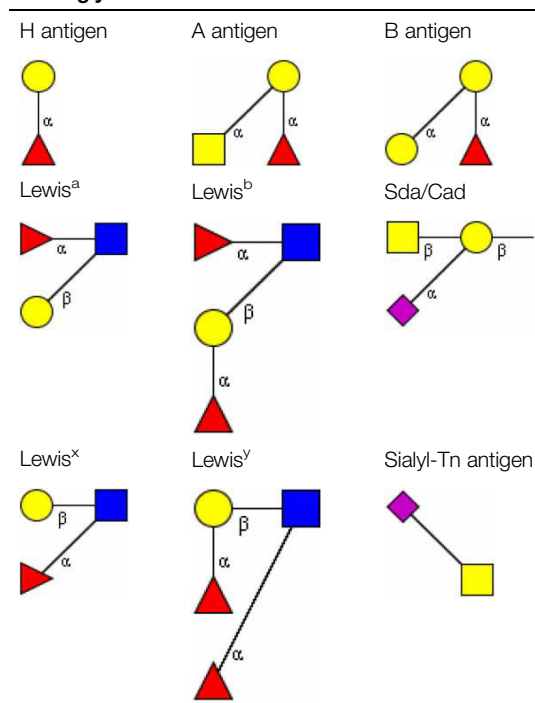
Backbone repeat	Type 1	Type 2
Lactosaminic chains		
i antigen	—	—
Poly N-acetylglucosamine chains		
I antigen	—	—
Branched N-acetylglucosamine chains		

Table 3 Examples of peripheral sequences found on O-glycans



or H antigens. Around 80% of O-glycans carry blood group epitopes, suggesting that the variation in gastric mucin glycosylation between human individuals is mainly due to the blood group status [19].

In contrast with gastric mucins, human intestinal mucin O-glycans are mainly based on sialylated core 3 structures [20–22]. Extensive differences in the glycosylation pattern of mucins along the intestinal tract have been described [21,22], characterized by the presence of decreasing gradients from ileum to rectum of fucose and ABH blood group expression and of an increasing acidic gradient. The high degree of diversity in the expression of glycans in the different parts of the intestine creates an enormous repertoire of potential binding sites for microorganisms that could explain the regio-specific colonization of bacteria in the human gut. In human foetal mucins, no gradient of glycosylation pattern is observed from the small intestine to the colon, suggesting that regio-specific glycosylation of the human gut is acquired after birth, probably due to bacterial primo-colonization and gut post-natal absorptive and digestive functions [23].

Mucin glycans and bacterial adhesion

As described previously, mucin O-glycans are highly pleiotropic in their role in regulating interactions with microorganisms. Mice lacking key glycosyltransferases involved in O-glycan biosynthesis, such as core 3 synthase, C1GalT1 (core 1 synthase) or β 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase 2, display altered mucosal barrier function, greater bacterial translocation into mucosal tissues, and altered bacterial community composition and susceptibility to infection [24–28]. Human non-secretors, i.e. characterized by the lack of functional FUT2 allele and the absence of ABH antigens on various epithelial cell types, possess a significantly distinct microbiota community composition compared with secretors [29].

Taken together, these data illustrated the key roles exerted by mucin O-glycans in bacterial adhesion and regio-specific colonization of epithelial tissues. Bacteria have evolved a variety of lectins and adhesins implicated in their interactions with the host [5,30] and are capable of modulating their expression to rapidly adapt to changes in host glycosylation as observed in numerous diseases [31–35].

Escherichia coli adhesins

E. coli is a Gram-negative bacterium belonging to the Enterobacteriaceae family. It is a commensal bacterium residing in the gastrointestinal tract but has the potential to act as an opportunistic pathogen, causing infections

such as urinary tract infections or sepsis/meningitis [36]. Like most of the Gram-negative and Gram-positive bacteria, *E. coli* strains use extracellular appendages such as flagella, pili and fimbriae for adherence to their host. Fimbriae are long, proteinaceous adhesion organelles comprising fimbrial adhesins having a two-domain organization: the external N-terminal domain is a lectin, whereas the C-terminal pilins connect to the rest of the fimbrius. Fimbrial adhesins are dependent on their glycan epitope for recognition and these glycan epitopes are age-, organ- and species-specific. F17G, the adhesin on F17 fimbriae from enterotoxigenic *E. coli*, recognizes GlcNAc in a terminal non-reducing position or internally in O-glycans from intestinal mucins [37]. FedF, the adhesin on F18 fimbriae from shiga-secreting *E. coli*, binds to ABH type 1 and sulphated H type 2 blood group antigens [38]. CfaE, the adhesin of colonization factor antigen I fimbriae (CFA/I) of enterotoxigenic *E. coli*, mediates binding of *E. coli* to human small intestine by recognizing sialylated proteins, which constitute the first step in diarrhoea pathogenesis [39].

Flagella are composed of thousands of copies of flagellin subunits, are critical elements in the virulence strategies of many bacterial pathogens and play a role in biofilm formation. Several studies have highlighted the role of flagella in the adherence to mucus [40,41]. The flagella of enterohaemorrhagic *E. coli* EDL 933 O157:H7 and enteropathogenic *E. coli* E2348/69 O127:H6 have been shown to bind to mucus and mucins from bovine intestine, which may contribute to colonization of mucosal surfaces [42]. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) secretes a two-partner adhesin, EtpA, that is conserved within the ETEC pathovar and interacts both with the tips of ETEC flagella and with glycans carried by the transmembrane and secreted intestinal mucins at epithelial surfaces, forming a molecular bridge promoting bacterial adhesion and intestinal colonization [15].

