

UNIVERSITE DE LILLE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE - SANTE DE LILLE

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Discipline : Biologie - Santé

**Apport de la transgénèse murine dans l'étude des mucines
gélifiantes : intérêt dans la compréhension de la physiologie de
l'épithélium nasal et la physiopathologie de l'atteinte
intestinale consécutive à une chimiothérapie.**

présentée par

Salah-Eddine AMINI

soutenue publiquement le

02 Décembre 2019

devant le jury composé de :

Docteur Rachel MARION-LETELLIER	Rapporteur
Professeur Jean-Marie HEYDEL	Rapporteur
Docteur Valérie GOUYER	Examineur
Professeur David SEGUY	Directeur de thèse



A ma Chère Maman Hanna qui m'a transmis la valeur de l'Education
A mon Cher défunt Papa Aissa qui m'a transmis la valeur de l'Effort
A mon Epouse Chérie Sarra qui m'a transmis la valeur de l'Amour
A mon Fils Chéri Aissa Gabriel qui m'a appris la valeur de l'Authenticité

Salah El-Kalich

REMERCIEMENTS

Je remercie Madame le Docteur Rachel Marion-Letellier et Monsieur le Professeur Jean-Marie Heydel de me faire cette honneur d’être les rapporteurs de ma thèse.

Je tiens à remercier profondément mon directeur de thèse Monsieur le Professeur David Séguy. Vous m’avez accordé une opportunité prodigieuse, vous m’avez fait pleinement confiance et vous m’avez amplement encadré. Vous êtes un directeur sans pareil, tant humainement que professionnellement. Travailler sous votre direction est un privilège.

Je remercie également Madame le Docteur Valérie Gouyer et Monsieur le Docteur Jean-Luc Desseyn. Votre soutien m’était précieux, votre disponibilité m’était appréciable et votre professionnalisme m’était vénérable. Travailler avec vous est un avantage.

Je remercie notre directeur d’équipe Monsieur le Professeur Frédéric Gottrand, de m’avoir grandement ouvert les portes du laboratoire pour mener mes recherches dans des conditions prospères. Travailler au sein de votre équipe est un honneur.

Je remercie autant Madame le Docteur Silvia Speca et Monsieur le Docteur Bertrand Meresse. Votre collaboration, votre épaullement et surtout votre disposition sont considérables. Travailler avec vous est un plaisir.

Je remercie l'ensemble des membres du LIRIC, en particulier Madame le Docteur Virginie Chameroy, Madame Bernadette Leu, Madame le Docteur Delphine Ley, ainsi que mes autres coéquipiers Fatima, Ségolène, Mylène, Eloïse, Edwina, Bastien, Thomas, Madjid, François, Guillaume, Mohamed et Mathieu. Travailler en votre compagnie est agréable.

Mes remerciements ne pourront être complet sans adresser mes remerciements chaleureux et sincères à l'ensemble de mes amis et les membres de ma grande et aimable famille notamment Azzak Faffa, Dadi Bakir, El-Hadja, Khalti Louiza et Ami Abdellah. La vie à vos côtés est une merveille.

RESUME

Le mucus est un gel viscoélastique complexe. Il est essentiel au maintien de l'intégrité des muqueuses et de leurs fonctions. Sa fraction organique est représentée principalement par les mucines gélifiantes (GFM). Seuls les modèles animaux génétiquement modifiés par recombinaison permettent l'étude du rôle des GFM en conditions physiologiques ou pathologiques dans un système parfaitement intégré.

Nous avons utilisé ce type de modèles de souris transgéniques pour : 1- préciser l'expression et la localisation respective des deux principales GFM des cavités nasales, Muc5ac et Muc5b, à partir de souris Muc5b-GFP et Muc5b -/- ; 2- étudier les conséquences d'une chimiothérapie d'induction sur la barrière intestinale iléale et évaluer le bénéfice d'un mucus renforcé dans ce contexte grâce à des souris Tg222.

Nos résultats montrent : 1-qu'en condition physiologique, Muc5ac qui est préférentiellement fucosylée, est produite dans l'épithélium respiratoire, alors que Muc5b qui est préférentiellement sialylée, est produite par les glandes de Bowman dans l'épithélium olfactif; 2- qu'après une chimiothérapie, un mucus renforcé ne permet pas de réduire les dommages initiaux de l'épithélium iléal qui sont aggravés par la présence du microbiote, mais qu'ensuite c'est l'interaction entre ce microbiote et le mucus qui permet une meilleure régénération de cet épithélium.

Ces résultats soulignent le rôle essentiel qu'a le mucus dans l'interaction entre le microbiote et l'épithélium des muqueuses. Ils offrent des perspectives intéressantes de recherche dans la compréhension de l'atteinte de l'olfaction et l'atteinte intestinale chez les patients qui reçoivent une chimiothérapie.

Mots Clefs : Mucus ; Mucine gélifiante ; Cavité nasale ; Barrière intestinale ; Chimiothérapie ; Microbiote.

**Contribution of murine transgenesis in gel forming mucin study:
interest in understanding the physiology of the nasal epithelium
and the pathophysiology of intestinal damage following
chemotherapy**

Mucus is a complex viscoelastic gel. It is essential for maintaining the mucosa integrity and their functions. Its organic fraction is mainly represented by gel forming mucins (GFM). Only animal models genetically modified by recombination allow the study of their roles under physiological or pathological conditions in a perfectly an integrated system.

We used this type of transgenic mouse model: 1- to specify the expression and localization of the two main nasal cavity GFM, Muc5ac and Muc5b, from Muc5b-GFP and Muc5b $-/-$ mice; 2- to study the consequences of induction chemotherapy on the ileal intestinal epithelium and to evaluate the benefit of a strengthen mucus from Tg222 mice in this context.

Our results show: 1- under physiological conditions, Muc5ac which is preferentially fucosylated, is produced in the respiratory epithelium, whereas Muc5b, which is preferentially sialylated, is produced by the Bowman glands in the olfactory epithelium; 2- after chemotherapy, a strengthen mucus does not reduce the initial damage of the ileal epithelium which are aggravated by the presence of the microbiota, but then it is the interaction between this microbiota and mucus that allows better regeneration of this epithelium.

These results highlight the essential role mucus plays in the interaction between the microbiota and the mucosal epithelium. They offer interesting perspectives of research in the understanding of the impairment of olfaction and intestinal damage in patients receiving chemotherapy.

Key Words: Mucus; Forming-gel mucine; Nasal cavity; Intestinal barrier; Chemotherapy; Microbiota.

COMMUNICATIONS

- ✚ Muc5b is mainly expressed and sialylated in the nasal olfactory epithelium whereas Muc5ac is exclusively expressed and fucosylated in the nasal respiratory epithelium. Amini SE et al, *Histochemistry and Cell Biology*, 2019

- ✚ Effect of hyper-protein diet on strengthening the intestinal barrier in acute graft-versus-host disease. Research grant application of 50 000 € by Nutricia Research Foundation. Obtained, 2018.

- ✚ The nuclear bile acid receptor FXR is a PKA- and FOXA2-sensitive activator of fasting hepatic gluconeogenesis. Ploton M et al, *Journal of Hepatology*, 2018. Acknowledgements.

- ✚ Lauréate of « Prix Nutricia » 15 000 € at « Journées Francophones de Nutrition ». Nice, 2018.

- ✚ The role of the nuclear Farnesoid X Receptor (FXR) in the hypothalamic response to insulin. Amini SE et al, French Poster, *SFD Congress*, 2017 ; English Poster, *Journée André Verbert*, 2017

- ✚ Vice-Major of Promotion at the Doctoral Scholarship Competition, 2015.

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
RESUME	6
COMMUNICATIONS.....	10
TABLES DES MATIERES	12
FIGURES ET TABLEAUX.....	16
I. INTRODUCTION	19
I.1. Mucus.....	20
I.2. Les mucines gélifiantes (GFM).....	20
I.2.1. Apomucine.....	20
I.2.2. Région centrale	21
I.2.3. Régions amino- et carboxy-terminales	22
I.3. Profil d'expression	27
I.4. Sécrétion	29
I.5. Autres composants du mucus	30
I.5.1. Peptides en trèfle	30
I.5.2. Transglutaminases.....	31
I.5.3. Protéines de liaison aux fragment Fc des IgG	31
I.5.4. Autres protéines	32
I.5.5. Lipides	32
I.5.6. Électrolytes	33
I.6. Fonctions du mucus	34
I.7. Modèle murin de mucines Gélifiantes transgéniques	34
I.7.1. Souris mucine 2 déficiente (Muc2 -/-).....	35
I.7.2. Souris mucine 2 transgénique (Tg222)	36
I.7.3. Souris mucine 5b déficiente (Muc5b -/-).....	38
I.7.4. Souris transgéniques Muc5b avec rapporteur GFP (Muc5b-GFP).....	39
I.7.5. Souris mucine 5ac déficiente (Muc5ac -/-)	40
I.7.6. Souris surexprimant la mucine 5ac (Muc5ac KI).....	41
II. ÉTUDE DES MUCINES GÉLIFIANTES DES CAVITÉS NASALES CHEZ LA SOURIS	42
II.1. Généralité	43
II.2. Contexte	45
II.3. Objectif	46
II.4. Matériels et méthodes.....	46
II.4.1. Souris.....	46

II.4.2.	Prélèvement.....	47
II.4.3.	Histologies et immunohistochimie	47
II.4.4.	Imagerie	48
II.5.	Résultats.....	50
II.5.1.	Expression des GFM dans les cavités nasales	50
II.5.2.	Modification des BG chez les souris Muc5b -/-	52
II.5.3.	Identification des lectines spécifiques de Muc5b et Muc5ac dans les cavités nasales	55
II.6.	Discussion.....	57
III.	ÉTUDE DE LA RÉGÉNÉRATION INTESTINALE APRÈS CHIMIOTHÉRAPIE CHEZ LA SOURIS	59
III.1.	Muqueuse intestinale	60
III.1.1.	Généralités	60
III.1.2.	Épithélium intestinal.....	60
III.1.3.	Mucus intestinal	63
III.1.4.	Microbiote intestinal	64
III.1.5.	Système immunitaire intestinal	65
III.2.	Chimiothérapie	68
III.2.1.	Intérêt de la citrulline plasmatique	70
III.3.	Contexte.....	71
III.4.	Objectif	73
III.5.	Matériels et méthodes.....	73
III.5.1.	Souris.....	73
III.5.2.	Chimiothérapie	73
III.5.3.	Antibiothérapie	74
III.5.4.	Prélèvements tissulaires.....	75
III.5.5.	Dosage de citrulline plasmatique	76
III.5.6.	Extraction ARN et biopuces	76
III.5.7.	Isolement des lymphocytes	77
III.5.8.	Cytométrie en flux	78
III.5.9.	Coloration histologique et immunohistochimie	79
III.5.10.	Imagerie	80
III.5.11.	Analyses statistiques.....	80
III.6.	Resultats.....	80

III.6.1.	Impact d'un mucus renforcé sur les dommages intestinaux induits par la chimiothérapie	80
III.6.2.	Impact du mucus renforcé sur les dommages intestinaux induits par la chimiothérapie après éradication du microbiote intestinal par les antibiotiques	92
III.6.3.	Impact de l'éradication du microbiote intestinal sur les dommages intestinaux induits par la chimiothérapie	98
III.7.	Conclusion	102
IV.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	104
V.	REFERENCES Bibliographiques	107
VI.	ANNEXES	125

FIGURES ET TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Structure des squelettes apomucines des mucines gélifiantes (GFM)	23
Figure 2	Étapes successives de biosynthèse des mucines gélifiantes (GFM)	26
Figure 3	Profil d'expression des mucines gélifiantes (GFM) chez l'homme	28
Figure 4	Construction des deux fragments d'ADN utilisés pour la génération de souris Tg222	38
Figure 5	Construction des locus Muc5b recombinés et des locus Muc5b-GFP	40
Figure 6	Lignée de souris Muc5b ^{-/-} , génotypage et dessin schématique de l'épithélium du nez de souris	49
Figure 7	Immunohistochimie de GFP et Muc5ac dans les sections coronales nasales proximales (T1) de souris Muc5b-GFP	51
Figure 8	Immunohistochimie de GFP et Muc5ac sur des coupes coronales nasales distales (T3) de souris Muc5b-GFP	53
Figure 9	Immunohistochimie de la GFP et de Muc5ac dans les coupes coronales nasales distales (T3) de souris Muc5b ^{-/-} .	54
Figure 10	Immunohistochimie avec multimarquage des lectines Muc5b et Muc5ac dans l'OE et l'ER de coupes coronales intermédiaire T2 de souris WT et Muc5b-GFP	56
Figure 11	Les complexes des protéines de jonctions dans la barrière intestinale	63
Figure 12	Schéma de l'épithélium intestinal et du système immunitaires GALT	68
Figure 13	Schéma du cycle du métabolisme de la citrulline	71
Figure 14	Schémas de la chronologie des soins des LAM	72
Figure 15	Représentation de la chronologie de chimiothérapie	74
Figure 16	Représentation de la chronologie de l'antibiothérapie	75
Figure 17	Concentration de citrulline plasmatique, hauteur des villosités et profondeur des cryptes à J+1, J+3 et J+5 après la chimiothérapie	82

Figure 18	Histologie iléale à J+3 après la chimiothérapie	83
Figure 19	Immunomarquage des jonctions serrées au niveau de l'iléon à J+3 après la chimiothérapie	84
Figure 20	Transcriptome iléal à J+2.5 après chimiothérapie	85
Tableau 1	Processus biologiques impactés par la chimiothérapie dans l'iléon lors de l'étude du transcriptome.	86
Figure 21	Système immunitaire de la muqueuse iléale à J+2.5 après la chimiothérapie	87,88
Figure 22	Histologie iléale sous antibiotiques à J+3 après la chimiothérapie	93
Figure 23	Immunomarquage de la prolifération et l'apoptose au niveau des iléons sous antibiotiques à J+3 après la chimiothérapie	94
Figure 24	Immunomarquage des jonctions serrées sous antibiotiques au niveau des iléons à J+3 après la chimiothérapie	95
Figure 25	Comparaison des citrulline plasmatiques, des hauteurs de villosités des profondeurs de cryptes et du rapport hauteur de villosité/profondeur de crypte à J+1, J+3 et J+5 après la chimiothérapie avec et sans antibiotiques	99
Figure 26	Comparaison des paramètres histologiques des iléons murins à j+3 après la chimiothérapie avec et sans antibiotiques	100

I. INTRODUCTION

I.1. MUCUS

Le mucus est un gel viscoélastique complexe composé d'eau à 95%, d'ions et d'éléments organiques. Il est essentiel au maintien de l'intégrité des muqueuses et constitue, grâce à son effet barrière la première ligne de défense innée contre les organismes pathogènes. Sa fraction organique est représentée principalement par les mucines (Demouveaux et al., 2018).

I.2. LES MUCINES GELIFIANTES (GFM)

Vingt-deux gènes de mucines ont été identifiés et peuvent être regroupés en deux grandes classes : les mucines membranaires ancrées à la membrane plasmique et les mucines sécrétées stockées dans des granules intracellulaires pour être libérées dans le milieu extracellulaire. Les 12 mucines membranaires assurent des fonctions d'adhésion cellulaire, d'interaction avec agents microbiens et de transduction du signal (Desseyn et al., 2008). Les 8 mucines sécrétées confèrent les propriétés viscoélastiques du mucus et se répartissent en deux sous-classes : les petites mucines solubles et les grandes mucines gélifiantes (GFM) (Hong et al., 2005). Nous nous concentrerons sur cette dernière sous-classe. La gélification du mucus (gel de mucus) est liée à la capacité des GFM à former des polymères et à leur caractère hydrophile lié à la glycosylation (chaînes glycanes) du squelette protéique de la mucine (apomucine).

I.2.1. Apomucine

Il existe une homologie structurelle importante entre les 5 gènes de GFM humaines (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC19) et leurs orthologues murins (Muc2, Muc5ac, Muc5b, Muc6 et Muc19). Quatre des cinq GFM sont situées sur le même locus

chromosomique (11p15.5 chez l'homme, 7F5 chez la souris) (Desseyn and Laine, 2003; Gosalia et al., 2013; Gouyer et al., 2015). Il semble que ces GFM aient évolué ensemble et dérivent d'un ancêtre commun avec le facteur de von Willebrand (vWF) (Ambort et al., 2011; Desseyn et al., 2000; Lang et al., 2007). MUC19 est quant à lui situé dans le locus 12q12 et 15F1 chez l'homme et la souris, respectivement (Chen et al., 2004). Les apomucines des GFM ont une structure en mosaïque organisée en trois régions distinctes, elles-mêmes subdivisées en différents domaines. Les régions amino- et carboxy-terminales représentent environ un tiers de la longueur de l'apomucine et la partie centrale les deux tiers restants (Figure 1).

1.2.2. Région centrale

Chez l'homme, la région centrale des apomucines est baptisée région STP du fait de sa richesse en résidus de sérine (S), thréonine (T) et proline (P) (Figure 1). Cette teneur élevée en sérine et en thréonine permet une O-glycosylation importante (Brunelli et al., 2007; Pigny et al., 1996). Cette région est organisée en motifs répétés en tandem ou « tandem repeat » (TR) de plusieurs kilobases. Le nombre de séquence TR de MUC2, MUC5AC et MUC6 est soumis au polymorphisme de type vNTR (variable number of tandem repeats) d'espèce (inter-individuel) et allélique (intra-individuel). Ce polymorphisme ne concerne pas MUC5B (Bansil and Turner, 2006; Desseyn, 2009; Guo et al., 2011). Le nombre de TR ayant augmenté avec l'évolution des espèces, il est moins important chez la souris (Desseyn et al., 2000; Desseyn and Laine, 2003). Le polymorphisme des TR n'a d'ailleurs pas été démontré chez la souris.

La région centrale de MUC2, MUC5AC et MUC5B est interrompue par des domaines de 110 acides aminés (AA) contenant 10 résidus de cystéine appelés domaines CYS qui sont très conservés dans l'évolution des mammifères (Figure 1) (Chen et al., 2004). Les

cystéines qu'ils contiennent semblent impliquées dans des liaisons de type pont disulfure qui confèrent à la protéine une structure secondaire globulaire et jouent un rôle important dans l'organisation des mucines en réseau (Bansil and Turner, 2006; Desseyn, 2009; Guo et al., 2011). Le nombre de copie de domaine CYS varie en fonction de la GFM considérée : 2 pour MUC2, 9 pour MUC5AC et 7 pour MUC5B. Les GFM des organismes inférieurs semblent contenir davantage de copies du domaine CYS (Ambort et al., 2011; Cao et al., 1999). La composition en AA principalement hydrophobes du domaine CYS suggère l'existence de liaisons mucine-mucine réversibles par des interactions hydrophobes (Bansil and Turner, 2018; Desseyn, 2009; Verdugo, 2012). Elle alterne avec le caractère hydrophile des TR (Guo et al., 2011). Le domaine CYS semble jouer un rôle crucial dans la régulation de l'architecture du mucus et par conséquent dans la protection vis à vis des particules exogènes et des agents pathogènes (Vinall et al., 2000).