Lactobacillus species

Lactobacillus species are commensal bacteria of the human gut and above all are of significant importance to the food and health industries because of their use as probiotic supplements. *Lactobacillus* exhibits numerous mechanisms for adhesion to mucus, among which mucus-binding proteins (MUBs) are well characterized. The MUB proteins contain repeated functional domains (Mub repeats), which share homology with the Pfam-MucBP (mucin-binding protein) domains (PF06458). MUB and most MucBP domain-containing proteins exhibit a C-terminal sortase recognition motif (LPxTG) for covalent attachment to peptidoglycan, repeated regions with adhesion properties and an N-terminal region for the secretion of the protein. Mub repeats have been shown to adhere to pig gastric mucin and hen intestinal mucus [43]. Adhesion assays of MUB from *Lactobacillus reuteri* on mammalian tissue sections and mucus-secreting intestinal cell line demonstrated a binding of MUB to sialylated mucin glycans [44]. Adhesion was inhibited equivalently by fetuin and asialofetuin, as well as by mucus from different hosts, suggesting a weak or no host specificity for MUB binding to mucus components. Mub proteins were also shown to interact *in vitro* with a large repertoire of immunoglobulins [45].

Many other proteins are involved in the binding of lactobacilli to the gastrointestinal mucus [46]. These proteins include the elongation factor Tu whose expression is up-regulated in the presence of mucus [47–51] and heat-shock GroEL isolated from *Lactobacillus johnsonii* [52]. Slp-A, an S-layer protein in *Lactobacillus acidophilus*, has been proposed as a mucus-binding adhesin because slpA knockouts showed decreased adhesion capability [53]. Mucus adhesion-promoting protein (MapA) of *Lactobacillus fermentum* 104R [54], collagen-binding protein of *L. reuteri* NCIB 11951 [55] and mucus/mucin-binding protein (32-Mmubp) of *L. fermentum* BCS87 [56] were all identified as binding proteins to gastrointestinal mucus.

Both the Gram-negative and Gram-positive bacteria produce pili to assemble pili on their cell surface for twitching motility, biofilm formation or immunomodulation. *Lactobacillus rhamnosus* strains utilize their pili to adhere to and to colonize the intestinal mucus [57]. Pili are long and monomers covalently linked in a sortase-dependent manner: SpaA, SpaB and SpaC. SpaC, covering the pilus length, is thought to play a pivotal role in the adhesion to mucus [57].

Bacteroidetes

The Bacteroidetes, a dominant bacterial phylum in the human gut, has evolved a sophisticated multi-protein system for sensing, binding and depolymerizing their target glycans [58]. Starch utilization systems (Sus) or Sus-like systems have been identified in every human gut Bacteroidetes genome sequenced to date. The Sus-like systems, although glycan-dependent, all include a Ton-B-dependent porin (SusC), a glycan-binding protein (SusD), glycoside hydrolases that initiate glycan degradation and a sensor/regulator that up-regulates expression of the locus when oligosaccharides are present. The SusD-like protein BT1043 of *Bacteroides thetaiotaomicron*

has been shown to target mucin O-glycans [59] and its crystal structure has been elucidated in the presence of LacNAc. Another type of SusD family protein, NanU, has been demonstrated to bind to Neu5Ac with high affinity in *Bacteroides fragilis* [60].

Bifidobacterium

Bifidobacterium is one of the major phyla of the gastrointestinal tract in infants and remains at significant levels in adults. In the last few decades, several strains of *Bifidobacterium*, such as *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. breve* and *B. bifidum*, were characterized by the capabilities for consuming human milk oligosaccharides [61]. Furthermore, *B. infantis* harbours oligosaccharide-binding proteins that favour host-derived glycans such as mucin O-glycans [62]. Half of the Family 1 of solute-binding proteins, part of ABC transporters, were identified to bind mucin O-glycans, human milk oligosaccharides and blood group antigens. *B. longum* subsp. *longum* isolated from human faeces encodes a putative fimbrial protein possessing five variants (A, B, C, D and E types) with significant variations in their affinity to porcine colonic mucins [63]. Other strains of *Bifidobacterium* of intestinal origin express cell surface adhesins, giving them the ability to adhere to the gastrointestinal tract, including transaldolase from *B. bifidum* [64], sortase-dependent pili of *B. bifidum* PRL2010 [65] and Tad pili in *B. breve* [66].

Helicobacter pylori adhesins

Until 1984 and the discovery of *Campylobacter pyloridis*, further baptized *Helicobacter pylori*, the stomach was seen as a sterile organ, devoid of microbiota due to its acid production [67]. Indeed, the microbial load in the stomach is $10\text{--}10^3$ CFU bacteria/ml gastric content, many orders of magnitude below the load in the colon ($10^{10}\text{--}10^{12}$ CFU/ml) [68,69]. Other bacterial species such as *Veillonella*, *Lactobacillus* and *Clostridium* have been found in gastric juice; however, these bacteria may just be transient [70]. The main difference between transient bacteria and *H. pylori* is that they only establish small colonies for short periods of time, but are not able to colonize the gastric mucosa and to cross-talk with the host. The ability of *H. pylori* to reside in the stomach mucus results from the capacity of this bacteria to buffer its environment by increasing the pH from very acidic to milder conditions using an urease, but also from its propensity to bind glycan structures present on stomach mucins.

In healthy individuals, *H. pylori* binds to Le^b motifs present on the stomach mucin MUC5AC via the blood group antigen-binding adhesin (BabA) present on the bacteria [71,72]. BabA-mediated binding to MUC5AC is a crucial adhesion process for *H. pylori* and the expression of this adhesin is a virulence factor associated with increased risk for overt disease [71,73]. Whereas strong Le^b-binding strains of *H. pylori* possess the allele babA2, Le^b-non-binding strains of *H. pylori* usually possess a silent allele of babA gene sequence, babA1, which can be activated by recombination into the babB locus. Once at this second locus, a BabB/A chimeric adhesin is expressed that presents some Le^b-binding capacity thought lower than that of Bab2 [74]. These changes in expression allow a fine modulation of adhesive properties during cycles of periodic activation and deactivation. The majority of *H. pylori* strains are generalists, which bind to Le^b as well as to ALe^b and Ble^b, in contrast with specialists that bind blood group O/Le^b exclusively [75]. Recent studies have investigated the molecular interactions involved in BabA binding to Le^b and blood group A and B antigens [76,77]. By using X-ray crystallography, it was shown that BabA J99 uses eight amino acids to bind to Le^b. Among them, N206, which interacts with Le^b Fuc4, is located in the hypervariable crown loop and may thus explain the differences seen in the affinity of the *H. pylori* strains towards Le^b glycan [76]. The X-ray structures of BabA adhesin alone and in complex with ABO/Le^b receptors revealed a three-pronged Le^b-binding site: the conserved cysteine-clasped loop 2 (CL2) is implicated in the recognition of the α 1,2-linked secretor fucose, whereas the diversification loop 2 (DL2) binds to the reducing end β 1,3-GlcNAc-Gal-Glc moiety of the type 1 chain oligosaccharide, and the DL1 region recognizes the peripheral GalNAc and Gal residues constituting, respectively, blood group A or B antigens [77]. CL2, DL1 and DL2 co-operate to modulate and orientate binding of BabA towards ABO/Le^b type 1 chain antigens.

Upon infection by *H. pylori*, the rate of sialylated mucins, scarce in a healthy stomach, increases significantly [34,78,79]. Glycans harboured on these mucins present the motif SLe^x, the specific ligand for the sialic acid-binding adhesin (SabA) [80]. This adhesin plays therefore a major role for the binding of the bacteria on diseased gastric tissues [81]. Structural studies on the extracellular region of SabA adhesin showed conserved amino acids among sabA orthologues and also between SabA and BabA, implicated in the highly selective ligand-binding site [82].