1.2.3. Régions amino- et carboxy-terminales

Les apomucines ont une région amino-terminale composée de trois domaines D de type vWF (vWD1, vWD2 et vWD3) riches en cystéines et d'un domaine D tronqué (vWD') entre les domaines vWD2 et vWD3 (Figure 1). Les résidus de cystéine ont été hautement conservés au cours de l'évolution et la plupart sont impliqués dans des liaisons disulfures intradomaines qui participent à la structure secondaire globulaire (Desseyn, 2009). La région carboxy-terminale est soumise à une plus grande diversité structurale des GFM, mais elle contient toujours un domaine d'environ 80 AA de structure tridimensionnelle proche du TGF- β (transforming growth factor β) et de l'hCG (human chorionic gonadotropin) (Bansil and Turner, 2006). MUC2, MUC5AC et MUC5B possèdent un quatrième domaine vWD (D4), suivi des domaines vWF B (vWB) et C (vWC). MUC19 n'a

qu'un domaine vWC, et MUC6 n'a ni domaine vWB ni vWC, probablement à cause d'un exon perdu au cours de l'évolution (Figure 1) (Zhou et al., 2012).

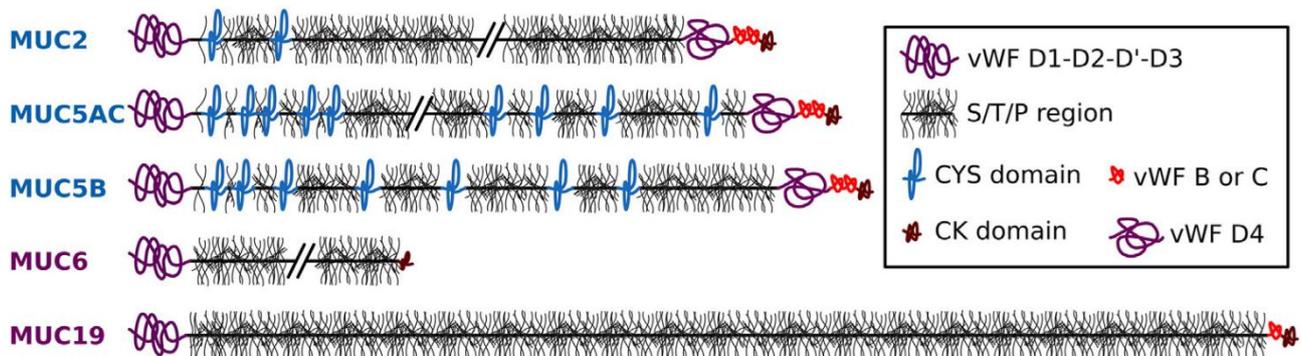


Figure 1. Structure des squelettes apomucines des mucines gélifiantes (GFM). (Demouveau et al., 2018)

1.2.3.1. Glycosylation

Les GFM sont des protéines fortement glycosylées, les glycanes représentant 80 à 90% de leur poids sec. Les GFM hébergent différents types de glycanes, dont les plus importants sont les O-glycanes (Figure 2) (Fujiwara et al., 2016; Perez-Vilar et al., 2004; Rossez et al., 2012).

1.2.3.1.1. O-glycosylation

Les O-glycanes forment des chaînes constituées de 6 à 18 monosaccharides et sont principalement concentrés dans les régions STP (Asker et al., 1998). La glycosylation s'effectue dans l'appareil de Golgi où la première étape consiste en la liaison d'un résidu de N-acétylgalactosamine (GalNAc) à un groupe hydroxyle libre de sérine et de thréonine. Cette étape est catalysée par une famille d'enzymes appelées polypeptide N-

acétylgalactosaminyltransférases (ppGalNAcT) qui comprend 20 isoformes chez l'homme. Chaque isoforme possède à la fois une lectine et un domaine catalytique, dont l'activité est spécifique du type d'O-glycosylation (Robbe et al., 2003). Après la fixation de GalNAc, d'autres monosaccharides sont ajoutés pour prolonger la chaîne glycanique et en former le noyau. L'élongation de cette structure nécessite la fixation de séquences répétées riches en lactosamine (Gal-GlcNAc) et se terminent par des séquences périphériques portant des déterminants de groupe sanguin formant un éventail (Andersch-Björkman et al., 2007; Cao et al., 2012; Revoredo et al., 2016). L'ensemble obtenu est d'une grande variabilité glycanique inter et intraspécifique (Corfield, 2015; Vliegenthart and Casset, 1998a). L'allongement des chaînes glycanes avec du fucose, de l'acide sialique ou du sulfate ajoute à leur complexité et leur diversité. Au sein d'un même épithélium, tel que celui de l'intestin, coexistent différentes glycoformes de GFM synthétisées par différentes cellules caliciformes (Gouyer et al., 2011). Cette O-glycosylation protège la muqueuse en bloquant l'accès des protéases au squelette de la mucine et en ralentissant la dégradation du mucus (Corfield, 2015).

I.2.3.1.2. C-mannosylation

La C-mannosylation est une modification co-traductionnelle comprenant un lien carbone-carbone entre l'anomère d'un α -D-mannose et l'indole C2 du premier tryptophane de la séquence consensus Trp-Xaa-Xaa-Trp, où Xaa peut être n'importe quel AA (Krieg et al., 1998; Vliegenthart and Casset, 1998a; Wang et al., 2009). Chaque domaine CYS des GFM possède une séquence consensus unique Trp-Xaa-Xaa-Trp à son extrémité amino-terminale. Cependant, il n'est pas encore démontré que le domaine CYS soit C-mannosylé (Ambort et al., 2011; Cao et al., 2012; Zanetta et al., 2004). La fonction principale de la C-mannosylation semble être de contrôler la qualité de la sécrétion, mais également de

stabiliser les structures protéiques et intervenir dans les voies de signalisation et l'activité enzymatique (Furmanek and Hofsteenge, 2000).

I.2.3.1.3. N-glycosylation

La N-glycosylation est réalisée co-traductionnellement par transfert d'oligosaccharides à haute teneur en mannose du dolichoyl-pyrophosphate- $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, au groupe amide à chaîne latérale des asparagines (N) dans le motif consensus NXT / S, où X peut être n'importe quel AA à l'exception de la proline. Ces sites sont situés dans les domaines riches en cystéines des régions amino- et carboxy-terminales des GFM (Bansil and Turner, 2018; Stanley et al., 2015). Les sites de N-glycosylation potentiels sont situés dans toutes Plusieurs études ont montré une implication directe des N-glycanes dans l'oligomérisation des GFM. L'inhibition totale de la N-glycosylation ralentit le processus d'oligomérisation des GFM mais ne l'inhibe pas complètement, suggérant son rôle secondaire dans l'oligomérisation (Asker et al., 1998; van Klinken et al., 1998; Vliegthart and Casset, 1998a).

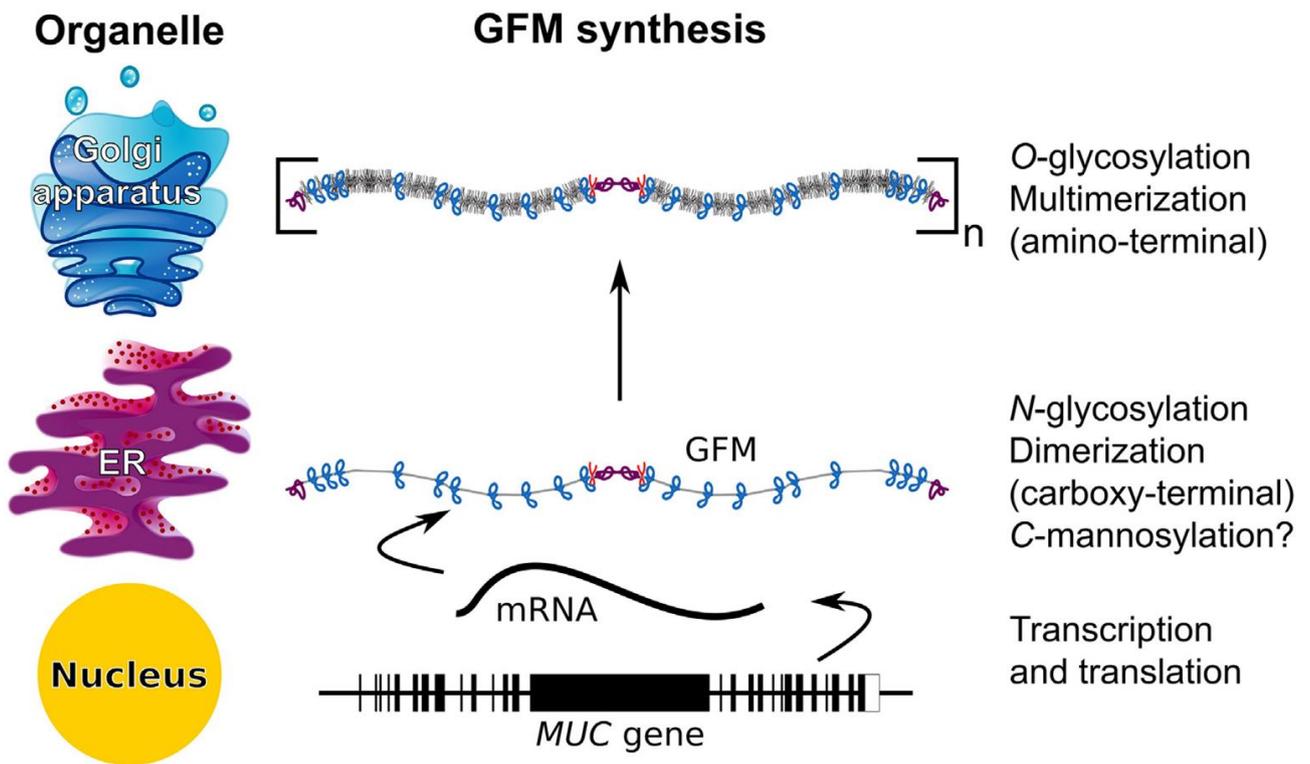


Figure 2. Étapes successives de biosynthèse des mucines gélifiantes (GFM) dans les différents compartiments subcellulaires. (Demouveau et al., 2018)

I.3. PROFIL D'EXPRESSION

Les GFM sont exprimées précocement au cours de l'embryogenèse et pourrait jouer un rôle dans le développement. Certaines n'ont qu'une expression transitoire suggérant leur possible rôle dans la signalisation (Chakraborty et al., 2011; Stanley et al., 2015; Teshima et al., 2011; Van Klinken et al., 1997). L'expression des GFM varie en fonction de l'épithélium, du stade du développement et de l'état physiopathologique (Chakraborty et al., 2011). La répartition des différents types de GFM entrant dans la composition du mucus dépend du type de muqueuse (Figure 3) (Buisine et al., 1999; Culp et al., 2015; Gipson, 2004; Ho et al., 2004; Hovenberg et al., 1996; Itoh et al., 1996; Kerschner et al., 2014; Kouznetsova et al., 2010; Martínez-Antón et al., 2006; Nordman et al., 2002; Reid and Harris, 1998; Russo et al., 2006; Shankar et al., 1995; Teshima et al., 2011; van Klinken et al., 1998). L'ensemble des tissus sécréteurs de mucus, à l'exception du jéjunum, de l'iléon et du côlon, produisent au moins deux GFM, dont au moins une avec des domaines CYS.

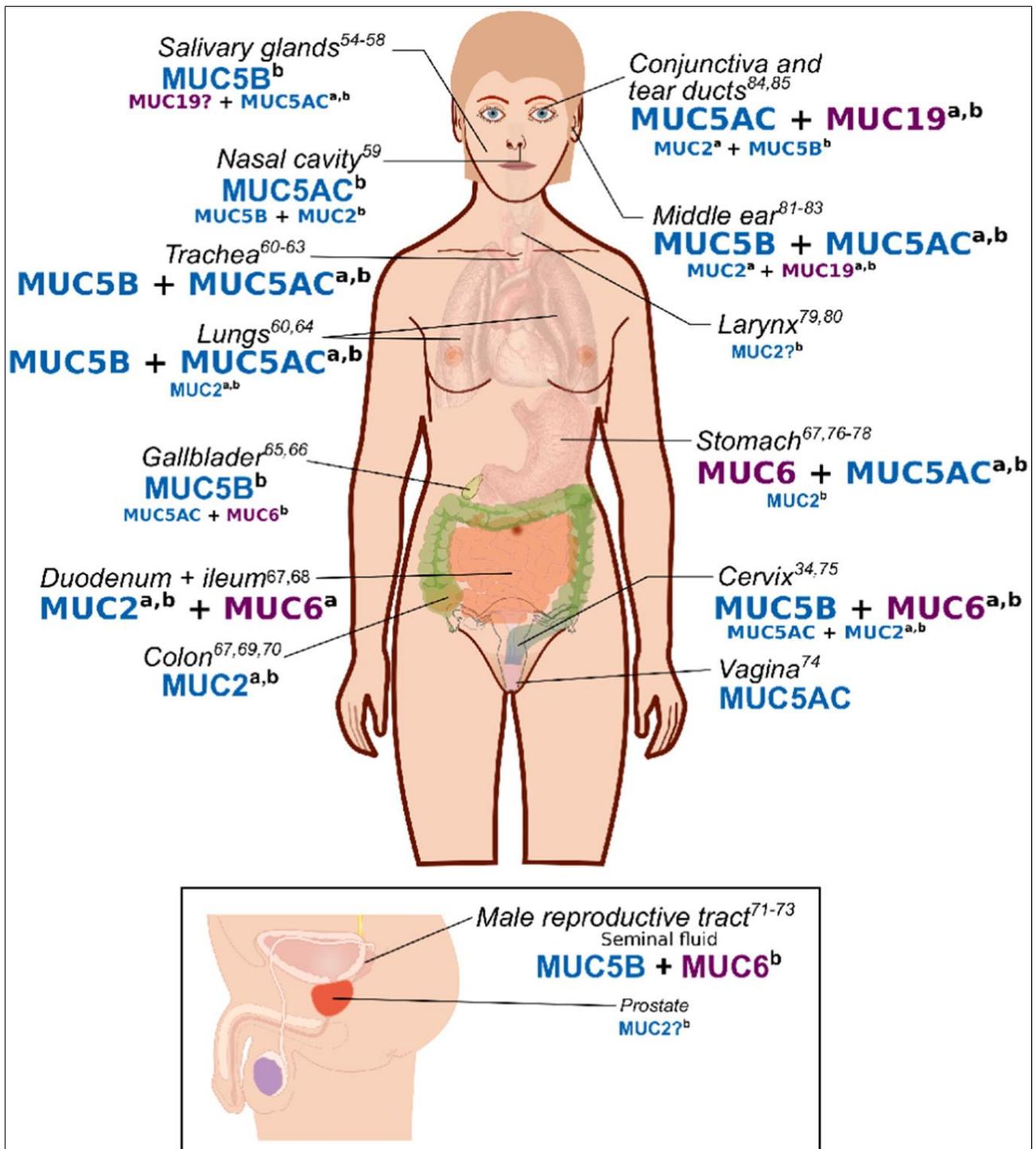


Figure 3. Profil d'expression des mucines gélyfiées (GFM) chez l'homme. Les GFM avec les domaines CYSD sont représentées en bleu et les deux autres GFM en violet. La taille des lettres de la GFM reflète le niveau d'expression de la GFM par rapport aux autres, rapporté au niveau de l'ARNm (a) et/ou au niveau protéique (b). (Demouveau et al., 2018)

I.4. SECRETION

Les polymères de GFM sont synthétisés par des cellules épithéliales spécialisées (cellules caliciformes, cellules des glandes sous-muqueuses et cellules séreuses). Les GFM sont stockés sous forme de granules dans la région sous-apicale de ces cellules. Le mécanisme de sécrétion des GFM implique la fusion entre la membrane cellulaire et les granules de sécrétion, sous l'action de différentes protéines du cytosquelette, chaperonnes et kinases (Demouveau et al., 2018). Les GFM acquièrent leur consistance en gel de mucus une fois qu'elles ont été sécrétées et qu'elles se sont hydratées à la surface de l'épithélium. Leur sécrétion est continue afin de permettre le renouvellement de la couche de mucus dégradée par les protéases endogènes et exogènes (Bansil and Turner, 2006). Leur sécrétion s'adapte également aux contraintes physico-chimiques et à la présence des bactéries afin de maintenir l'intégrité de l'épithélium sous-jacent (Bansil and Turner, 2018). Il existe une interaction symbiotique entre le microbiote et la O-glycosylation des GFM qui constitue une niche écologique permettant aux bactéries commensales de se lier, de métaboliser les glycanes, de se multiplier et de participer ainsi au renfort de l'effet de barrière (Corfield, 2015; Desseyn, 2009; Verdugo, 2012). La sélection des bactéries est effectuée sur la base de leur répertoire en enzymes hydrolytiques qui peuvent être des sialidases, des fucosidases, des α et β -N-acétylglucosaminidases, des β -galactosidases ou des α -N acétylgalactosaminidases en fonction de la souche bactérienne considérée (Post et al., 2013; Revoredo et al., 2016). L'utilisation des glycanes par le microbiote joue un rôle important en participant au renouvellement du mucus indispensable au maintien de l'homéostasie de la barrière muqueuse. La survenue d'une colite induite suivant l'administration d'antibiotique chez la souris illustre cette interaction entre le mucus et le microbiote (Bansil and Turner, 2018, 2006; Desseyn et al., 2000; Gouyer et al., 2015; Verdugo, 2012). L'alimentation

influence également l'interaction mucus-microbiote. Les acides gras à chaîne courte issus de la fermentation des fibres par le microbiote intestinal stimulent la sécrétion de GFM. A contrario, un régime pauvre en fibres augmente la consommation de glycanes des GFM par les bactéries.

1.5. AUTRES COMPOSANTS DU MUCUS

Outre les GFM, d'autres composants organiques et non organiques jouent un rôle autant important dans la formation et les propriétés du mucus, tels que les peptides antimicrobiens et les immunoglobulines.

1.5.1. Peptides en trèfle

La famille des peptides en trèfle (TFF) est composée de trois peptides (TFF1, TFF2 et TFF3) qui sont sécrétés par les cellules épithéliales et qui sont intimement associés au mucus des mammifères. Leur nom dérive de leur structure secondaire en trèfle formée de trois boucles par des liaisons disulfures (Thim, 1989). TFF1 et TFF2 sont principalement exprimés dans l'estomac, TFF1 et TFF3 dans le côlon. Il y a peu de TFF3 dans l'intestin grêle, la trachée, les poumons et les voies génitales (Hanisch et al., 2014; Thim et al., 2002). Les TFF peuvent s'associer aux GFM via des lectines (Lüdeking et al., 1998), des interactions ioniques ou hydrophobes (Muskett et al., 2003; Tomasetto et al., 2000; Xian et al., 1999). La fonction biologique exacte des TFF n'est pas bien comprise, mais ils pourraient jouer un rôle dans la protection et la réparation de la barrière intestinale (Aihara et al., 2017; Hoffmann and Hauser, 1993; Madsen et al., 2007; Ruchaud-Sparagano et al., 2004; Xian et al., 1999).

1.5.2. Transglutaminases

Les transglutaminases (TG) constituent une famille de neuf protéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles. Elles catalysent un large éventail de réactions chimiques, notamment l'assemblage supramoléculaire de protéines, par désamidation ou transamidation. L'expression de TG2 est ubiquitaire (Thomázy and Fésüs, 1989). Elle est principalement localisée dans le cytoplasme, mais peut être détectée à la surface de la membrane plasmique. Elle renforce la résistance à la protéolyse de MUC2 à laquelle elle se lie par des liaisons covalentes et pourrait participer à la polymérisation des GFM (Lorand and Graham, 2003; Recktenwald and Hansson, 2016).

1.5.3. Protéines de liaison aux fragment Fc des IgG

L'expression des protéines de liaison aux fragments Fc des IgG (FcGBP) est limitée à l'intestin, au placenta et aux voies génitales chez la femme. Le FcGBP partage de nombreuses caractéristiques communes avec les GFM. Il comprend une région centrale TR dont l'unité de base est homologue aux domaines D de MUC2, un pourcentage élevé de résidus de cystéine (8,1%), de sérine et de thréonine (12,3%) et une grande quantité d'acides aminés hydrophobe (Schwartz, 2014). Le FcGBP se lie à MUC2 de manière covalente. Il peut donc participer à de réticulation des GFM. FcGBP pourrait aussi former une liaison de type pont disulfure avec TFF3 (Harada et al., 1997). Il jouerait un rôle dans l'adaptation intestinale après une résection (Mahida and Cunliffe, 2004). Par sa liaison aux IgG, il constitue un élément important de l'immunité adaptative de la muqueuse.

1.5.4. Autres protéines

D'autres protéines jouent un rôle important dans les fonctions structurelles et protectrices du mucus. Près de 200 protéines provenant d'une transsudation trans-épithéliale ont été identifiées. Elles peuvent être classées en différents groupes fonctionnels comprenant des protéines défensives, des facteurs de croissance, des protéines structurelles et des glycoprotéines (Mahida and Cunliffe, 2004). Les protéines défensives comprennent les défensines alpha et bêta au pouvoir antimicrobien, le lysozyme ou muramidase capable d'hydrolyser l'acide muramique de la paroi cellulaire mucopolysaccharidiques des bactéries (limitant ainsi sa disponibilité pour la croissance bactérienne), les lactoferrines chélateurs de fer, les stathérines riches en proline et les histatines riches en histidine (Iontcheva et al., 2000). Les immunoglobulines, IgA et IgM sécrétoires sont actives contre divers agents pathogènes et augmentent la viscosité du mucus (Fahrbach et al., 2013). Les cytokines sont libérées par les cellules épithéliales ou immunes en réponse aux stimuli pathogènes. Les principaux facteurs de croissance présents dans le mucus sont le TGF- β (transforming growth factor beta), l'EGF- β (epidermal growth factor beta) et le HNF (hepatocyte nuclear factor) (Coffey et al., 1995). Ils participent au maintien, à la réparation et à la régulation de l'épithélium sous-jacent (Royle et al., 2003).

1.5.5. Lipides

Les données concernant la présence de lipides dans le mucus sont divergentes. Certaines études rapportent que seuls les acides gras sont liés de manière non covalente aux mucines, probablement par des forces hydrophobes (Kovács et al., 2012). D'autres décrivent des lipides relativement abondants dans les gels de mucus (1 à 2%). Plusieurs

types de lipides seraient présents, des lipides neutres principalement, des glycolipides et des phospholipides (Park and Robinson, 2008; Rantamäki et al., 2012). Leur rôle serait vraisemblablement de renforcer la barrière hydrophobe à la surface de la couche de mucus. Ils servent également de lubrifiant. dans les voies respiratoires proximales en facilitant la clairance mucociliaire (Girod et al., 1992a; Widdicombe, 1987). En cas de colite expérimentale, grâce à la présence de phosphatidylcholine qui facilite le passage du contenu intraluminal (Girod et al., 1992a; Hodges and Dartt, 2013; Lugea et al., 2000; Slomiany et al., 1988).

1.5.6. Électrolytes

Les électrolytes sont importants qualitativement. Leur répartition diffère en fonction des tissus et elle est déterminée par le type d'épithélium sécréteur sous-jacent (Bansil and Turner, 2018; Cao et al., 1999). Ces différences permettent de répondre aux contraintes environnementales des organes concernés. Les électrolytes (NaCl et de KCl, NaHCO₃, P, Mg et Ca) sont pour la plupart du temps présents à des concentrations isotoniques. Certains organes modifient la composition ionique du mucus, comme l'estomac qui sécrète de grandes quantités d'acide chlorhydrique (HCl), alors que sa concentration en potassium est diminuée. Ces modifications de la composition en électrolytes jouent un rôle dans le contrôle de l'hydratation et de la rhéologie du mucus. L'augmentation de concentration en cations divalents, Mg²⁺ ou Ca²⁺ provoque la contraction du gel de mucus, tandis que l'augmentation des cations monovalents, Na⁺ ou K⁺ réduit sa viscosité. Le bicarbonate sécrété par le système vasculaire sous-muqueux permet de tamponner la couche de mucus adjacente.

I.6. FONCTIONS DU MUCUS

Le mucus permet l'hydratation, la lubrification et la protection des muqueuses qui sont soumises à des contraintes mécaniques, chimiques et microbiennes. Dans le tractus respiratoire, la clairance mucociliaire correspond aux mouvements ciliaires qui renouvellent en permanence la couche de mucus et permet son évacuation en même temps que celles des particules et des agents microbiens (Girod et al., 1992b; Sears et al., 2011; X. Wang et al., 2015). Dans le tractus gastro-intestinal, il lubrifie les aliments puis le chyme et les selles (Lichtenberger, 1995). Dans l'estomac, la couche interne d'un mucus en bicouche protège l'épithélium de l'acidité. Dans l'intestin grêle, une couche fine de mucus constitue une barrière semi-perméable qui permet l'absorption des nutriments mais empêche le passage des bactéries (Natividad and Verdu, 2013a; Salvo Romero et al., 2015). Le côlon est recouvert d'une bicouche de mucus composée de différentes sous-couches (Johansson et al., 2011). La couche interne est imperméable aux micro-organismes et sélective, tandis que la couche externe plus souple constitue une niche pour les bactéries commensales (Johansson et al., 2008).

I.7. MODELE MURIN DE MUCINES GELIFIANTES TRANSGENIQUES

Les modèles de xénotransgreffe ont été utiles pour valider les études *in vitro*. Cependant, seuls les modèles animaux génétiquement modifiés permettent l'étude du rôle des mucines en conditions physiologiques ou pathologiques dans un système parfaitement intégré. On dispose en particulier de modèles murins transgéniques (Tg) : de gène rapporteurs (green fluorescent protein, GFP et ses variants) ; de sous-expression ou d'inactivation (knock-out, KO) ; d'induction ou de surexpression (knock-in, KI). Les systèmes de recombinaison Cre-Lox et Flp-FRT sont les approches les plus couramment

utilisées pour le développement de modèles murins KO et KI inductibles et conditionnels. Dans ce chapitre, nous nous limiterons aux modèles qui sont en lien avec notre thématique de recherche.

1.7.1. Souris mucine 2 déficiente (*Muc2* $-/-$)

Les souris *Muc2* $-/-$ sont générées en substituant un fragment génomique recouvrant les exons 2 à 4 de *Muc2* par une cassette phosphoglycerate kinase-néomycine (PGK-Neo) (Velcich et al., 2002). En période anténatale et durant l'allaitement, les *Muc2* $-/-$ n'ont pas, en apparence, de défaut de développement par rapport aux *Muc2* $+/-$ ou aux souris sauvages (Wt). Elles n'ont pas d'augmentation compensatoire de l'expression des autres apomucines intestinales. Cependant, elles surexpriment des gènes impliqués dans la présentation des antigènes, l'immunité cellulaire et humorale et sous-expriment des gènes de maintien de la structure cellulaire (baisse de la claudine-1 et de la claudine-5) (Lu et al., 2011; Velcich et al., 2002). Leurs taux de cytokines pro-inflammatoires (IL-12 p35, IL-12 p40 et TNF- α) est plus important et leur muqueuse colique est le siège d'un afflux de cellules immunes témoignant d'une colite. La période du sevrage s'accompagne d'un retard de croissance se manifestant par une perte de poids importante liée à l'exacerbation de cette colite, avec persistance des marqueurs d'inflammation, mais diminution de l'expression des marqueurs d'immunosuppression. Dès l'âge de 6 mois, elles développent des tumeurs grêliques qui évoluent spontanément en carcinome invasif. A 12 mois, apparaissent également des tumeurs coliques et rectales (Lu et al., 2011). Comparées aux WT, on constate chez elles une prolifération cellulaire augmentée, une réduction du nombre de cellules caliciformes, une diminution de l'apoptose et une augmentation de la migration des cellules épithéliales intestinales (Berg et al., 1996; Velcich et al., 2002; Yang et al., 2005). Les *Muc2* $-/-$ s'avèrent plus sensibles à la

chimiothérapie. Après un traitement par méthotrexate (MTX), il existe, par rapport aux WT, une augmentation des dommages intestinaux de mucite impliquant le TNF- α chez les Muc2 -/- (de Koning et al., 2007).

Ces données sur les Muc2 -/- montrent le rôle primordial de Muc2 dans l'effet de barrière intestinale vis-à-vis de la translocation bactérienne, l'inflammation locale qu'elle génère et la dégénérescence tumorale que cette dernière finit par provoquer. Elles suggèrent l'intérêt de développer des modèles murins dont le mucus est renforcé (Van der Sluis et al., 2006).

1.7.2. Souris mucine 2 transgénique (Tg222)

L'existence de domaines CYS impliqués dans les interactions hydrophobes entre les mucines semble déterminante dans la constitution de l'effet de barrière du mucus. Dans ce contexte, l'augmentation du nombre de domaines CYS présents dans le mucus constitue un moyen de renforcer l'effet de barrière. L'Oikosin1 est une protéine constituée de 13 domaines CYS consécutifs qui est co-sécrétée avec les mucines par l'espèce planctonique *Oikopleura dioica*. Notre équipe a construit un vecteur plasmidique de 18,9Kb permettant de délivrer un mini-gène codant pour 12 domaines CYS consécutifs identiques (domaine CYS de MUC5B), dont le promoteur est le Tff3, co-sécrété avec Muc2 par les cellules caliciformes de l'intestin. L'ajout d'un gène rapporteur GFP à ce modèle Tg 208 a permis d'obtenir un modèle Tg222 dont la fluorescence permet de visualiser directement l'expression de cette protéine transgénique (Gouyer et al., 2015).

Les souris fondatrices de Tg222 comme leur descendance sont fertiles et en bonne santé. Elles ne développent ni colite ni de tumeur macroscopique. Leur couche de mucus intestinal s'avère moins perméable à des particules fluorescentes inertes. Malgré un nombre de cellules caliciformes plus important, l'expression de l'ARNm de Muc2 chez les

Tg222 est comparable à celui des WT. Paradoxalement, la O-glycosylation du mucus de ces souris transgéniques est modifiée et semble favoriser l'abondance de lactobacilles, bactéries probiotiques bénéfiques. Quatre principales espèces de *Lactobacillus* (*L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. gasseri* et *L. murinus*) ont été identifiés dans l'épithélium intestinal de ces souris. L'interaction de ces bactéries avec les glycanes terminaux de la mucine favorise l'effet de niche et limite la colonisation par des agents pathogènes. Les Tg222 se révèlent d'ailleurs moins susceptibles à la colite induite par le dextran sodium sulfate (DSS) et à la colonisation par l'agent pathogène *Citrobacter rodentium*. Après un gavage avec une souche *Escherichia coli* adhérent-invasifs (AIEC), les Tg222 s'avèrent également moins sensibles à la translocation intestinale.

Ces données confirment qu'une protéine composée de 12 domaines CYS consécutifs co-sécrétée avec *Muc2* par les cellules caliciformes de l'intestin des Tg222 est capable de renforcer les propriétés physico-chimiques du mucus intestinal, tout en favorisant son effet de niche pour les lactobacilles. Cette stratégie non invasive constitue une voie prometteuse pour l'étude du renforcement de la barrière intestinale.

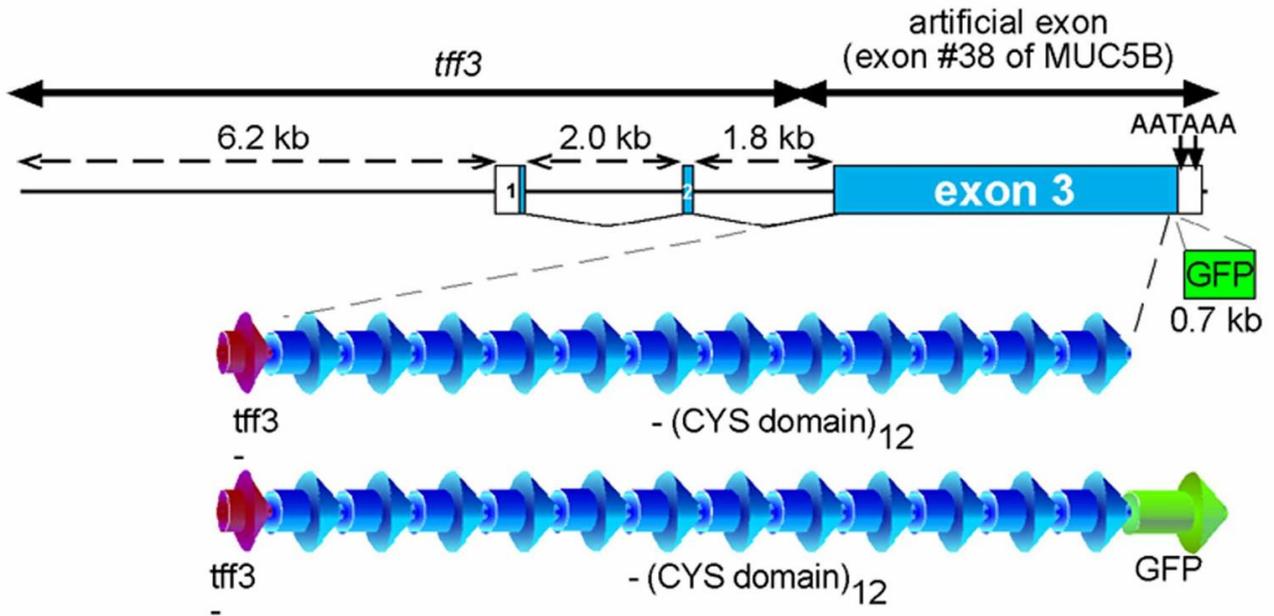


Figure 4. Construction des deux fragments d'ADN utilisés pour la génération de souris Tg222. (Gouyer et al., 2015)

I.7.3. Souris mucine 5b déficiente (*Muc5b* $-/-$)

Ces souris sont générées en utilisant un allèle de ciblage avec les sites LoxP encadrant l'exon 1 de *Muc5b*. Les souris présentant un allèle positif sont ensuite reproduites avec des souris knock-in Rosa26-Flpe recombinase afin de retirer la cassette de sélection à la néomycine. Les descendants sont ensuite croisés avec des souris transgéniques CMV-Cre.

On ne trouve pas de mucine *Muc5b* dans les fosses nasales ou les voies respiratoires de ces souris. Elles compensent ce manque en sécrétant davantage de *Muc5ac* au niveau nasopharyngé et trachéo-bronchique. Leur clairance mucociliaire (MCC) et leurs fonctions phagocytaires sont altérées et s'accompagne d'une réduction du médiateur antimicrobien IL-23. Ces facteurs favorisent la colonisation bactérienne (par *Staphylococcus aureus* entre autre) et les infections chroniques des voies respiratoires chez ces souris qui accusent un

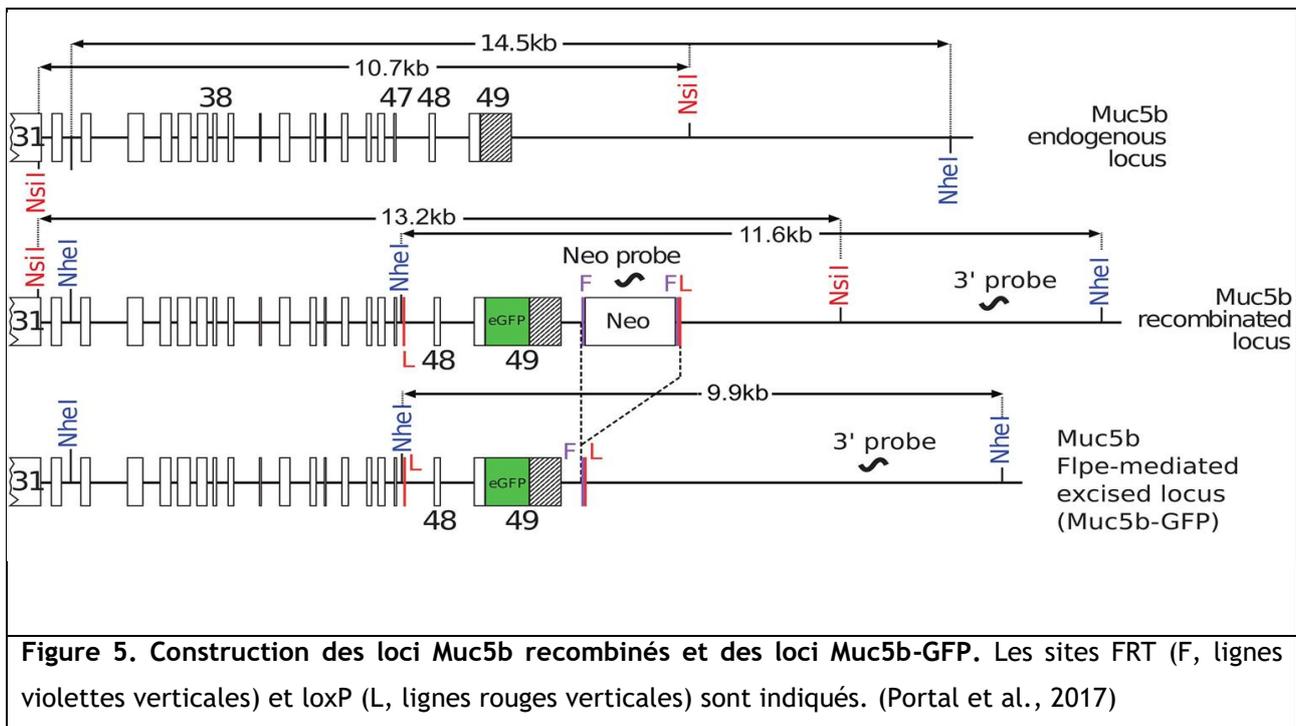
retard de croissance et meurent davantage. L'utilisation des traitements antibiotiques parvient à réduire leur colonisation bactérienne pulmonaire et leur mortalité mais n'améliore pas leur hypoxémie.

Ces données montrent le rôle de Muc5b dans la prévention des infections des voies respiratoires par le maintien de la clairance mucociliaire et de l'homéostasie immunitaire. Le fait que les souris Muc5ac $-/-$ survivent normalement souligne son caractère indispensable.

1.7.4. Souris transgéniques Muc5b avec rapporteur GFP (Muc5b-GFP)

Créées par recombinaison homologe, la séquence complète d'AA de la mucine gélifiante Muc5b est marquée avec une séquence peptidique GFP. La stratégie de ciblage génique utilisée pour générer les souris Muc5b-GFP a été conçue en remplaçant le codon « Stop » de Muc5b par une séquence nucléique synthétique codant pour un peptide Gly-Ser-Ile-Al-Thr suivi de la séquence de la GFP. Les deux derniers exons du gène sont flanqués de sites LoxP pour créer un modèle d'inactivation Muc5b $-/-$ (Portal et al., 2017) (Figure 5).