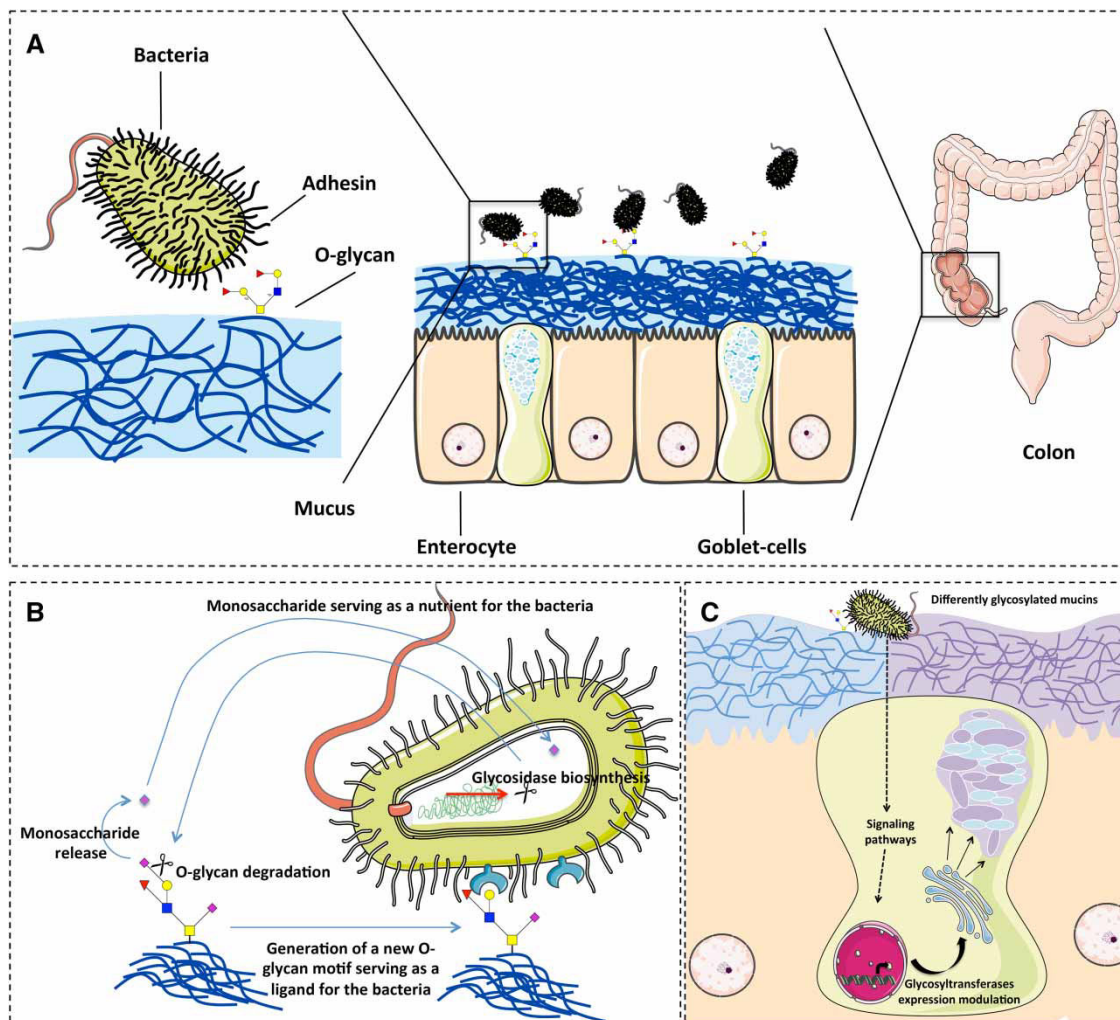


Figure 1. Interplay at the host mucosal surface between secreted mucins and bacteria.

(A) Bacteria can penetrate the mucus layer underlying the epithelium and can bind to mucins through adhesins and/or lectins recognizing O-glycan motifs. (B) Some bacteria may secrete glycosidases capable of releasing monosaccharides favouring its growth and/or generating motifs favouring its colonization process, leading to differently glycosylated mucins. (C) Adhesion of bacteria to mucins may lead to activation of several intracellular signalling pathways, leading to modulation of certain glycosyltransferase gene transcripts. The up-regulation of glycosyltransferases implicated in the biosynthesis of mucin O-glycans may result in a remodelling of secreted mucins, with neo- or expression of glycan antigens favouring bacterial attachment or limiting its binding.

The adherence-associated lipoprotein AB (AlpAB) has also been implicated in *H. pylori* binding to the gastric mucosa, but the ligand of this adhesin seems to be the laminin constituting the basement membrane [83]. We have recently shown that *H. pylori* binding may also be achieved through recognition of LacdiNAc-specific adhesin (LabA), recognizing specifically the glycan $\text{Fuc}\alpha 1\text{-2Gal}\beta 1\text{-3(GalNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-6)GalNAc}$ and being a plausible cause for the tropism of *H. pylori* for the gastric mucosa [84].

Conclusion

Bacteria have adopted various strategies to infect their targets or colonize their host, binding to mucins being a crucial step for many of them (Figure 1). This binding necessitates the presence, at the surface of the bacteria, of adhesins specific for glycan or peptidic motifs present on mucins. The host reacts to the infection with pathogenic bacteria by modulating the expression of either mucins themselves [85] and/or by a change in

mucin glycosylation [33]. In the same way, it has been shown that bacteria modulate the expression of their genes coding adhesins responsible for the binding to mucins in response to exposure to these glycoproteins [86]. The understanding of the interplay between bacteria and human epithelium requires the identification of new adhesins and their ligands on mucins as well as the study of the mechanisms of regulation reciprocally involved between these two partners. With advances in microarray technologies, O-glycan microarrays can provide a sensitive, high-throughput tool allowing the analysis of adhesin-mediated bacterial binding in a format compatible with limited sample amounts.

Abbreviations

BabA, blood group antigen-binding adhesin; CFA/I, colonization factor antigen I fimbriae; CL2, clasped loop 2; DL2, diversification loop 2; ETEC, enterotoxigenic *Escherichia coli*; Fuc, fucose; Gal, galactose; GalNAc, N-acetyl-galactosamine; GlcNAc, N-acetyl-glucosamine; MUB, mucus-binding proteins; NeuAc, N-acetyl-neuraminic acid; SabA, sialic acid-binding adhesin; Sus, starch utilization systems.

Funding

This work was supported by the Research Federation FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS; Unité mixte de Recherche CNRS/USTL 8576) and the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