Ce modèle s'avère être un outil précieux pour l'étude de la physiologie et de la physiopathologie impliquant Muc5b et ses mécanismes régulateurs. Dans notre étude du mucus des cavités nasales nous utiliserons cette construction génétique pour générer nos deux modèles de souris Muc5b-GFP et Muc5b $-/-$ (Desseyn et al., 2018; Portal et al., 2017).



1.7.5. Souris mucine 5ac déficiente (Muc5ac -/-)

Leur production nécessite de réaliser une mutation génique ciblée en insérant des sites LoxP dans la région adjacente en 5' et l'intron 1 de Muc5ac. L'accouplement de ces souris avec des souris transgéniques Zp3-Cre (C57BL/6-Tg (Zp3-cre) 93Kw/J) produit les Muc5ac -/- (Hasnain et al., 2011).

On constate chez les souris Muc5ac -/-, une augmentation marquée du renouvellement de l'épithélium caecal, une augmentation du nombre de cellules caliciformes et des taux de Muc2 par rapport aux WT après infection au parasite *T. muris*. Leur mucus présente une plus grande porosité à *T. muris* qu'elles ne parviennent pas à éliminer après 23 jours, alors que les WT parviennent à en éliminer 70%. Muc5b, est exprimée abondamment dans leurs voies respiratoires, sans pour cela causer leur obstruction et augmenter la mortalité (Evans et al., 2015).

1.7.6. Souris surexprimant la mucine 5ac (Muc5ac KI)

Pour produire ce modèle, il faut utiliser le Muc5ac cloné de rat dans lequel la GFP est insérée immédiatement en amont de l'extrémité 5' du VNTR. Ce produit de fusion de 9,1 kb est placé sous le contrôle du promoteur de la protéine sécrétoire des cellules de Clara du rat (rCCSP). Muc5ac est surexprimée par les cellules de Clara localisée dans les voies respiratoires des souris Muc5ac KI qui abritent tout la machinerie nécessaire aux modifications post-traductionnelles et à la sécrétion de cette mucine (Ehre et al., 2012).

La surexpression de Muc5ac est sans incidence sur le développement, la survie et la croissance embryonnaire. Aucun changement dans l'expression de Muc5b endogène n'est observé, suggérant que malgré leur localisation en tandem sur le même chromosome 7F5, ces mucines sont éventuellement régulées par des mécanismes différents. En dépit d'une hypersécrétion de Muc5ac 20 fois supérieure à celle des WT, ce modèle de souris Muc5ac KI ne montre aucun signe d'obstruction des petites voies aériennes que ce soit en conditions physiologiques ou inflammatoire (Ehre et al., 2012).

II. ÉTUDE DES MUCINES GÉLIFIANTES DES CAVITÉS NASALES CHEZ LA SOURIS

II.1. GENERALITE

Les cavités nasales (ou fosses nasales) sont le siège de l'olfaction et constituent la principale entrée des voies respiratoires. Elles réchauffent et humidifient l'air inhalé avant qu'il ne pénètre dans l'arbre trachéo-bronchique et le parenchyme alvéolaire pulmonaire (Chen et al., 2014; Harkema et al., 2006). Elles assurent une filtration de cet air en capturant une partie des vapeurs solubles dans l'eau, des particules inhalées et des agents microbiens en suspension dans l'air (Heydel et al., 2013). Elles sont par conséquent les premières exposées en cas d'inhalation d'agents toxiques, infectieux et allergiques aéroportés (Aust et al., 1997). Chez les mammifères, la muqueuse qui tapisse les cavités nasales est composée d'épithéliums morphologiquement et fonctionnellement distincts : squameux, olfactif, transitoire, respiratoire et lympho-épithélial (Uraih and Maronpot, 1990). Le tissu conjonctif sous-jacent ou lamina propria contient les vaisseaux sanguins et lymphatiques, l'innervation, les glandes et les cellules mésenchymateuses. A l'exception de la région la plus proximale du vestibule nasal, l'ensemble des cavités nasales est recouverte d'un mucus produit par les cellules caliciformes de l'épithélium de surface et les glandes sous-épithéliales de la lamina propria. Ce mucus est soumis au mouvements ciliaires des cellules épithéliales. La vitesse et la direction du mouvement mucociliaire est variable en fonction de la localisation dans les cavités nasales (Ali and Pearson, 2007). Il est beaucoup plus lent au niveau de l'épithélium olfactif qu'il ne l'est au niveau du transitoire ou du respiratoire.

L'épithélium squameux partiellement kératinisé est limité au vestibule nasal. Il est en continuité avec l'épithélium transitoire cuboïde et cylindrique non ciliée, qui est lui-même en continuité avec l'épithélium respiratoire cuboïde et cylindrique pseudostratifié cilié, présent dans la chambre principale et le nasopharynx. L'épithélium olfactif est pseudo-stratifié. Sa surface est variable en fonction de l'espèce considérée. Le lympho-

épithélium est composé de cellules cuboïdes ciliées et non ciliées. Sa répartition diffuse sous forme d'agrégats cellulaires héberge le NALT (nasal associated lymphoid tissue). Les épithéliums respiratoire et olfactif couvrent plus de 90% des cavités nasales (Uraih and Maronpot, 1990).

L'épithélium respiratoire (RE) est composé de six types de cellules (caliciformes, ciliées, cylindriques non ciliées, cuboïdes, en brosses et basales) inégalement réparties sur la surface muqueuse. Il contient également des glandes tubulo-acineuses sous-épithéliales. La présence de nombreux enzymes (carboxylestérase, aldéhyde déshydrogénase, cytochrome P-450, époxyde hydrolase et glutathion S-transférase) dans cet épithélium joue un rôle important dans la détoxification de l'air inhalé (Harkema et al., 2006).

L'épithélium olfactif (OE) couvre 46% des cavités nasales chez la souris et seulement 3% chez l'homme. Il est composé de trois types cellulaires. Les cellules basales, les neurones sensoriels olfactifs (NSO) et les cellules de soutien sus-tentaculaires (Ali and Pearson, 2007; Harkema et al., 2006). On distingue les cellules basales globuleuses (CBG) des cellules basales horizontales (CBH) dont elles sont les progénitrices. Les CBG sont multipotentes et sont elles-mêmes progénitrices des NSO et des cellules sus-tentaculaires. Les NSO sont intercalés entre les cellules sus-tentaculaires. Leurs prolongements dendritiques se répartissent à la surface de l'épithélium. La membrane ciliaire dendritique contient les récepteurs odorants (OR) responsables de l'interaction chimique et de la détection initiale des odeurs inhalées. Chaque NSO n'exprime qu'un seul gène d'OR à la fois. Le prolongement axonal de chaque NSO traverse la membrane basale pour rejoindre les axones d'autres NSO exprimant le même OR, pour former des fascicules nerveux non myélinisés dans la lamina propria. Ces fascicules perforent ensuite la plaque criblée de l'éthmoïde qui sépare la cavité nasale du cerveau pour former des glomérules spécifiques

d'un même OR dans la couche nerveuse olfactive externe du bulbe olfactif. La transmission des informations olfactives est ensuite transmise par le biais des axones des cellules mitrales du cortex olfactif (François et al., 2016; Heydel et al., 2013). La neurogénèse continue de l'épithélium olfactif permet le renouvellement constant de ces NSO et leur régénération au décours d'une agression. Les cellules sus-tentaculaires sont de forme cylindrique, elles couvrent toute la surface de l'épithélium olfactif et entourent les NSO avec lesquelles elles rentrent en contact via des extensions cellulaires. Leur surface apicale est bordée de microvillosités qui se mêlent aux terminaisons ciliaires des dendrites (Heydel et al., 2013). Chez les mammifères, elles ne contiennent pas de mucine. La production et la sécrétion de mucus de l'épithélium olfactif provient en effet des glandes sous-épithéliales de Bowman. Ces dernières sont disséminées parmi les faisceaux nerveux olfactifs, elles forment des acini dont la partie tubulaire traverse la membrane basale à intervalles réguliers pour rejoindre la surface luminale (Ali and Pearson, 2007).

II.2. CONTEXTE

Chez l'homme, les GFM constituant le mucus des cavités nasales comprennent MUC5B, MUC5AC et MUC2 (Figure 3). Ces GFM sont principalement produites par les épithéliums respiratoire et olfactif mais d'autres GFM proviennent du liquide lacrymal via les canaux nasolacrimaux (Ali and Pearson, 2007). Au niveau de l'épithélium respiratoire, MUC5AC est produit par les cellules caliciformes et MUC5B par les glandes sous-muqueuses. Cependant, le type de GFM produites par les glandes de Bowman au niveau de l'épithélium olfactif (OE) n'est pas connue. En effet, chez l'homme, l'étude des GFM nasales est réalisée à partir de culture de cellules et d'explants de l'épithélium respiratoire, mais pas de l'épithélium olfactif qui s'avère difficile à prélever en pratique (Harkema et al., 2006). Les données immunohistochimiques actuellement disponibles

provenant de la souris sont à interprétées avec prudence en raison de la taille et de la complexité des GFM et du grand nombre de chaînes de glycanes qui recouvrent leur squelette. Notre équipe a récemment utilisé des souris Muc5b-GFP sur lesquelles nous avons enregistré, par endomicroscopie confocale à laser, une activité fluorescente spécifique dans les cavités nasales (Portal et al., 2017), mais la localisation précise de la production de Muc5b et Muc5ac n'est pas connue.

II.3. OBJECTIF

L'objectif de ce travail était de préciser l'expression et la localisation respective de Muc5ac et Muc5b, les deux principales GFM des cavités nasales, à partir de modèles de souris transgéniques Muc5b-GFP et Muc5b -/-.

II.4. MATERIELS ET METHODES

II.4.1. Souris

Des souris Muc5b-GFP Floxées (Muc5b f/f) avec un fond génétique de C57BL/6 (Desseyn et al., 2018) ont été croisées en collaboration avec Genoway (Lyon, France) avec des souris C57BL/6 exprimant la recombinaise Cre (Chen et al., 2015) pour exciser les deux derniers exons de Muc5b englobant le signal AAT AAA, la région 3' non traduite (UTR) et la séquence GFP (Figure 6a). Les allèles WT et GFP ont été déterminés par PCR en utilisant deux oligonucléotides (P1 et P2) et des cycles de PCR, comme décrit précédemment (Desseyn et al., 2018). L'allèle knock-out a été déterminé dans les mêmes conditions, mais un troisième oligonucléotide (antisens) (P3) a été ajouté dans le mélange réactionnel (Figure 6b). Au total, 14 souris de génotypes différents (WT, Muc5b-GFP et Muc5b -/-), âgées de 8 à 12 semaines, ont été utilisées dans cette étude. Les souris ont été hébergées

dans des animaleries exemptes de pathogènes spécifiques (EOPS) de l'université de Lille et ont reçu un régime alimentaire standard ad libitum (RM3, Special Diet Services, France). Les protocoles animaux étaient conformes à la législation française pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire et aux directives de l'union européenne.

II.4.2. Prélèvement

Les souris ont été sacrifiées par anesthésie intrapéritonéale létale (10mg/Kg Xylazine + 100mg/kg Ketamine) et leur museau a été prélevé immédiatement. Les cavités nasales ont été extraites par une entaille le long de l'os orbitaire entre les yeux et une autre dans le palais dur distal au niveau de la première molaire. L'excès de tissu mou a été éliminé et le restant a été rincé dans une solution saline tamponnée au phosphate (Gibco BRL, France), fixé dans le Carnoy puis décalcifié dans de l'EDTA à 10% pendant au moins 2 semaines avant d'être inclus dans la paraffine.

II.4.3. Histologies et immunohistochimie

Trois emplacements de coupes des cavités nasales ont été définis : proximale (T1) immédiatement en arrière de l'incisive supérieure contenant principalement de l'épithélium respiratoire ; intermédiaire (T2) au niveau de la papille incisive et ; distale (T3) au niveau de la crête du deuxième palais contenant principalement de l'épithélium olfactif (Figure 6c). Des coupes sériées de cinq microns d'épaisseur ont été préparées pour chaque emplacement. La coloration histologique a été réalisée en utilisant du bleu alcian-acide périodique Schiff (AB-PAS)(Gouyer et al., 2015).

Les anticorps primaires anti-Muc5b polyclonal (1/50 ; CP1), anti-MUC5AC monoclonal (1/500 ; 45M1), anti-Muc6 polyclonal (1/50 ; CP4), anti-Muc2 polyclonal

(1/100 ; H300, Sc15334) et anti-GFP polyclonal (1/500 ; ab290) ont été utilisés pour l'immunohistochimie. Les anticorps secondaires anti-lapin conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (1/150 ; Jackson ImmunoResearch Laboratories) ont été utilisés pour détecter les anticorps primaires. L'immunomarquage GFP et Muc5ac nécessitant un prétraitement au citrate, les doubles immunomarquages Muc5b et Muc5ac ont été réalisés uniquement sur des souris Muc5b-GFP et des souris Muc5b -/- en utilisant l'anticorps anti-GFP. Des anticorps secondaires anti-souris conjugués à la FITC et à la TRITC (Tetramethyl-rhodamine) ont également été utilisés (1/150 ; Jackson ImmunoResearch Laboratories). Les lectines MAA (Maackia Amurensis Agglutinin) et UEA-1 (Ulex Europaeus Agglutinin) conjuguées à la TRITC (25µg/ml ; EY Laboratories) qui reconnaissent les glycotopes terminaux de mucines α -(2,3) liés, l'acide sialique et le fucose α -(1,2)-galactose, respectivement, ont été utilisés tel que décrit précédemment (Gouyer et al., 2015). Le double marquage à l'aide de lectines MAA et UEA-1 a été réalisé avec la MAA conjuguée à la TRITC et la UEA-1 conjuguée au FITC (25µg/ml ; EY Laboratories). Les noyaux (bleus) ont été contre-colorés avec Hoechst 33258.

II.4.4. Imagerie

Trois à cinq cavités nasales de chaque génotype ont été analysés. Des captures de haute qualité en champ clair et en fluorescence ont été effectuées. Les images étaient numérisées sur un Axio Scan (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) et traitées avec le logiciel ZEN (Carl Zeiss).

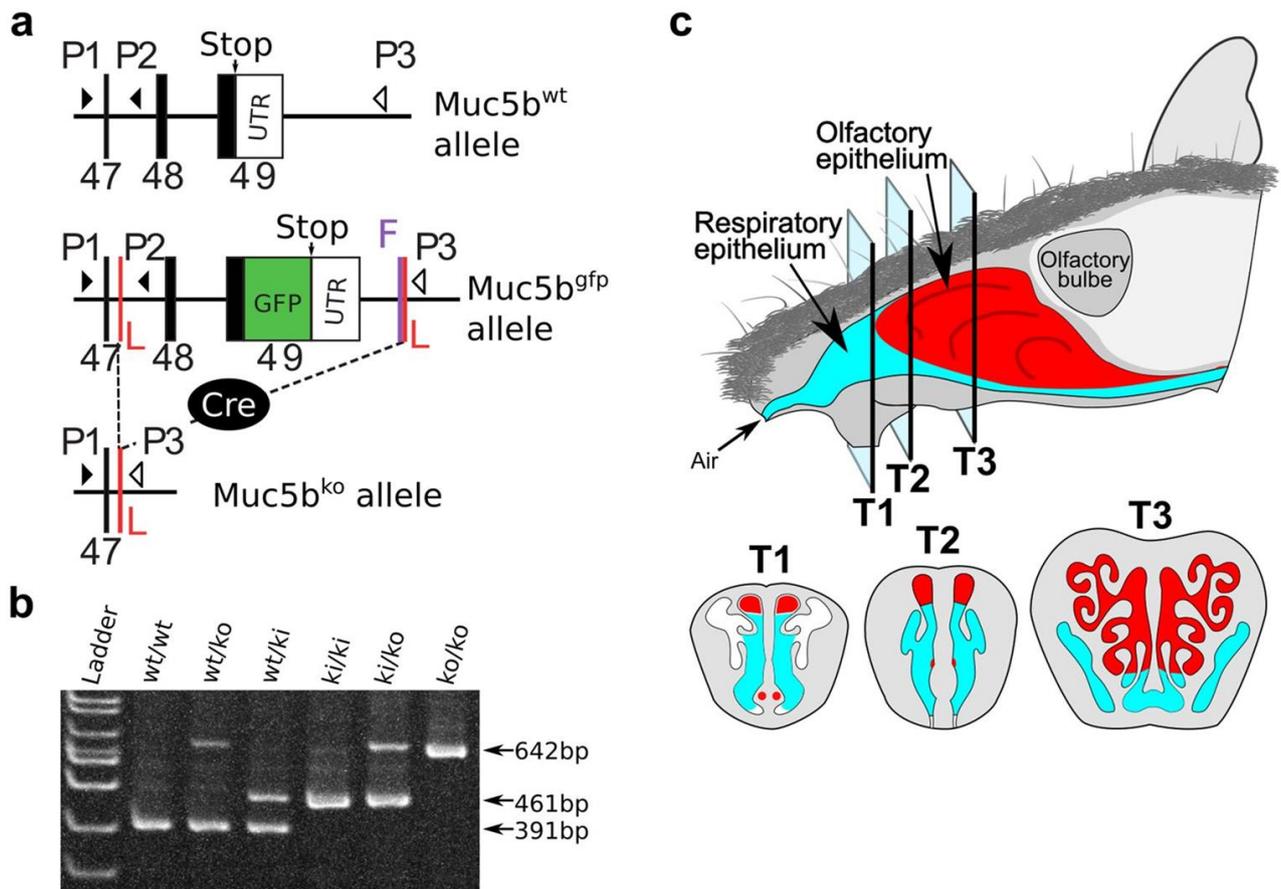


Figure 6. Lignée de souris *Muc5b* ^{-/-}, génotypage et dessin schématique de l'épithélium du nez de souris. (a) Une représentation schématique de l'extrémité 3' de la souris *Muc5b* avec ses trois derniers exons (47-49) et son unique 3' UTR. (b) Exemple de génotypage obtenu par PCR analysé dans un gel d'acrylamide à 8% en utilisant des échantillons d'ADN de tous les génotypes de souris avec des bandes prédites de 391, 461 et 642 pb pour les allèles WT (*Muc5b* +), *Muc5b*-GFP (*ki*), et *Muc5b* ^{-/-} (*ko*) respectivement. (c) Représentation schématique du museau de souris (Harkema et al. 2006) montrant les coupes transversales T1 à T3 utilisées dans l'étude avec les épithéliums respiratoires et olfactifs en bleu et en rouge, respectivement.

II.5. RESULTATS

II.5.1. Expression des GFM dans les cavités nasales

Dans les voies nasales proximales (T1), la coloration AB-PAS a montré des glycoconjugués dans les cellules caliciformes de l'RE et dans les glandes de Bowman situées sous l'OE (Figure 7). Dans le RE des sections T1 des souris Muc5b-GFP et WT, seul Muc5ac a été trouvé sans aucune trace de Muc5b. Inversement, dans l'OE, les BG produisent Muc5b mais pas Muc5ac comme indiqué à l'aide de l'anticorps anti-GFP chez des souris Muc5b-GFP (Figure 7). Cela a été confirmé par l'utilisation de l'anticorps anti-Muc5b chez des souris WT et chez des souris Muc5b-GFP. Enfin, dans les voies nasales distales (T3), contrairement à T1, l'RE était caractérisé par l'expression de Muc5b et de Muc5ac ensemble chez les souris Muc5b-GFP, alors que l'OE n'exprime encore que Muc5b, sans Muc5ac (Figure 8). Cela a ensuite été confirmé en utilisant l'anticorps anti-Muc5b chez les souris WT Muc5b-GFP.