Competing Interests

The Authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

References

- Sender, R., Fuchs, S. and Milo, R. (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.* **14**, e1002533 doi:10.1371/journal.pbio.1002533
- Ouwerkerk, J.P., de Vos, W.M. and Belzer, C. (2013) Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **27**, 25–38 doi:10.1016/j.bpg.2013.03.001
- Pullan, R.D., Thomas, G.A., Rhodes, M., Newcombe, R.G., Williams, G.T., Allen, A. et al. (1994) Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* **35**, 353–359 doi:10.1136/gut.35.3.353
- Johansson, M.E.V., Larsson, J.M.H. and Hansson, G.C. (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **108**(Suppl 1), 4659–4665 doi:10.1073/pnas.1006451107
- Juge, N. (2012) Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol.* **20**, 30–39 doi:10.1016/j.tim.2011.10.001
- Tailford, L.E., Crost, E.H., Kavanaugh, D. and Juge, N. (2015) Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front. Genet.* **6**, 81 doi:10.3389/fgene.2015.00081
- Andrianifahanana, M., Moniaux, N. and Batra, S.K. (2006) Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer* **1765**, 189–222 doi:10.1016/j.bbcan.2006.01.002
- De Bolós, C., Garrido, M. and Real, F.X. (1995) MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. *Gastroenterology* **109**, 723–734 doi:10.1016/0016-5085(95)90379-8
- Machado, J.C., Nogueira, A.M.M.F., Carneiro, F., Reis, C.A. and Sobrinho-Simões, M. (2000) Gastric carcinoma exhibits distinct types of cell differentiation: an immunohistochemical study of trefoil peptides (TFF1 and TFF2) and mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6). *J. Pathol.* **190**, 437–443 doi:10.1002/(SICI)1096-9896(200003)190:4<437::AID-PATH547>3.0.CO;2-1
- Corfield, A.P., Carroll, D., Myerscough, N. and Probert, C.S. (2001) Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front. Biosci.* **6**, D1321–D1357 doi:10.2741/A684
- Nordman, H., Davies, J.R., Lindell, G., de Bolós, C., Real, F. and Carlstedt, I. (2002) Gastric MUC5AC and MUC6 are large oligomeric mucins that differ in size, glycosylation and tissue distribution. *Biochem. J.* **364**, 191–200 doi:10.1042/bj3640191
- Van Klinken, B.J., Dekker, J., Van Gool, S.A., Van Marle, J., Büller, H.A. and 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–G878 PMID:9612268
- Lindén, S.K., Florin, T.H.J., McGuckin, M.A. and Gay, N. (2008) Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. *PLoS ONE* **3**, e3952 doi:10.1371/journal.pone.0003952
- Shibahara, H., Higashi, M., Koriyama, C., Yokoyama, S., Kitazono, I., Kurumiya, Y. et al. (2014) Pathobiological implications of mucin (MUC) expression in the outcome of small bowel cancer. *PLoS ONE* **9**, e86111 doi:10.1371/journal.pone.0086111
- Kumar, P., Kuhlmann, F.M., Bhullar, K., Yang, H., Vallance, B.A., Xia, L. et al. (2016) Dynamic interactions of a conserved enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesin with intestinal mucins govern epithelium engagement and toxin delivery. *Infect. Immun.* **84**, 3608–3617 doi:10.1128/IAI.00692-16
- Bennett, E.P., Mandel, U., Clausen, H., Gerken, T.A., Fritz, T.A. and Tabak, L.A. (2012) Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* **22**, 736–756 doi:10.1093/glycob/cwr182
- Schachter, H. and Brockhausen, I. (1992) The biosynthesis of serine (threonine)-N-acetylgalactosamine-linked carbohydrate moieties. In *Glycoconjugates* (Allen, H.J. and Kisailus, E.C. eds), pp. 263–332, Marcel Dekker, New York