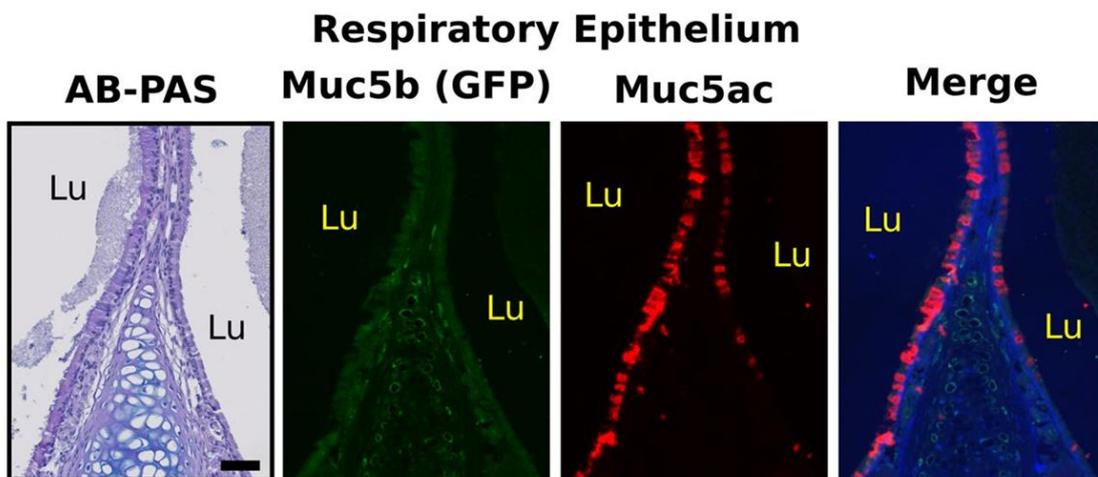
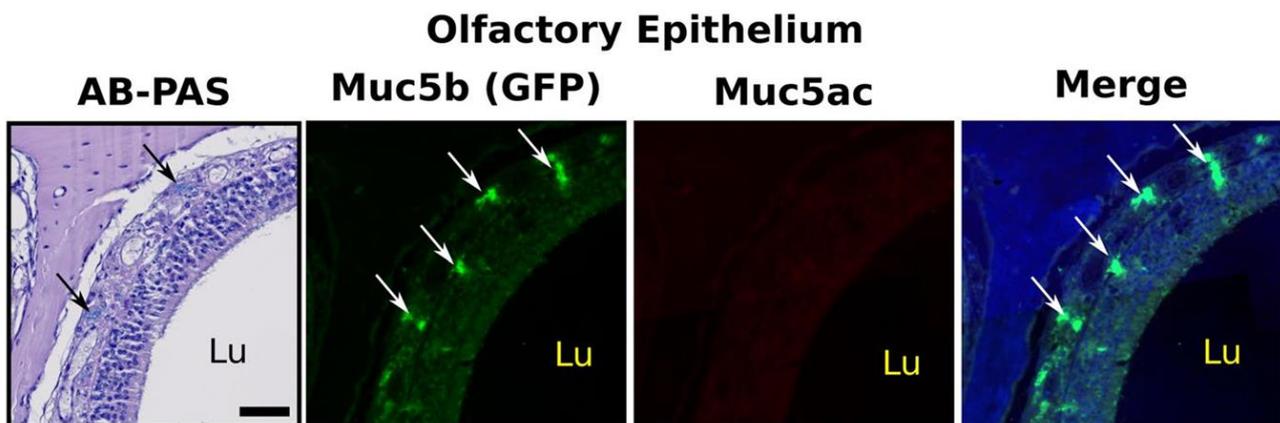
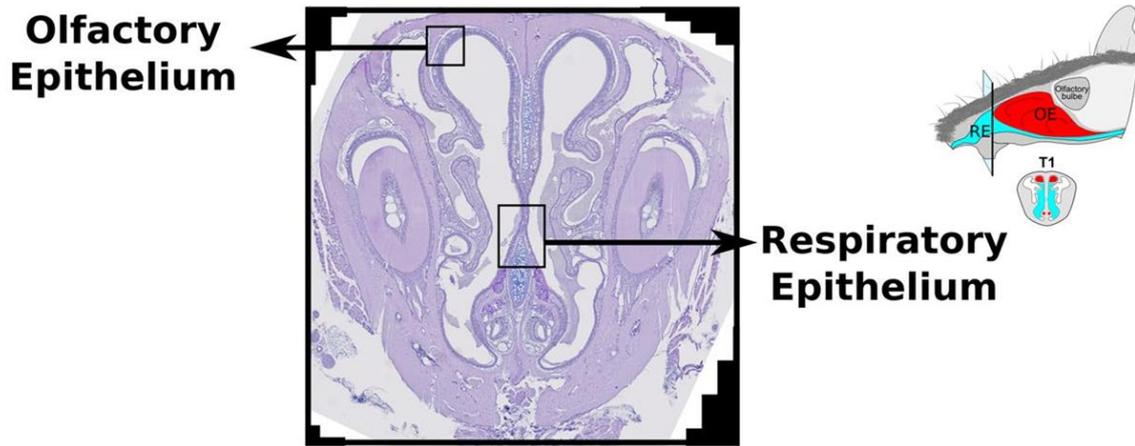


Figure 7. Immunohistochimie de GFP et Muc5ac dans les sections coronales nasales proximales (T1) de souris Muc5b-GFP. Des coupes séries ont été color es avec AB-PAS et anti-anticorps contre GFP (vert) et Muc5ac (rouge). Des images à plus fort grossissement prises à partir des zones encadr es dans OE et RE sont affich es. Les BG (flèche) et lumière nasale (Lu). Barre d'échelle = 50  m.

II.5.2. Modification des BG chez les souris Muc5b -/-

L'expression de Muc5b et Muc5ac a été analysée sur des coupes transversales des voies respiratoires distales (T3). Chez les souris Muc5b -/-, la coloration AB-PAS a montré une déplétion des BG qui apparaissaient presque vides de glycoconjugués (Figure 9). Ceci était en accord avec l'absence de coloration en utilisant l'anticorps anti-GFP dans l'OE et les anticorps anti-Muc5b chez les souris Muc5b -/- (Figure 9). En revanche, aucune différence dans l'expression de Muc5ac n'a été observée dans le RE des souris Muc5b -/- par rapport aux souris Muc5b-GFP (Figures 8 et 9). De même, aucune production compensatoire de Muc5ac n'a été observée dans les BG des souris Muc5b -/- (Figure 9). Aucun signal de Muc6 ou Muc2 n'a été observé dans les sections T1 ou T3 des souris Muc5b-GFP et Muc5b -/-.

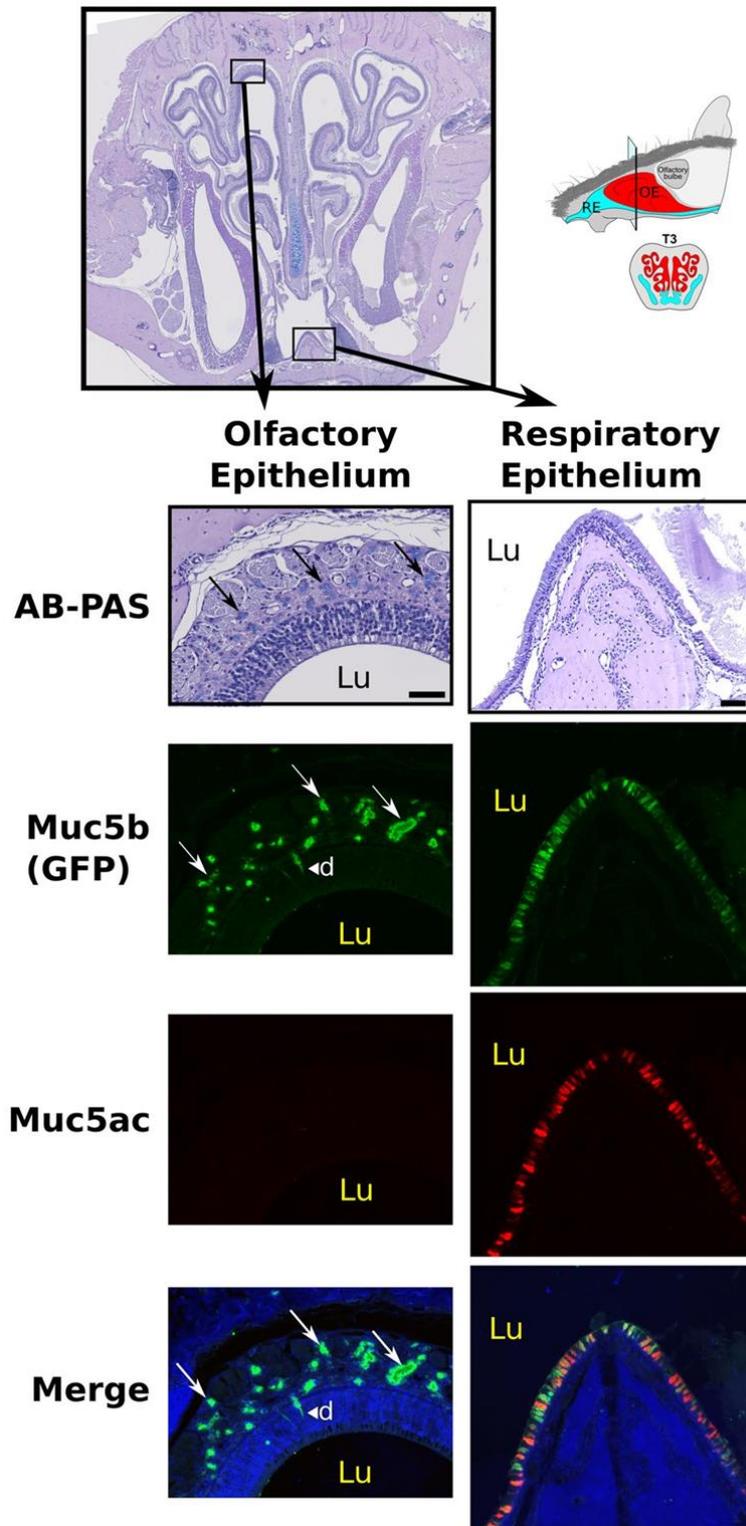
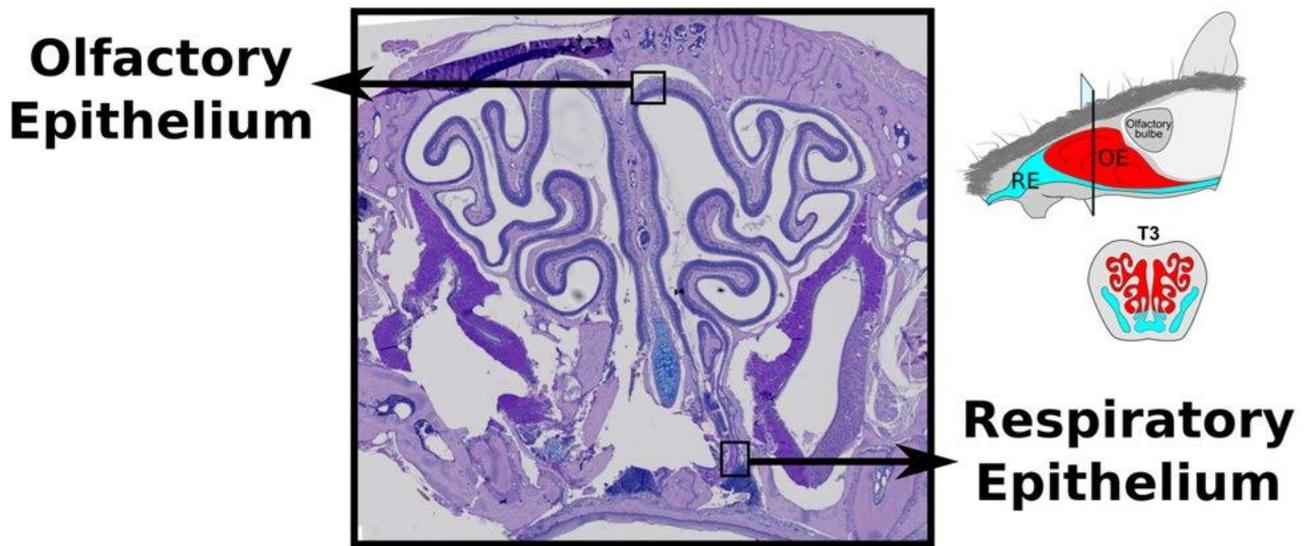
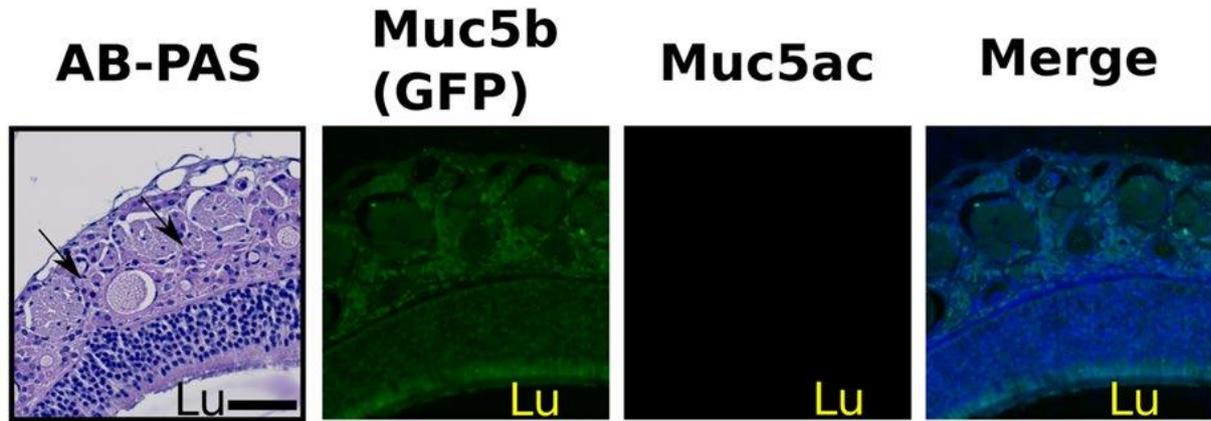


Figure 8. Immunohistochimie de GFP et Muc5ac sur des coupes coronales nasales distales (T3) de souris Muc5b-GFP. Des coupes s riees ont été color es avec AB-PAS et des anticorps anti-GFP (vert) et Muc5ac (rouge). Les images à plus fort grossissement prises à partir des zones encadr es dans les environnements OE et RE sont affich es. Les BG (flèche) et lumière nasale (Lu). Barre d'échelle = 50  m



Olfactory Epithelium



Respiratory Epithelium

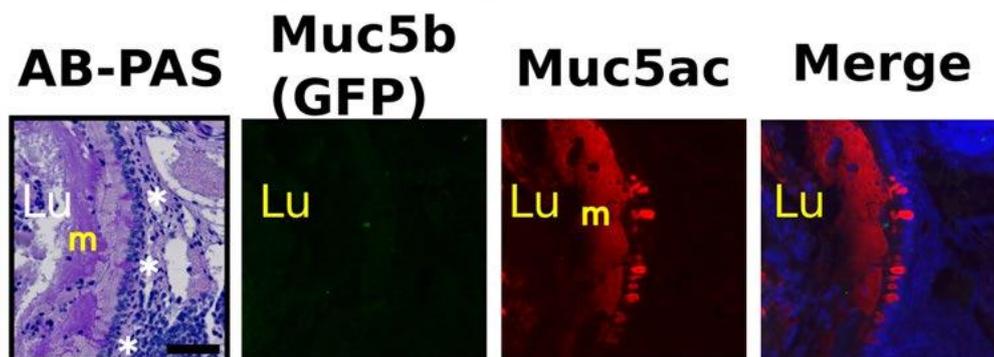
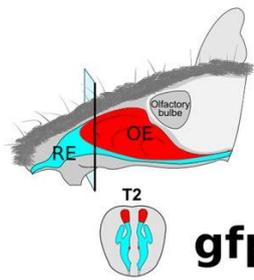
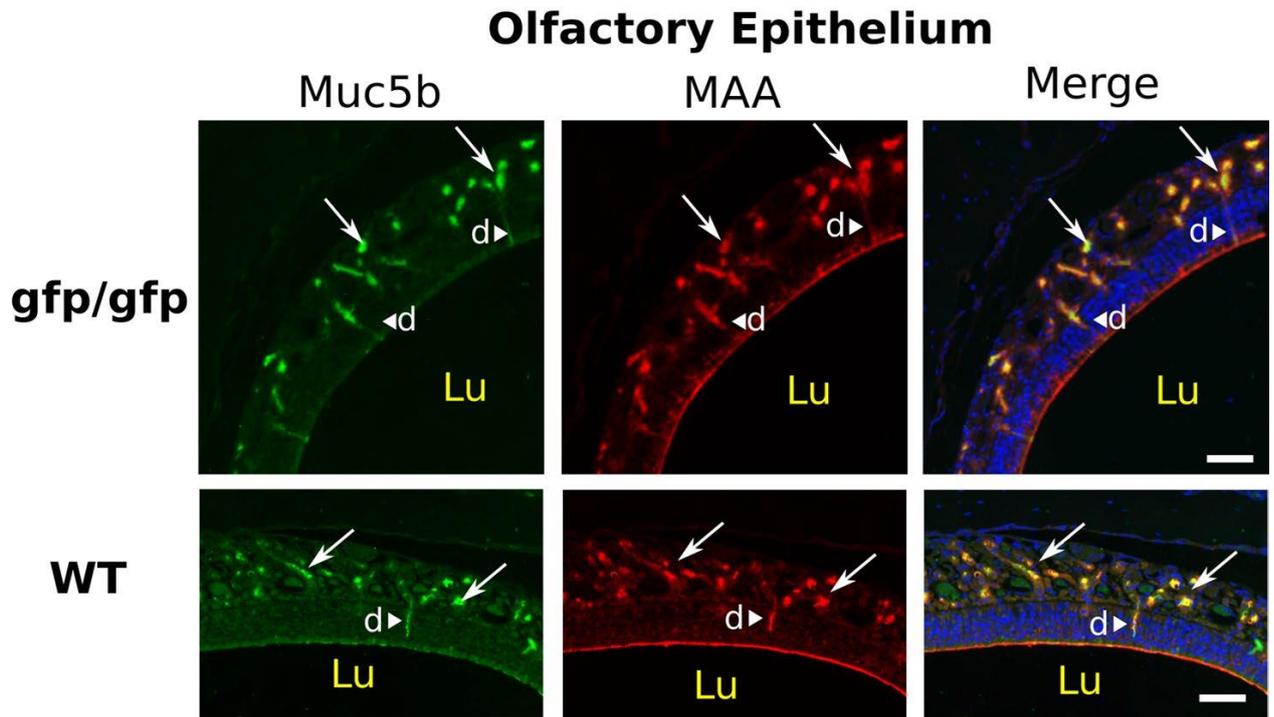


Figure 9. Immunohistochimie de la GFP et de Muc5ac dans les coupes coronales nasales distales (T3) de souris Muc5b ^{-/-}. Des coupes en série ont été colorées avec AB-PAS et des anticorps anti-GFP (vert) et Muc5ac (rouge). Les images à plus fort grossissement prises à partir des zones encadrées dans les environnements OE et RE sont affichées. Les BG (flèche) et lumière nasale (Lu). Barre d'échelle = 50 µm

II.5.3. Identification des lectines spécifiques de Muc5b et Muc5ac dans les cavités nasales

Dans les section T2 de souris Muc5b-GFP et de souris WT, la coloration des anticorps anti-Muc5b était localisée avec la MAA dans les BG et ses canaux (Figure 10). Muc5ac semblait se localiser avec UEA-1 dans le RE, alors que la coloration de la MAA y avait presque disparu (Figure 10). L'UEA-1 ne colorait pas l'OE des souris Muc5b *-/-*. Ceci était confirmé par un double marquage avec des lectines MAA et UEA-1 conjuguées qui a montré que la MAA mais pas l'UEA-1 se liait aux BG dans l'OE, alors que les cellules caliciformes du RE étaient marquées par l'UEA-1 sans la MAA. La liaison préférentielle de MAA à Muc5b et de UEA-1 à Muc5ac dans les cavités nasales indiquait que ces deux GFM hébergent des glycotopes terminaux distincts. Muc5ac est préférentiellement fucosylé (fucose α -(1,2)-galactose), alors que Muc5b est préférentiellement sialylé (acide sialique).



gfp/gfp

WT

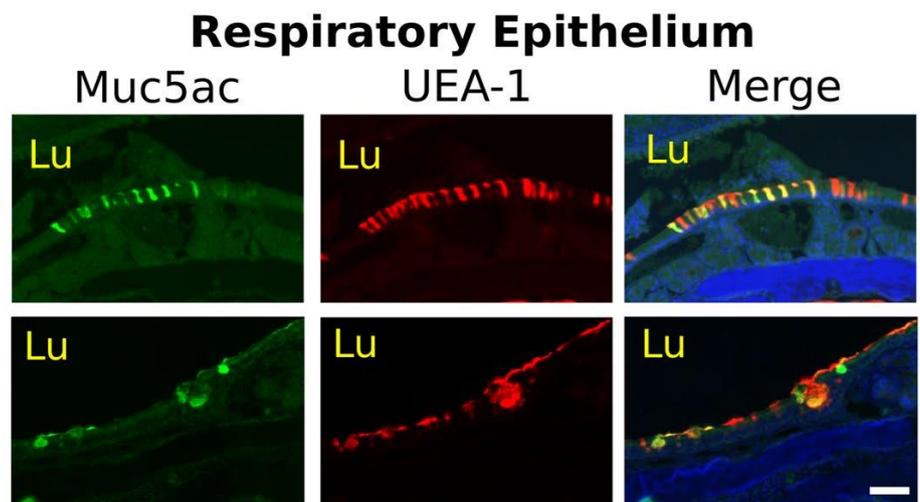


Figure 10. Immunohistochimie avec multimarquage des lectines Muc5b et Muc5ac dans l'OE et l'ER de coupes coronales intermédiaire T2 de souris WT et Muc5b-GFP. Des images à fort grossissement de l'OE et de RE sont affichées. Les BG (d>) et lumière nasale (Lu). Barre d'échelle = 50 μ m

II.6. DISCUSSION

Ce travail montre que Muc5ac est produite uniquement dans le RE, alors que Muc5b est produite par les BG de l'OE. Une étude utilisant l'immunohistochimie (Chen et al., 2018) a récemment signalé la production de Muc5b dans les glandes de Bowman des souris BG, mais Chen et al. ont noté qu'ils ne pouvaient pas utiliser les anticorps spécifiques actuellement disponibles de Muc5ac de souris pour travailler sur des échantillons décalcifiés. Un autre groupe a rapporté que les BG de rat et de souris pourraient produire Muc5b, mais secrètent principalement Muc5ac (Solbu and Holen, 2012). Dans ce dernier travail, la coloration Muc5ac était observée à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris (Clone SPM488). Cependant, cet anticorps n'a pas été validé chez la souris et est dirigé contre un peptide 20 AA synthétique non glycosylé de la séquence de répétition en tandem de la mucine humaine MUC5AC (Reis et al., 2000) qui n'est pas conservée dans la séquence de Muc5ac de souris. Enfin une dernière étude a récemment rapporté que Muc5ac est exprimée par les glandes sous-épithéliales dans les deux épithéliums mais qu'elle l'est davantage par les BG, et que Muc5b est produite par les BG et par les cellules épithéliales de surface dans le RE (Kennel et al., 2019). En revanche, dans cette étude les tissus étaient fixés puis post-fixés dans du paraformaldéhyde, réputés pour augmenter le signal non spécifique alors que les coupes analysées étaient très épaisses (12µm). De plus, l'anticorps utilisé, le rabbit polyclonal anti-MUC5B (Sc-20119), n'a pas été validé chez la souris et il est dirigé contre une séquence de mucine humaine MUC5B. Enfin, ils effectuaient une quantification du signal Muc5ac (anticorps primaire non précisé), à l'aide du logiciel Fiji, sur des coupes épaisses et déclaraient relever beaucoup de signal non spécifique, notamment dans la lamina propria.

Nous montrons aussi que la liaison préférentielle de la MAA à Muc5b et de l'UEA-1 à Muc5ac indiquent que ces deux GFM hébergent des glycotopes terminaux distincts.

Muc5b est préférentiellement sialylée alors que Muc5ac est préférentiellement fucosylée. Chez la souris, deux études ont montré que l'OE (mais pas les cellules caliciformes du RE) est sialylé (Ueno et al., 1994), alors qu'une autre a rapporté que les BG produisent des glycoconjugués sulfatés mais non sialylés (Kondo et al., 2009). Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans les voies aériennes d'autres animaux. Chez le porc, la lectine MAA (qui se lie à la N-acétyl-d-glucosamine et à l'acide sialique) marque préférentiellement MUC5B (Ostedgaard et al., 2017), tandis que la lectine UEA-1 et les anticorps anti-MUC5AC marquent les cellules caliciformes superficielles (Ermund et al., 2017). Chez le rat adulte, l'utilisation de UEA-1 permet de détecter glycoconjugués fucosylés dans des cellules caliciformes (Castells et al., 1991).

L'utilisation conjointe de souris WT, Muc5b-GFP et Muc5b -/- montre que Muc5ac est produite uniquement dans le RE et qu'elle est préférentiellement fucosylée, alors que Muc5b est produite par les BG dans l'OE et qu'elle est préférentiellement sialylée. L'influence de cette différence de O-glycosylation sur les propriétés respectives de ces deux mucines reste à élucider. Les investigations futures devront, entre autre, déterminer si ces deux épithéliums hébergent un microbiote différent et qu'elles conséquences peuvent avoir l'absence de Muc5b sur celui-ci, notamment concernant la fonction olfactive.

**III. ÉTUDE DE LA RÉGÉNÉRATION
INTESTINALE APRÈS
CHIMIOTHÉRAPIE CHEZ LA SOURIS**

III.1. MUQUEUSE INTESTINALE

III.1.1. Généralités

L'intestin grêle est essentiel à l'absorption des macro- et des micronutriments. Il permet leur passage sélectif tout en faisant obstacle aux agents microbiens, aux parasites et aux trophallergènes présents dans sa lumière, grâce à sa fonction de barrière nécessaire au maintien de l'homéostasie (Turner, 2009). La couche de mucus qui recouvre la face luminale de l'épithélium intestinale assure l'interface entre ce dernier et le microbiote, et joue un rôle central dans leur adaptation mutuelle. L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche cellulaire complexe posée sur une membrane basale qui la sépare du tissu conjonctif sous-jacent ou lamina propia. La tolérance et la défense immunitaire de l'intestin est assurée par le tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT) (Figure 12) (Sánchez de Medina et al., 2014).

III.1.2. Épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est en constant renouvellement. Celui-ci s'effectue de façon ascendante en 4 à 5 jours chez l'homme et 3 jours chez la souris (Westcarr et al., 1999), depuis le fond des cryptes vers le sommet des villosités. Les cryptes contiennent les cellules souches pluripotentes, les progéniteurs et les cellules de Paneth impliquées dans l'immunité innée. Les villosités contiennent des cellules différenciées qu'on peut classer en cellules absorbantes (les entérocytes) et en cellules sécrétrices (les cellules caliciformes, entéro-endocrines, tufts et M) (Figure 12) (Gerbe and Jay, 2016). L'entérocyte, qui représente 80% des cellules de l'épithélium, est l'unité fonctionnelle absorbante de l'intestin grêle. C'est une cellule polarisée qui possède un noyau basal et des microvillosités apicales constituant la bordure en brosse qui augmente la surface

d'échange avec les composants de la lumière intestinale (Turner, 2009). L'entérocyte permet le maintien de l'intégrité digestive, métabolique et physique de la barrière. Ils jouent également un rôle dans le développement de l'activité immunitaire en exprimant des récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire innée. Les cellules en goblet ou caliciformes sécrètent les différents composants du mucus (MUC2 principalement). Il existe de multiples cellules entéro-endocrines qui sont spécialisées dans la fabrication de plus d'une centaine d'entérohormones différentes. Les cellules M ou microfold font partie du GALT et sont impliquées dans l'absorption d'antigènes intra-luminaux, tandis que les rares cellules tufts sont impliquées dans la réponse immunitaire antiparasitaire via la production d'Il-25 (Sánchez de Medina et al., 2014).

L'intégrité de l'épithélium et donc de la barrière intestinale est maintenue par différents types de jonctions intercellulaires impliquant différentes protéines : jonctions serrées (claudines, occludine, AF-6, zonula occludens (ZO), cinguline...), jonctions adhérentes (cadhérines et caténines...), desmosomes (desmoglobine, desmogléine, desmocolline et desmoplakine) et jonctions communicantes ou GAP (connexines) (Figure 11) (Salvo Romero et al., 2015) .

Les jonctions serrées sont apicales. L'organisation en pores des protéines transmembranaires qui les composent permet de réguler la perméabilité paracellulaire de l'eau, des ions et des différentes molécules. Les pores que forment les claudines 2, 7, 12 et 15 avec l'occludine augmentent la perméabilité paracellulaire. Ceux que forment les claudine 1, 3-5, 8-11 et 14 diminuent la perméabilité paracellulaire, renforcent la fonction de barrière et maintiennent la polarité cellulaire (Suzuki, 2013). Les ZO sont des protéines d'échafaudage qui interagissent avec de nombreuses protéines transmembranaires via leur région N-terminale, tandis que leur extrémité C-terminale interagit avec le cytosquelette d'actine et les protéines qui y sont associées. Ces jonctions serrées peuvent

être impactés par de nombreux facteurs extracellulaires, intracellulaires ou membranaires. Les niveaux de phosphorylation, de distribution et d'expression de ces protéines jouent un rôle important dans la régulation de la fonction de barrière intestinale (Suzuki, 2013). Elles sont étroitement régulées par les voies de signalisation intracellulaire (protéines kinases, phosphatase, MAPK, PI3K/Ak). Les jonctions adhérentes et les desmosomes fournissent une force d'adhérence mécanique entre les cellules, mais n'interviennent pas dans la perméabilité paracellulaire. Elles sont toutefois nécessaires à l'assemblage et à la maintenance des jonctions serrées. Les jonctions communicantes permettent la communication entre les cytoplasmes des cellules voisines en établissant des canaux à travers leurs membranes. L'expression de ces jonctions est dynamique, elle est régulée aux niveaux de la transcription et de la post-transcription. Leur vitesse de renouvellement est élevée (Salvo Romero et al., 2015).

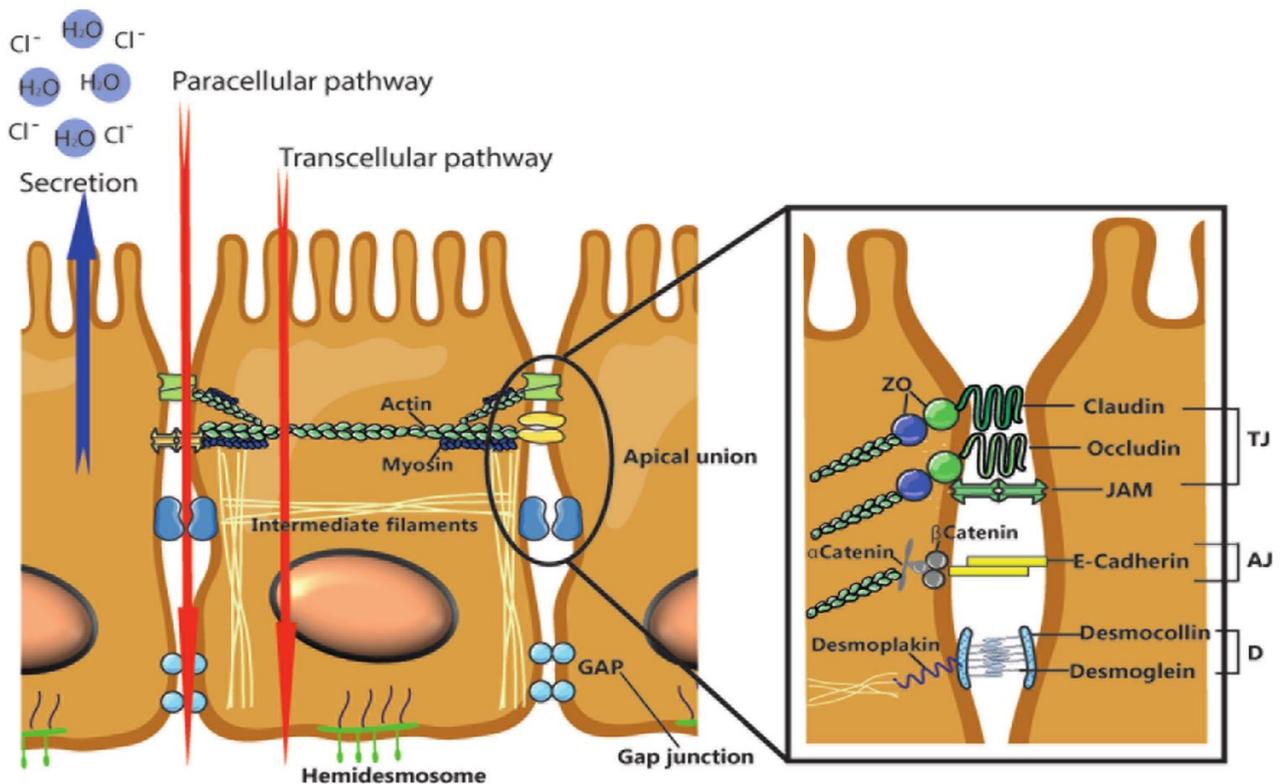


Figure 11. Les complexes des protéines de jonctions dans la barrière intestinale. (Salvo Romero et al., 2015)

III.1.3. Mucus intestinal

Il constitue une barrière physique et biochimique dont les propriétés hydrophobes et tensioactives permettent de maintenir les bactéries à distance des cellules épithéliales. Il préserve l'hydratation de l'épithélium, le protège contre le stress des enzymes digestives, participe à son renouvellement et à sa différenciation, tout en restant perméable aux nutriments. Les données concernant les souris *Muc2*^{-/-} illustrent l'importance qu'a *Muc2*, le composant principal du mucus, dans la protection de l'épithélium. Ces souris développent en effet une colite spontanée et souffrent de

dommages intestinaux plus importants après une chimiothérapie (Van der Sluis et al., 2006).

L'épaisseur de la couche de mucus augmente pour devenir maximale au niveau de l'iléon et du colon, là où la concentration en bactéries est la plus importante. La couche de mucus est riche en produits antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth, tels que les peptides de la famille des peptides en trèfle (Tff), les ribonucléases et les défensines. Elle contient également des immunoglobulines A sécrétées (IgA) synthétisées par les plasmocytes de la lamina propria puis activement sécrétées par les cellules épithéliales. Ensemble, ces composants limitent le contact des micro-organismes avec l'épithélium (Bansil and Turner, 2018).

III.1.4. Microbiote intestinal

Les bactéries colonisent le tractus gastro-intestinal immédiatement après la naissance et contribuent directement et indirectement à la maturation de la barrière intestinale. Le tractus gastro-intestinal héberge 10^{14} bactéries, soit dix fois plus les cellules eucaryotes qui le composent. Environ 35000 espèces (Bacteroïdes, Lactobacillus, Clostridium, Bifidobacterium, Streptococcus, Enterococcus, Protéobacteries...) participent à la diversité du microbiote de l'intestin grêle. La dysbiose du microbiote intestinal est le terme qui désigne son déséquilibre quantitatif et qualitatif (Sánchez de Medina et al., 2013).

Le microbiote intestinal et notamment sa flore commensale est en constante interaction avec la muqueuse. Il contribue au renforcement de la barrière intestinale de différentes manières : stimulation de l'expression et régulation des protéines de jonction serrées, différenciation des cellules épithéliales et production de mucus par les cellules caliciformes, activation de la production de peptides antimicrobien et des IgA sécrétées,

compétition avec les pathogènes intraluminaux, stimulation du système immunitaire intestinale innée et adaptatif (Kim and Ho, 2010a; Natividad and Verdu, 2013b; Turner, 2009). Il contribue également à la digestion des fibres alimentaires et fourni des acides gras à chaîne courte qui constituent une source d'énergie pour les colonocytes. A l'inverse, chez les souris axéniques (dépourvues de microbiote), on observe une réduction de la taille des villosités, du nombre de cellules caliciformes ainsi que de nombreuses anomalies du GALT (hypoplasie des plaques de Peyer, réduction des LIE, diminution des IgA sécrétoires) (Arpaia et al., 2013).

III.1.5. Système immunitaire intestinal

Le renouvellement rapide de l'épithélium, les jonctions serrées, le mucus, les bactéries commensales et la motricité digestive contribuent à l'effet de barrière de l'intestin vis-à-vis des micro-organismes intra-luminaux. Cette action est renforcée par la présence de peptides antimicrobiens dont la synthèse par les cellules épithéliales est soit constitutive, soit induite par les agents microbiens eux-mêmes via des récepteurs de l'immunité innée. Il existe, à côté de ces mécanismes innés non spécifiques, une immunité adaptative capable de mettre en place des réponses spécifiques rapides et coordonnées, d'acquérir la tolérance aux antigènes contenus dans les aliments (trophallergènes) et de cibler les agents pathogènes (Macdonald and Monteleone, 2005).

Le système immunitaire inné est le premier à être activé. Dans le tractus gastro-intestinal, sa réponse non spécifique est largement représentée par les : cellules épithéliales, cellules dendritiques, macrophages, cellules tueuses naturelles (NKT), mastocytes, éosinophiles et cellules lymphoïdes innées (ILC). Ces cellules reconnaissent certains motifs moléculaires ou Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) provenant des bactéries (lipopolysaccharides des bactéries Gram négatives, flagéline des

bactéries flagellées), des levures (mannanes) et des virus (virus à ARN), grâce à des récepteurs spécifiques ou pattern recognition receptors (PRRs). Parmi ces PRRs on trouve les Toll-like (TLR), les NOD-like (NLR), les RIG-I-like (RLR) et les C-type lectin-like (CLR) (Kato et al., 2014; Maynard and Weaver, 2009; Sánchez de Medina et al., 2014). Le système immunitaire inné comprend plusieurs sous-populations de cellules dont l'activation dépend des cytokines présentes dans leur environnement. En conditions physiologiques, l'activation des PRR apicaux par les bactéries commensales contribue à la sécrétion de substances antibactériennes et au maintien de la tolérance immunitaire. En revanche, en conditions pathologiques ou en cas de dysbiose, les agents microbiens pénètrent le mucus, rentrent en contact avec les cellules épithéliales et déclenchent une réponse pro-inflammatoire via l'activation de leurs PRRs basolatéraux et des PRRs des autres cellules du système immunitaire inné. Les cellules dendritiques sont en première ligne dans la reconnaissance antigénique. Il semble qu'elles puissent différencier les signaux provenant de micro-organismes commensaux, de ceux provenant de pathogènes, afin de développer une réponse appropriée à la situation. Elles intériorisent les antigènes qu'elles détectent dans des phagosomes et les apprêtent afin pouvoir les présenter grâce à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Cette présentation conditionne les réponses cellulaires et humorales du système immunitaire adaptatif (Kato et al., 2014).