- 18 Patsos, G. and Corfield, A.P. (2009) O-Glycosylation: structural diversity and functions. In *The Sugar Code. Fundamentals of Glycoscience* (Gabiuss, H.-J. ed.), pp. 111–137, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- 19 Rossez, Y., Maes, E., Lefebvre Darroman, T., Gosset, P., Ecobichon, C., Joncquel Chevalier Curt, M. et al. (2012) Almost all human gastric mucin O-glycans harbor blood group A, B or H antigens and are potential binding sites for *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* **22**, 1193–1206 doi:10.1093/glycob/cws072
- 20 Capon, C., Maes, E., Michalski, J.-C., Leffler, H. and Kim, Y.S. (2001) Sd(a)-antigen-like structures carried on core 3 are prominent features of glycans from the mucin of normal human descending colon. *Biochem. J.* **358**, 657–664 doi:10.1042/bj3580657
- 21 Robbe, C., Capon, C., Maes, E., Rousset, M., Zweibaum, A., Zanetta, J.-P. et al. (2003) Evidence of regio-specific glycosylation in human intestinal mucins: presence of an acidic gradient along the intestinal tract. *J. Biol. Chem.* **278**, 46337–46348 doi:10.1074/jbc.M302529200
- 22 Robbe, C., Capon, C., Coddeville, B. and Michalski, J.-C. (2004) Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochem. J.* **384**, 307–316 doi:10.1042/BJ20040605
- 23 Robbe-Masselot, C., Maes, E., Rousset, M., Michalski, J.-C. and Capon, C. (2009) Glycosylation of human fetal mucins: a similar repertoire of O-glycans along the intestinal tract. *Glycoconj. J.* **26**, 397–413 doi:10.1007/s10719-008-9186-9
- 24 Fu, J., Wei, B., Wen, T., Johansson, M.E., Liu, X., Bradford, E. et al. (2011) Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 1657–1666 doi:10.1172/JCI45538
- 25 Staubach, F., Künzel, S., Baines, A.C., Yee, A., McGee, B.M., Bäckhed, F. et al. (2012) Expression of the blood-group-related glycosyltransferase B4galnt2 influences the intestinal microbiota in mice. *ISME J.* **6**, 1345–1355 doi:10.1038/ismej.2011.204
- 26 Kashyap, P.C., Marcobal, A., Ursell, L.K., Smits, S.A., Sonnenburg, E.D., Costello, E.K. et al. (2013) Genetically dictated change in host mucus carbohydrate landscape exerts a diet-dependent effect on the gut microbiota. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 17059–17064 doi:10.1073/pnas.1306070110
- 27 Rausch, P., Steck, N., Suwandi, A., Seidel, J.A., Künzel, S., Bhullar, K. et al. (2015) Expression of the blood-group-related gene B4galnt2 alters susceptibility to *Salmonella* infection. *PLoS Pathog.* **11**, e1005008 doi:10.1371/journal.ppat.1005008
- 28 Bergstrom, K., Fu, J., Johansson, M.E.V., Liu, X., Gao, N., Wu, Q. et al. (2017) Core 1- and 3-derived O-glycans collectively maintain the colonic mucus barrier and protect against spontaneous colitis in mice. *Mucosal Immunol.* **10**, 91–103 doi:10.1038/mi.2016.45
- 29 Rausch, P., Rehman, A., Künzel, S., Häslar, R., Ott, S.J., Schreiber, S. et al. (2011) Colonic mucosa-associated microbiota is influenced by an interaction of Crohn disease and FUT2 (Secretor) genotype. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 19030–19035 doi:10.1073/pnas.1106408108
- 30 Etzold, S. and Juge, N. (2014) Structural insights into bacterial recognition of intestinal mucins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **28**, 23–31 doi:10.1016/j.sbi.2014.07.002
- 31 Gubareva, L.V., Kaiser, L. and Hayden, F.G. (2000) Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* **355**, 827–835 doi:10.1016/S0140-6736(99)11433-8
- 32 Kansal, R., Rasko, D.A., Sahl, J.W., Munson, G.P., Roy, K., Luo, Q. et al. (2013) Transcriptional modulation of enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence genes in response to epithelial cell interactions. *Infect. Immun.* **81**, 259–270 doi:10.1128/IAI.00919-12
- 33 Sperandio, B., Fischer, N., Joncquel Chevalier-Curt, M., Rossez, Y., Roux, P., Robbe Masselot, C. et al. (2013) Virulent *Shigella flexneri* affects secretion, expression, and glycosylation of gel-forming mucins in mucus-producing cells. *Infect. Immun.* **81**, 3632–3643 doi:10.1128/IAI.00551-13
- 34 Joncquel Chevalier Curt, M., Lecoite, K., Mihalache, A., Rossez, Y., Gosset, P., Léonard, R. et al. (2015) Alteration or adaptation, the two roads for human gastric mucin glycosylation infected by *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* **25**, 617–631 doi:10.1093/glycob/cwv004
- 35 Nita-Lazar, M., Banerjee, A., Feng, C., Amin, M.N., Frieman, M.B., Chen, W.H. et al. (2015) Desialylation of airway epithelial cells during influenza virus infection enhances pneumococcal adhesion via galectin binding. *Mol. Immunol.* **65**, 1–16 doi:10.1016/j.molimm.2014.12.010
- 36 Clements, A., Young, J.C., Constantinou, N. and Frankel, G. (2012) Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* **3**, 71–87 doi:10.4161/gmic.19182
- 37 Lonardi, E., Moonens, K., Buts, L., de Boer, A.R., Olsson, J.D., Weiss, M.S. et al. (2013) Structural sampling of glycan interaction profiles reveals mucosal receptors for fimbrial adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biology* **2**, 894–917 doi:10.3390/biology2030894
- 38 Moonens, K., Bouckaert, J., Coddens, A., Tran, T., Panjikar, S., De Kerpel, M. et al. (2012) Structural insight in histo-blood group binding by the F18 fimbrial adhesin FedF. *Mol. Microbiol.* **86**, 82–95 doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08174.x
- 39 Li, Y.-F., Poole, S., Rasulo, F., McVeigh, A.L., Savarino, S.J. and Xia, D. (2007) A receptor-binding site as revealed by the crystal structure of CfaE, the colonization factor antigen I fimbrial adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **282**, 23970–23980 doi:10.1074/jbc.M700921200
- 40 Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S. and Ramphal, R. (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect. Immun.* **66**, 1000–1007 PMID:9488388
- 41 Tasteyre, A., Barc, M.-C., Collignon, A., Boureau, H. and Karjalainen, T. (2001) Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect. Immun.* **69**, 7937–7940 doi:10.1128/IAI.69.12.7937-7940.2001
- 42 Erdem, A.L., Avelino, F., Xicohtencatl-Cortes, J. and Girón, J.A. (2007) Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 7426–7435 doi:10.1128/JB.00464-07
- 43 Roos, S. and Jonsson, H. (2002) A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology* **148**, 433–442 doi:10.1099/00221287-148-2-433
- 44 Etzold, S., Kober, O.I., Mackenzie, D.A., Tailford, L.E., Gunning, A.P., Walshaw, J. et al. (2014) Structural basis for adaptation of lactobacilli to gastrointestinal mucus. *Environ. Microbiol.* **16**, 888–903 doi:10.1111/1462-2920.12377
- 45 Mackenzie, D.A., Tailford, L.E., Hemmings, A.M. and Juge, N. (2009) Crystal structure of a mucus-binding protein repeat reveals an unexpected functional immunoglobulin binding activity. *J. Biol. Chem.* **284**, 32444–32453 doi:10.1074/jbc.M109.040907
- 46 Van Tassel, M.L. and Miller, M.J. (2011) Lactobacillus adhesion to mucus. *Nutrients* **3**, 613–636 doi:10.3390/nu3050613
- 47 Jacobson, G.R. and Rosenbusch, J.P. (1976) Abundance and membrane association of elongation factor Tu in, *E. coli*. *Nature* **261**, 23–26 doi:10.1038/261023a0
- 48 Dallo, S.F., Kannan, T.R., Blaylock, M.W. and Baseman, J.B. (2002) Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **46**, 1041–1051 doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03207.x