L'immunité adaptative de l'intestin qui induit des réponses spécifiques aux antigènes dépend du GALT. Celui-ci comprend des sites inducteurs et des sites effecteurs. Les sites inducteurs sont constitués des follicules lymphoïdes isolés et des plaques de Peyer (agrégats de follicules lymphoïdes) qui sont séparés de la lumière intestinale par des cellules épithéliales particulières, les cellules M (Figure 12) (Sánchez de Medina et al., 2014). Ces dernières sont spécialisées dans l'endocytose et le transport d'antigènes de la

surface apicale vers le tissu lymphoïde et les cellules dendritiques sous-épithéliales. Follicules lymphoïdes et plaques de Peyer contiennent des lymphocytes T et des lymphocytes B naïfs et mémoires qui sont activés par les antigènes présentés par cellules présentatrices d'antigène (CPA) que sont les macrophages et les cellules dendritiques. Il existe une forte concentration de plaques de Peyer dans l'iléon distal. Ces sites inducteurs jouent un rôle important dans la phase initiale du déclenchement de la réponse immunitaire adaptative (Maynard and Weaver, 2009; Turner, 2009). Les lymphocytes qui y sont activés se drainent vers les ganglions lymphatiques mésentériques où ils vont pouvoir se différencier et proliférer. Les sites effecteurs correspondent aux lymphocytes différenciés dispersés dans la lamina propria (lamina propria lymphocytes - LPL) et dans l'épithélium (intraepithelial lymphocytes - LIE) (Figure 12) (Bernhardson et al., 2009). Les LPL, sont principalement représentés par les lymphocytes T CD4+, CD8+ et les plasmocytes, qui sont des lymphocytes B différenciés produisant principalement des IgA. Ces IgA se dimérisent pour devenir sécrétoires lors de leur transcytose épithéliale vers le pôle apicale, grâce à la fixation d'un récepteur d'Ig polymérique (la pièce sécrétoire). Les LIE constituent la première ligne de défense cellulaire adaptative contre les agents pathogènes. Ce sont essentiellement des lymphocytes T constitués d'une population hétérogène appartenant aux lignées TCR $\gamma\delta$ et TCR $\alpha\beta$. La rétention des LIE dans la couche de cellules épithéliales provient de leur liaison via l'intégrine $\alpha E(CD103)\beta 7$ qu'ils expriment, à la E-cadhérine exprimée à la surface basolatérale des cellules épithéliales (Maynard and Weaver, 2009).

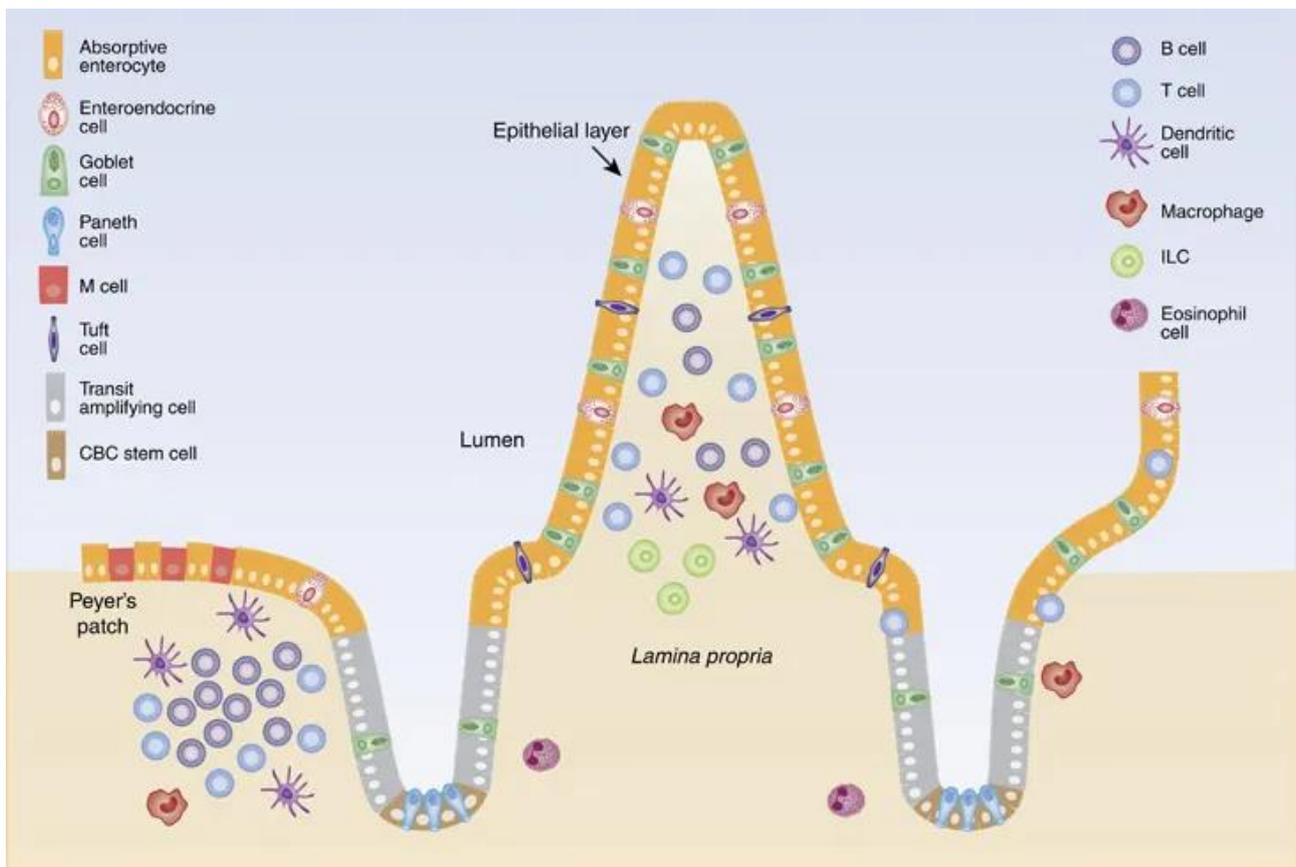


Figure 12. Schéma de l'épithélium intestinal et du système immunitaire GALT. (Gerbe and Jay, 2016)

III.2. CHIMIOThERAPIE

La chimiothérapie désigne les agents cytotoxiques qui ciblent les cellules tumorales en division active. Dès le début de son utilisation, il est apparu évident que la chimiothérapie endommageait aussi les cellules non malignes, entre autre celles du tractus gastro-intestinal dont la vitesse de renouvellement est rapide (Garattini et al., 1967). Les molécules de chimiothérapie sont classées en fonction de leur mécanismes d'action : les agents alkylants (carboplatine, le cisplatine et l'oxaliplatine) endommagent directement l'ADN; les anti-métaboliques (cytarabine, 5-fluorouracile, méthotrexate) interfèrent avec la réplication de l'ADN et de l'ARN; les anthracyclines qui sont des

antibiotiques (doxorubicine, daunorubicine) interfèrent avec la réplication de l'ADN; les inhibiteurs mitotiques (taxanes, vinca-alcaloïdes...) bloquent les enzymes nécessaires à la synthèse des protéines du cycle cellulaire ; et les inhibiteurs de topoisomérases (topotécan, irinotécan, étoposide, téniposide) perturbent la structure de l'ADN (Lee et al., 2014; Viswanathan et al., 2012).

La toxicité gastro-intestinale induite par la chimiothérapie peut se manifester par des nausées, de la diarrhée et de la « mucite » qui provoque des ulcérations douloureuses de la muqueuse oro-pharyngée. La physiopathologie de la mucite comprend 5 phases successives (Sonis and Villa, 2018) : initiation, réponse, amplification, ulcération et guérison. L'initiation correspond aux dommages que provoque la chimiothérapie à l'ADN tissulaire dès son administration. En réponse à ces dommages, la production de radicaux libres favorise l'expression de gènes pro-apoptotiques au dépend des gènes anti-apoptotiques. L'apoptose induite favorise la destruction cellulaire et la translocation bactérienne qui vont amplifier la production de cytokines pro-inflammatoires à l'origine des ulcérations muqueuses qui surviennent dans les 7 à 10 jours suivant l'initiation du traitement. La régénération de l'épithélium digestif à partir de la prolifération puis de la différenciation des cellules cryptiques signe la guérison dans les 10 à 20 jours suivant l'arrêt de la chimiothérapie. Chez l'homme, l'augmentation importante de l'apoptose des cryptes est le premier signe histologique visible, suivi d'une réduction de la taille des villosités intestinales et de la profondeur des cryptes dont l'intensité est maximale 3 jours après la fin du traitement (Keefe et al., 2014). Si cliniquement la mucite se manifeste chez près de 4 patients sur 10, sa fréquence réelle est largement sous-estimée du fait de la difficulté que constitue l'exploration du tube digestif. Sa survenue est fortement associée à celle des complications infectieuses, ce qui s'accompagne d'un surcoût important (Elting et al., 2003).

III.2.1. Intérêt de la citrulline plasmatique

La citrulline est un AA, non protéique contenu en faible quantité dans les cucurbitacées. Chez les mammifères, elle est essentiellement produite par les entérocytes, à partir de la glutamine absorbée pendant l'alimentation, qui constitue leur principale source d'énergie (Figure 13). La majorité de cette citrulline est ensuite métabolisée en arginine dans le rein. A jeun et en l'absence d'insuffisance rénale évoluée, la concentration de citrulline plasmatique ($40 \pm 10 \mu\text{mol/l}$) constitue un excellent reflet de la masse entérocytaire fonctionnelle (Crenn et al., 2000). Sa première application chez l'homme en tant que marqueur concernait les patients ayant nécessité une chirurgie de résection de l'intestin à l'origine d'une insuffisance intestinale. Dans les 2 ans suivant cette chirurgie, une citrullinémie $< 20 \mu\text{mol/l}$ était un marqueur de dépendance définitive vis-à-vis de la réalisation de perfusions intraveineuses au domicile, nécessaire au maintien de leur survie (Crenn et al., 2000). Depuis ce marqueur s'est avéré pertinent chez les patients souffrant d'atrophie villositaire (maladie cœliaque, entéropathie liée au HIV), ou d'entéropathie aigüe dont le risque de translocation intestinal est augmenté (malades de réanimation ou recevant une chimiothérapie intense) (Crenn et al., 2008; Piton and Capellier, 2016). Plusieurs études suggèrent que la citrulline est utile pour évaluer la cytotoxicité intestinale des chimiothérapies myeloablatives (Blijlevens et al., 2004; Gondolesi et al., 2006; Lutgens et al., 2005).

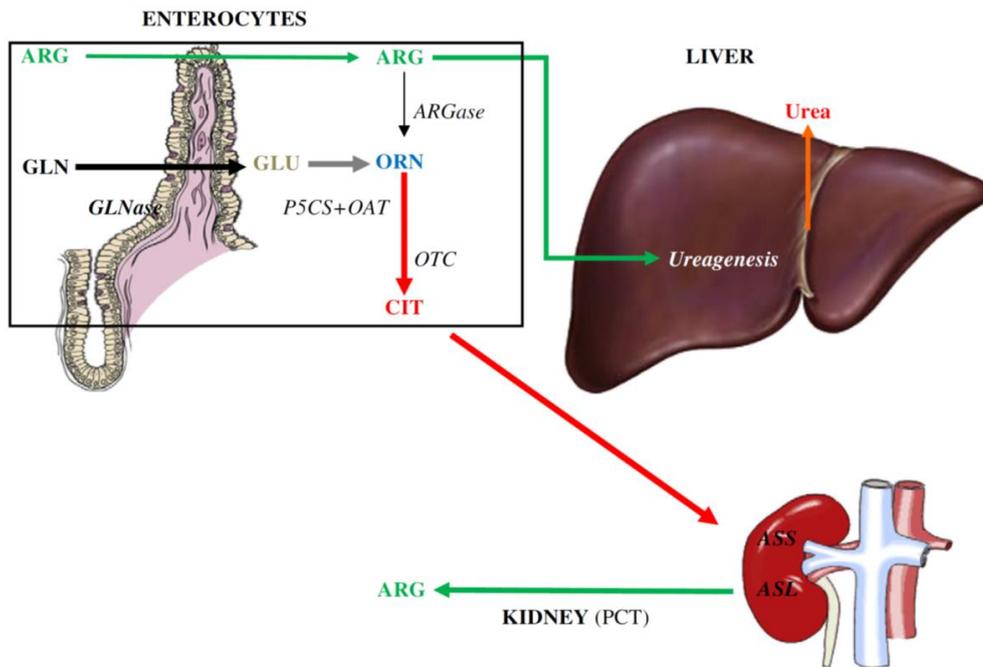


Figure 13. Schéma du cycle du métabolisme de la citrulline. (Crenn et al., 2000)

III.3. CONTEXTE

Plus récemment, notre équipe a montré que l'existence d'une citrulline plasmatique basse avant la réalisation d'une chimiothérapie de conditionnement, précédant une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-CSH), reflétait la présence d'une atteinte intestinale infra-clinique séquellaire des chimiothérapies antérieures utilisées pour obtenir la rémission hématologique des patients (Hueso et al., 2018). Une citrulline basse avant le conditionnement constituait d'ailleurs en post-greffe un facteur de risque indépendant de réaction aigüe du greffon contre l'hôte (GvHDa) et en particulier de GvHDa digestive sévère qui représente la première cause de mortalité chez les transplantés (Hueso et al., 2018, 2019b). La mise en évidence de dommages intestinaux séquellaires pré-greffe nous a, pour cette raison, amené à nous intéresser aux patients atteints de leucémie aigüe myéloïde (LAM) (Hueso et al., 2019a). Ces patients

reçoivent effectivement une chimiothérapie intense dit d'induction, afin d'obtenir une réduction des cellules blastiques (cellules immatures tumorales) à un taux <5%, leur permettant dans un second temps de bénéficier d'une allo-CSH. Cette chimiothérapie intraveineuse associe sept jours de cytarabine et trois jours d'anthracycline (idarubicine, daunorubicine, ou doxorubicine) (Figure 14).

Une étude réalisée par notre équipe a confirmé la diminution de la concentration de citrulline chez les patients atteints de LAM recevant cette chimiothérapie d'induction. Il est important de noter que tous ces patients développent une aplasie fébrile qui nécessite une antibiothérapie systémique dirigée en particulier vers des germes digestifs ayant franchi l'épithélium intestinale par translocation.

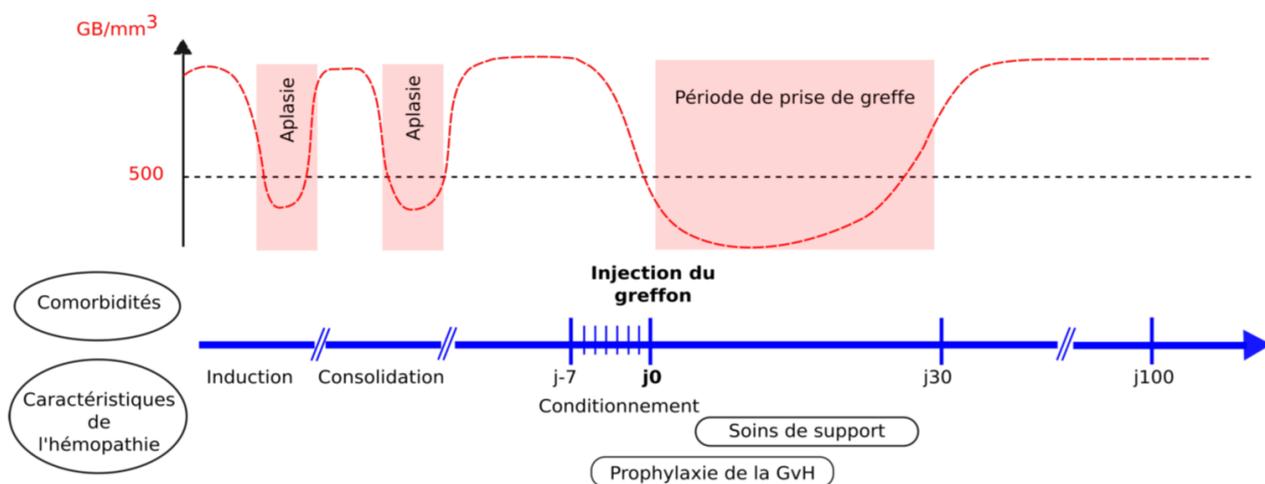


Figure 14. Schémas de la chronologie des soins des LAM. (Hueso et al., 2019a)

III.4. OBJECTIF

Compte tenu de la difficulté que constitue l'étude des conséquences de la chimiothérapie sur l'intestin de ces patients, nous avons mis au point un modèle de souris mimant les effets d'une chimiothérapie d'induction de LAM (Hueso et al., 2019a). L'objectif de la seconde partie de ce travail était d'étudier les conséquences de cette chimiothérapie d'induction sur l'épithélium intestinal de souris et d'évaluer l'apport d'un modèle de souris Tg222 dont le mucus est renforcé.

III.5. MATERIELS ET METHODES

III.5.1. Souris

Les expérimentations animales ont été réalisées selon les recommandations françaises et européennes relatives à l'utilisation et aux soins des animaux utilisés à des fins scientifiques. Elles ont été approuvées par le Comité d'éthique en expérimentation animale de la région Nord-Pas-de-Calais (numéro d'autorisation : 01564.01). Nous avons utilisé des femelles B6D2F1 de 8 à 10 semaines sauvages (WT) et transgéniques Tg222 qui exprimaient en même temps que Muc2 une protéine comprenant 12 domaines CYS consécutifs et la protéine GFP (N° OGM 5287) (Gouyer et al., 2015). Ces souris étaient hébergées dans une animalerie exempte d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) de l'université de Lille, et recevaient un régime standard ad libitum (RM3, Special Diet Services, France).

III.5.2. Chimiothérapie

La chimiothérapie était une association d'aracytine (150mg/kg/j, Accord healthcare) et de doxorubicine (3mg/kg/j, Arrowlabs) administrée par voie intra-

péritonéale pendant 5 et 3 jours consécutifs, respectivement. Les souris contrôles recevaient du PBS par la même voie et durant la même période. Le poids et l'état morphologique des souris était évalué chaque jour jusqu'au sacrifice pratiqué un (J+1), trois (J+3) et cinq (J+5) jours après la fin de la chimiothérapie (Figure15).