- 49 Granato, D., Bergonzelli, G.E., Pridmore, R.D., Marvin, L., Rouvet, M. and Corthésy-Theulaz, I.E. (2004) Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect. Immun.* **72**, 2160–2169 doi:10.1128/IAI.72.4.2160-2169.2004
- 50 Nakamura, J., Ito, D., Nagai, K., Umehara, Y., Hamachi, M. and Kumagai, C. (1997) Rapid and sensitive detection of hiuchi bacteria by amplification of hiuchi bacterial common antigen gene by PCR method and characterization of the antigen. *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 161–167 doi:10.1016/S0922-338X(97)83576-3
- 51 Ramiah, K., van Reenen, C.A. and Dicks, L.M.T. (2007) Expression of the mucus adhesion genes mub and MapA, adhesion-like factor EF-Tu and bacteriocin gene plaA of *Lactobacillus plantarum* 423, monitored with real-time PC. *Int. J. Food Microbiol.* **116**, 405–409 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.011
- 52 Bergonzelli, G.E., Granato, D., Pridmore, R.D., Marvin-Guy, L.F., Donnicola, D. and Corthésy-Theulaz, I.E. (2006) GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **74**, 425–434 doi:10.1128/IAI.74.1.425-434.2006
- 53 Buck, B.L., Altermann, E., Svingerud, T. and Klaenhammer, T.R. (2005) Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8344–8351 doi:10.1128/AEM.71.12.8344-8351.2005
- 54 Rojas, M., Ascencio, F. and Conway, P.L. (2002) Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2330–2336 doi:10.1128/AEM.68.5.2330-2336.2002
- 55 Roos, S., Aleljung, P., Robert, N., Lee, B., Wadström, T., Lindberg, M. et al. (1996) A collagen binding protein from *Lactobacillus reuteri* is part of an ABC transporter system? *FEMS Microbiol. Lett.* **144**, 33–38 doi:10.1111/j.1574-6968.1996.tb08505.x
- 56 Macías-Rodríguez, M.E., Zagorec, M., Ascencio, F., Vázquez-Juárez, R. and Rojas, M. (2009) *Lactobacillus fermentum* BCS87 expresses mucus- and mucin-binding proteins on the cell surface. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1866–1874 doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04368.x
- 57 Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., von Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P. et al. (2009) Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 17193–17198 doi:10.1073/pnas.0908876106
- 58 Bolam, D.N. and Koropatkin, N.M. (2012) Glycan recognition by the Bacteroidetes Sus-like systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 563–569 doi:10.1016/j.sbi.2012.06.006
- 59 Koropatkin, N., Martens, E.C., Gordon, J.I. and Smith, T.J. (2009) Structure of a SusD homologue, BT1043, involved in mucin *O*-glycan utilization in a prominent human gut symbiont. *Biochemistry* **48**, 1532–1542 doi:10.1021/bi801942a
- 60 Phansopa, C., Roy, S., Rafferty, J.B., Douglas, C.W., Pandhal, J., Wright, P.C. et al. (2014) Structural and functional characterization of NanU, a novel high-affinity sialic acid-inducible binding protein of oral and gut-dwelling Bacteroidetes species. *Biochem. J.* **458**, 499–511 doi:10.1042/BJ20131415
- 61 Ward, R.E., Niño-nuevo, M., Mills, D.A., Lebrilla, C.B. and German, J.B. (2007) In vitro fermentability of human milk oligosaccharides by several strains of bifidobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 1398–1405 doi:10.1002/mnfr.200700150
- 62 Garrido, D., Kim, J.H., German, J.B., Raybould, H.E., Mills, D.A. and Uversky, V. (2011) Oligosaccharide binding proteins from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveal a preference for host glycans. *PLoS ONE* **6**, e17315 doi:10.1371/journal.pone.0017315
- 63 Suzuki, K., Nishiyama, K., Miyajima, H., Osawa, R., Yamamoto, Y. and Mukai, T. (2016) Adhesion properties of a putative polymorphic fimbrial subunit protein from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. *Biosci. Microbiota Food Health* **35**, 19–27 doi:10.12938/bmfh.2015-015
- 64 González-Rodríguez, I., Sánchez, B., Ruiz, L., Turróni, F., Ventura, M., Ruas-Madiedo, P. et al. (2012) Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3992–3998 doi:10.1128/AEM.08024-11
- 65 Turróni, F., Serafini, F., Foroni, E., Duranti, S., O’Connell Motherway, M., Taverniti, V. et al. (2013) Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium-host interactions. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 11151–11156 doi:10.1073/pnas.1303897110
- 66 O’Connell Motherway, M., Zomer, A., Leahy, S.C., Reunanen, J., Bottacini, F., Claesson, M.J. et al. (2011) Functional genome analysis of *Bifidobacterium breve* UCC2003 reveals type IVb tight adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 11217–11222 doi:10.1073/pnas.1105380108
- 67 Marshall, B.J. and Warren, J.R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **323**, 1311–1315 doi:10.1016/S0140-6736(84)91816-6
- 68 Berg, R.D. (1996) The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* **4**, 430–435 doi:10.1016/0966-842X(96)10057-3
- 69 O’Hara, A.M. and Shanahan, F. (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* **7**, 688–693 doi:10.1038/sj.embor.7400731
- 70 Zilberstein, B., Quintanilha, A.G., Santos, M.A., Pajeccki, D., Moura, E.G. Alves, P.R. et al. (2007) Digestive tract microbiota in healthy volunteers. *Clinics* **62**, 47–54 doi:10.1590/S1807-59322007000100008
- 71 Lindén, S., Nordman, H., Hedenbro, J., Hurtig, M., Borén, T. and Carlstedt, I. (2002) Strain- and blood group-dependent binding of *Helicobacter pylori* to human gastric MUC5AC glycoforms. *Gastroenterology* **123**, 1923–1930 doi:10.1053/gast.2002.37076
- 72 Van de Bovenkamp, J.H., Mahdavi, J., Korteland-Van Male, A.M., Büller, H.A., Einerhand, A.W.C., Borén, T. et al. (2003) The MUC5AC glycoprotein is the primary receptor for *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Helicobacter* **8**, 521–532 doi:10.1046/j.1523-5378.2003.00173.x
- 73 Fujimoto, S., Olaniyi Ojo, O., Arqvist, A., Wu, J.Y., Odenbreit, S., Haas, R. et al. (2007) *Helicobacter pylori* BabA expression, gastric mucosal injury, and clinical outcome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 49–58 doi:10.1016/j.cgh.2006.09.015
- 74 Bäckström, A., Lundberg, C., Kersulyte, D., Berg, D.E., Borén, T. and Arqvist, A. (2004) Metastability of *Helicobacter pylori* bab adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 16923–16928 doi:10.1073/pnas.0404817101
- 75 Aspholm-Hurtig, M., Dallide, G., Lahmann, M., Kalia, A., Ilver, D., Roche, N. et al. (2004) Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. *Science* **305**, 519–522 doi:10.1126/science.1098801
- 76 Hage, N., Howard, T., Phillips, C., Brassington, C., Overman, R., Debreczeni, J. et al. (2015) Structural basis of Lewis(b) antigen binding by the *Helicobacter pylori* adhesin BabA. *Sci. Adv.* **1**, e1500315 doi:10.1126/sciadv.1500315
- 77 Sweeney, E.G. and Guillemin, K.H. (2016) Pylori’s BabA embraces change. *Cell Host Microbe* **19**, 5–7 doi:10.1016/j.chom.2015.12.013
- 78 Marcos, N.T., Magalhães, A., Ferreira, B., Oliveira, M.J., Carvalho, A.S., Mendes, N. et al. (2008) *Helicobacter pylori* induces beta3GnT5 in human gastric cell lines, modulating expression of the SabA ligand sialyl-Lewis x. *J. Clin. Invest.* **118**, 2325–2336 doi:10.1172/JCI34324

- 79 Magalhães, A., Marcos-Pinto, R., Nairn, A.V., dela Rosa, M., Ferreira, R.M., Junqueira-Neto, S. et al. (2015) *Helicobacter pylori* chronic infection and mucosal inflammation switches the human gastric glycosylation pathways. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* **1852**, 1928–1939 doi:10.1016/j.bbadis.2015.07.001
- 80 Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., Olfat, F.O., Forsberg, L., Roche, N. et al. (2002) *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**, 573–578 doi:10.1126/science.1069076
- 81 Ota, H., Nakayama, J., Momose, M., Hayama, M., Akamatsu, T., Katsuyama, T. et al. (1998) *Helicobacter pylori* infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins. *Virchows Arch.* **433**, 419–426 doi:10.1007/s004280050269
- 82 Pang, S.S., Nguyen, S.T., Perry, A.J., Day, C.J., Panjikar, S., Tiralongo, J. et al. (2014) The three-dimensional structure of the extracellular adhesion domain of the sialic acid-binding adhesin SabA from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **289**, 6332–6340 doi:10.1074/jbc.M113.513135
- 83 Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Faller, G. and Haas, R. (1999) Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol. Microbiol.* **31**, 1537–1548 doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01300.x
- 84 Rossez, Y., Gosset, P., Boneca, I.G., Magalhães, A., Ecobichon, C., Reis, C.A. et al. (2014) The lacdiNac-specific adhesin LabA mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *J. Infect. Dis.* **210**, 1286–1295 doi:10.1093/infdis/jiu239
- 85 Xue, Y., Zhang, H., Wang, H., Hu, J., Du, M. and Zhu, M.-J. (2014) Host inflammatory response inhibits *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to gut epithelium through augmentation of mucin expression. *Infect. Immun.* **82**, 1921–1930 doi:10.1128/IAI.01589-13
- 86 Dhanani, A.S. and Bagchi, T. (2013) The expression of adhesin EF-Tu in response to mucin and its role in *Lactobacillus* adhesion and competitive inhibition of enteropathogens to mucin. *J. Appl. Microbiol.* **115**, 546–554 doi:10.1111/jam.12249