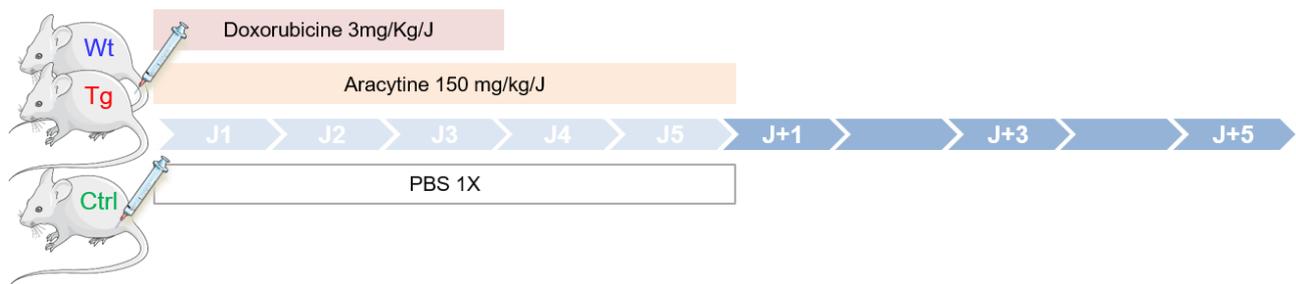


Figure 15. Représentation de la chronologie de chimiothérapie.

III.5.3. Antibiothérapie

Certains groupes de souris recevaient, en plus de la chimiothérapie, une antibiothérapie à large spectre initiée en même temps que celle-ci et poursuivie jusqu'au sacrifice à J+1, J+3 et J+5. La majorité des antibiotiques étaient dilués dans l'eau de boisson que les souris recevaient ad libitum. Comme décrit par Foligné et al. (Foligné et al., 2019), il s'agissait d'une association faite : d'amoxicilline/acide clavulanique avec un rapport de 1 /0,2 (1 g/L, Sandoz), de vancomycine (500 mg/L, Mylan), de métronidazole (1 g/L, B. Braun), et de la ciprofloxacine (200 mg/L, Kabi). Les biberons d'eau étaient protégés de la lumière pour éviter la dégradation de la fluoroquinolone et ils étaient remplacés tous les deux jours. Cette antibiothérapie était complétée par un gavage de 200 μ L d'une solution de PBS 1X préparée quotidiennement et contenant

impénème/cilastatine avec un rapport de 1/1 (250 mg/L, Mylan) (Figure 16). Les souris contrôles recevaient, en plus de la chimiothérapie, de l'eau de boisson standard et du PBS 1X en gavage. L'effet des antibiotiques sur le microbiote étaient vérifiés chaque jour par étalement sérique (1 - 10⁻⁶) des fèces des souris traitées et non traitées, en milieu de culture lysogeny broth (LB) agar et aérobie.

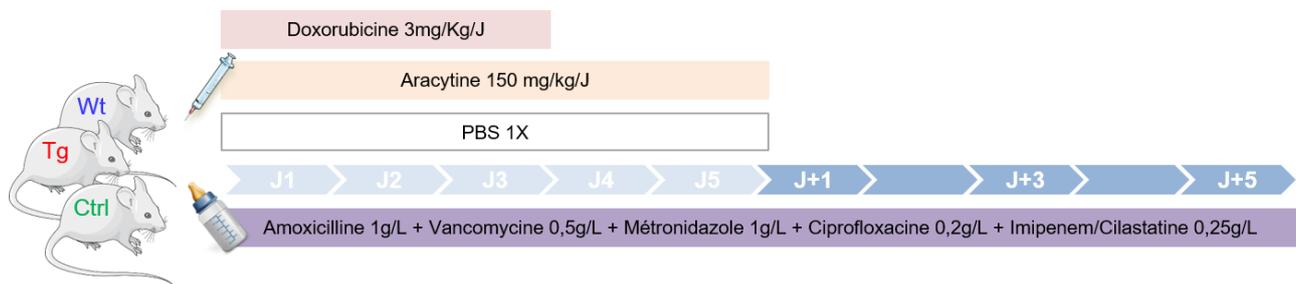


Figure 16. Représentation de la chronologie de l'antibiothérapie.

III.5.4. Prélèvements tissulaires

Les souris étaient sacrifiées soit par anesthésie intra-péritonéale létale (10mg/Kg Xylazine + 100mg/kg Ketamine) pour le prélèvement du sang, soit par dislocation cervicale pour le prélèvement de l'iléon. Le sang était prélevé par ponction intracardiaque dans des tubes froids héparinés. Le plasma était isolé par centrifugation (4000 rpm, 4°C, 10 min) puis conservés à -80°C. L'iléon distal était immédiatement prélevé après le sacrifice, puis lavé avec du PBS 1X froid, avant d'être soit plongé dans du RPMI 1640 froid sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ (isolement des lymphocytes et cytométrie en flux), soit congelé dans de l'azote liquide puis conservé à -80°C (extraction ARN et biopuces), soit fixé par immersion dans

du paraformaldéhyde 4% pendant 18h pour être inclus en paraffine (étude histologique et immunohistochimique).

III.5.5. Dosage de citrulline plasmatique

Le dosage de citrulline plasmatique était effectué en collaboration avec l'Institut de Biochimie et Biologie Moléculaire du Centre de Biologie-Pathologie-Génétique du CHU de Lille. Le dosage de la concentration de citrulline ($\mu\text{mol/L}$) était réalisé sur du plasma préalablement déprotéinisé avec de l'acide sulfosalicylique, par chromatographie en phase liquide à haute performance (colonne Shimadzu C18) combinée avec de la spectrométrie de masse en tandem (AB Sciex 3200 Qtrap) à l'aide du système aTRAQ kit pour l'analyse des acides aminés des fluides physiologiques (AB Sciex). L'acquisition dans le spectromètre de masse était réalisée par contrôle de réactions multiples. L'enregistrement et l'analyse des données étaient réalisés avec le logiciel Analyst v.1.6 (AB Sciex).

III.5.6. Extraction ARN et biopuces

Les ARN totaux étaient extraits des iléons distaux à l'aide du mini-kit RNeasy (QIAGEN) selon les instructions du fabricant. Le rendement et la qualité totaux en ARN étaient évalués sur le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies). Les biopuces étaient effectuées en collaboration avec la Plateforme de Génomique du Centre de Biologie-Pathologie-Génétique du CHU de Lille. Une micro-puce de 8 x 60k de souris (Agilent Technologies) avec 60 oligonucléotides de souris marqués (diapositives 074809_D_F_20171030) a été utilisée pour analyser l'expression génique. Le marquage, l'hybridation et la détection d'ARNc étaient réalisés conformément aux instructions du

fournisseur (Agilent Technologies). Pour chaque micro-puce, des ARNc marqués à la cyanine 3 étaient synthétisés avec le kit de marquage QuickAmp à faible apport en entrée à partir de 50 ng d'ARN total. L'ARN Spike-In était ajouté à tous les tubes et utilisé comme contrôle positif des étapes de marquage et d'amplification. Les ARNc marqués étaient purifiés et 600 ng de chaque ARNc étaient ensuite hybridés et lavés conformément aux instructions du fabricant. Les micropuces étaient numérisées sur un scanner Agilent G2505C et les données extraites à l'aide du logiciel Agilent Feature Extraction© (FE version 10.7.3.1). Les comparaisons statistiques et le filtrage étaient réalisés avec le logiciel Genespring® version GX13.0. (Agilent Technologies). L'expression différentielle des gènes était exprimée en fold-change. Un fold-change >1 avec un $p \leq 0,05$ était considéré comme significatif. Les données brutes ont ensuite été analysées à l'aide des logiciels Ingenuity Pathway Analysis© (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com) et String Network 11.0 (<https://string-db.org/>).

III.5.7. Isolement des lymphocytes

Les LIE étaient isolés à partir des iléons plongés dans du RPMI 1640 froid sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} . Les plaques de Peyer et le tissu adipeux étaient éliminés, puis l'iléon était ouvert longitudinalement et coupé en petits fragments de 0,3 cm de long. Les LIE étaient isolés selon la procédure décrite par Guy-Grand et al (Guy-Grand et al., 1978). Ces fragments iléaux étaient ensuite incubés dans un milieu de culture RPMI 1640 / HEPES (Life Technologies) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF) (Flow Laboratories) et du dithioérythritol imMM (Sigma Chemical). La muqueuse était raclée et dissociée par une rupture mécanique à l'aide d'un barreau magnétique pendant 15 minutes. Les débris de tissu et les agrégats de cellules étaient éliminés par passage sur une colonne de laine de verre (1,6 g) conditionnée en RPMI additionné de 10% de SVF, dans une seringue de 20 ml.

Les lymphocytes de la lamina propria (LPL) étaient obtenus selon la méthode décrite par Van der Heijden et al (Van der Heijden and Stok, 1987). Les fragments iléaux étaient incubés dans du RPMI 1640 additionné d'EDTA (25 mM), de pénicilline-streptomycine (100 UI/ml). Ils étaient agités pendant 20 minutes à la température ambiante pour séparer mécaniquement les LPL des cellules épithéliales et des LIE. Cette procédure de séparation était répétée cinq fois. Les fragments intestinaux étaient ensuite lavés dans du RPMI 1640 supplémenté de SVF à 10% (RPMI-10% de SVF) et incubés pendant 2 heures supplémentaires à 37°C dans du RPMI à 10% de SVF contenant de la collagénase VIII (125 UI/mL, Sigma-Aldrich). Les suspensions intestinales digérées contenant des LPL et les cellules épithéliales restantes étaient filtrées et remises en suspension dans du milieu RPMI-10% SVF supplémenté en antibiotiques. Les lymphocytes (LIE et LPL) étaient isolés des suspensions finales par centrifugation sur une couche de Ficoll (d=1,077; NycoPrep), puis remis en suspension dans du RPMI 1640 contenant 10% de SVF.

III.5.8. Cytométrie en flux

Les lymphocytes étaient marquées à l'aide d'anticorps monoclonaux conjugués : Brilliant Violet 421 anti-Nkp46 (1/10 ; Biolegend, 137611) ; BV 605 anti-TCRB (1/10 ; BD Biosciences, 562840) ; APC anti-TCR $\gamma\delta$ (1/10 ; Biolegend, 118115) ; BV anti-CD3 ϵ (1/10 ; BD Biosciences, 593123) ; BV 785 anti-CD4 (1/10 ; Biolegend, 100551) ; APC/Cyanine 7 anti-CD8 α (1/10 ; Biolgend, 100713) ; PE/Dazzle 594 anti-CD8B (1/10 ; Biolegend, 126621) ; PE anti-CD19 (1/10 ; Biolegend, 115507) ; FITC anti-CD45 (1/10 ; Biolegend, 103107) ; PE/Cy7 anti-CD103 (1/20 ; Biolegend, 121425). Les cellules marquées étaient analysées sur un LSR Fortessa X20 à l'aide du logiciel FACSDiva (BD Biosciences).

III.5.9. Coloration histologique et immunohistochimie

Des coupes de 5 µm d'épaisseur étaient réalisées pour les analyses histologiques et immunohistochimiques. Les colorations utilisées pour l'histologie étaient l'hématoxyline éosine (HE), l'acide périodique Schiff et le bleu alcian (AB-PAS). L'épaisseur de la muqueuse, la profondeur des cryptes et la hauteur des villosités iléales étaient mesurées sur dix champs par coupe bien orientés et choisis de manière aléatoire. Le nombre de cellules caliciformes était déterminé comme le nombre de cellules PAS positives sur dix cryptes et dix villosités par coupe, bien orientées et choisies de manière aléatoire. Pour chaque iléon, les mesures étaient répétées sur trois coupes. L'analyse histologique était réalisée en aveugle.

Les coupes de tissus inclus en paraffine étaient déparaffinées dans du xylène, puis réhydratées par des bains successifs d'éthanol de concentration décroissante. Les sites de liaison non spécifiques étaient saturés en incubant les coupes avec de la sérum-albumine bovine (BSA) 1 % (Sigma-Aldrich, A4503) pendant 45 minutes à température ambiante. Les coupes étaient ensuite incubées avec différents anticorps primaires dilués dans du BSA 1 % pendant une nuit à +4°C : anticorps polyclonal anti-CD3γ (1 :100 ; Invitrogen, PA5-97562) ; anticorps polyclonal anti-claudine 7 (1 :150 ; Invitrogen, 34-9100) ; anticorps polyclonal anti-occludine (1 :200 ; NBP1-87402) ; anticorps anti-PCNA (1 :1000 ; PC10 ab29) ; ou encore dans le mixe TUNEL (50µL/coupe ; Roche 11684795910). Pour le marquage de la CD3γ, claudine 7, de l'occludine et l'étude PCNA (Proliférating cell nuclear antigen), un démasquage des antigènes par la chaleur était préalablement réalisé par immersion des coupes pendant 20 minutes dans du tampon citrate (10 mM sodium citrate, Tween 20 0,05 %, pH 6,0) à 100°C, puis à température ambiante pendant 20 minutes. Les noyaux (bleus) étaient contre-colorés avec Hoescht 33258 (1 :1000 ; Molecular probes, H3569), puis les lames ont été montées avec les lamelles à l'aide d'un milieu de montage (Mowiol).

III.5.10. Imagerie

Les coupes histologiques et immunohistochimiques des iléons ont été analysés à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica TCS LCSM, Leica Microsystems). Les images ont été travaillées de façon identique à l'aide du logiciel Gimp 2.8. L'intensité de la fluorescence était quantifiée en aveugle de la portée d'origine à l'aide du logiciel Image J 1.48 sur des champs bien orientés et choisis de manière aléatoire pour chaque coupe.

III.5.11. Analyses statistiques

Toutes les analyses ont été effectuées en comparant les groupes expérimentaux avec leurs contrôles respectifs, ou les groupes traités avec les non traités grâce à des tests non paramétriques de Mann-Whitney ou de Wilcoxon lorsqu'il s'agissait de souris provenant d'une même portée, à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software Inc.). Les données sont présentées sous forme de médianes. Les différences étaient jugées statistiquement significatives en cas de $p < 0,05$.

III.6. RESULTATS

III.6.1. Impact d'un mucus renforcé sur les dommages intestinaux induits par la chimiothérapie

Sous chimiothérapie la perte de poids (exprimée en pourcentage du poids initial) des souris Wt et Tg était comparable. Elle était maximale à J+1, ne dépassant pas 15%, pour revenir ensuite à 5% à J+5. Chez les souris Ctrl, la concentration de citrulline plasmatique des Tg était supérieure à celle des Wt. Elle diminuait sous chimiothérapie

pour atteindre son minimum à J+1 dans les deux groupes Wt et Tg. A J+3, les Wt et les Tg avaient un taux inférieur au Ctrl mais le taux des Tg était plus élevé que celui des Wt (Figure 18). Le taux continuait à augmenter à J+5, sans être différents entre les deux groupes Wt et Tg (Figure17).

Les dommages muqueux étaient maximaux à J+1 suivant la fin de la chimiothérapie et comparables entre les Wt et les Tg. Par rapport aux Ctrl, la hauteur des villosités étaient significativement diminuées chez les Wt ($p = 0.0095$) et les Tg ($p = 0.0190$), tandis que la profondeur de leurs cryptes étaient augmentées ($p= 0.0381$) (Figure 17). A J+5, ces différences histologiques entre les souris recevant et ne recevant pas la chimiothérapie disparaissaient.

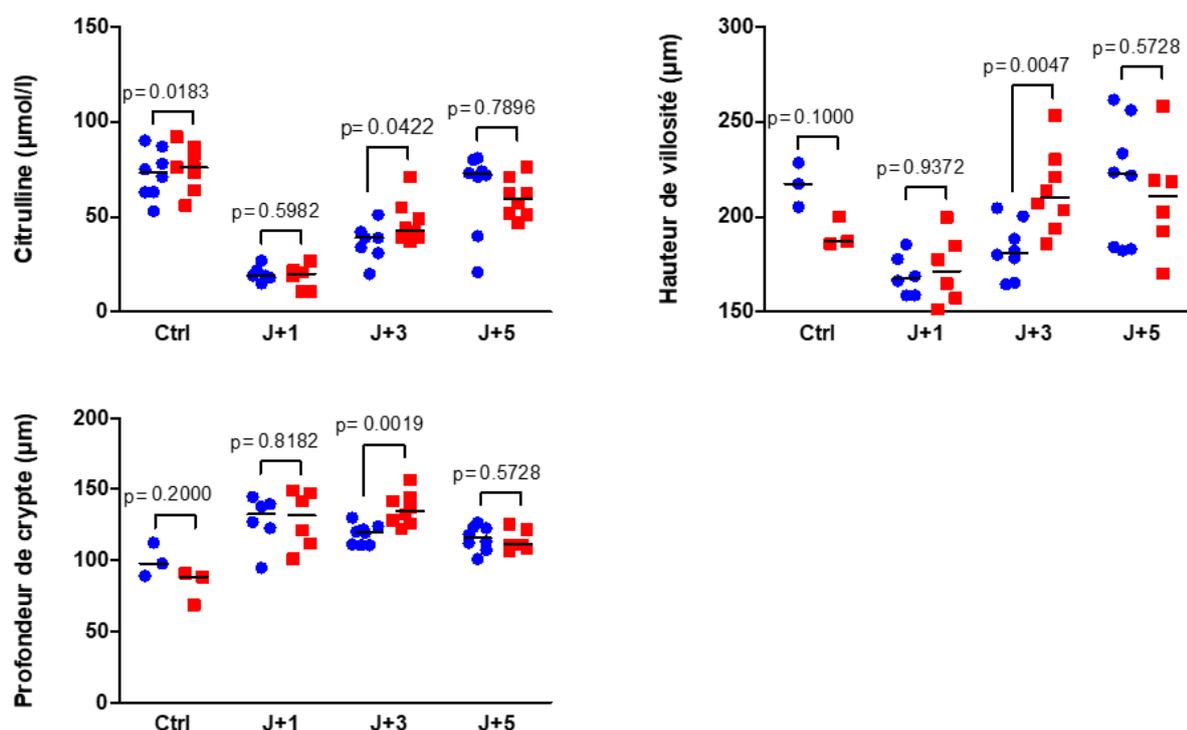


Figure 17. Concentration de citrulline plasmatique, hauteur des villosités et profondeur des cryptes J+1, J+3 et J+5 après la chimiothérapie. Les souris Wt (n=6 ; cercles bleus), Tg222 (Tg) (n=6 ; carrés rouges) ont reçu de la chimiothérapie (Doxorubicine + Aracytine) tandis que leurs sœurs Ctrl (Ctrl ; n=6) ont reçu du PBS 1X. Test de Mann-Whitney et de Wilcoxon apparié.

A J+3, la régénération iléale était plus rapide chez les Tg par rapport à leurs sœurs WT, avec des villosités plus hautes, des cryptes plus profondes et des cellules caliciformes plus nombreuses (Figure 18). Les cryptes des Tg comme des WT étaient plus profondes que celles des Ctrl. Le rapport de la hauteur des villosités sur la profondeur des cryptes ainsi que le nombre de cryptes par champ étaient inférieurs chez les souris recevant la chimiothérapie par rapport aux Ctrl. Le nombre de cellules PCNA positives par crypte était plus élevé chez les Tg que chez les WT et globalement plus élevé que chez les contrôles. L'apoptose était comparable entre ces deux groupes recevant la chimiothérapie et s'avérait supérieure à celle des Ctrl (Figure 18). Dans les villosités comme dans les cryptes, il existait une restauration plus rapide de la protéine claudine 7 chez les Tg comparées

aux Wt, dont à la différence des Tg, le marquage était inférieur à celui des Ctrl. En revanche, l'expression de l'occludine n'était pas différente entre les deux groupes recevant la chimiothérapie où il s'avérait plus faible que celle des Ctrl (Figure 19).

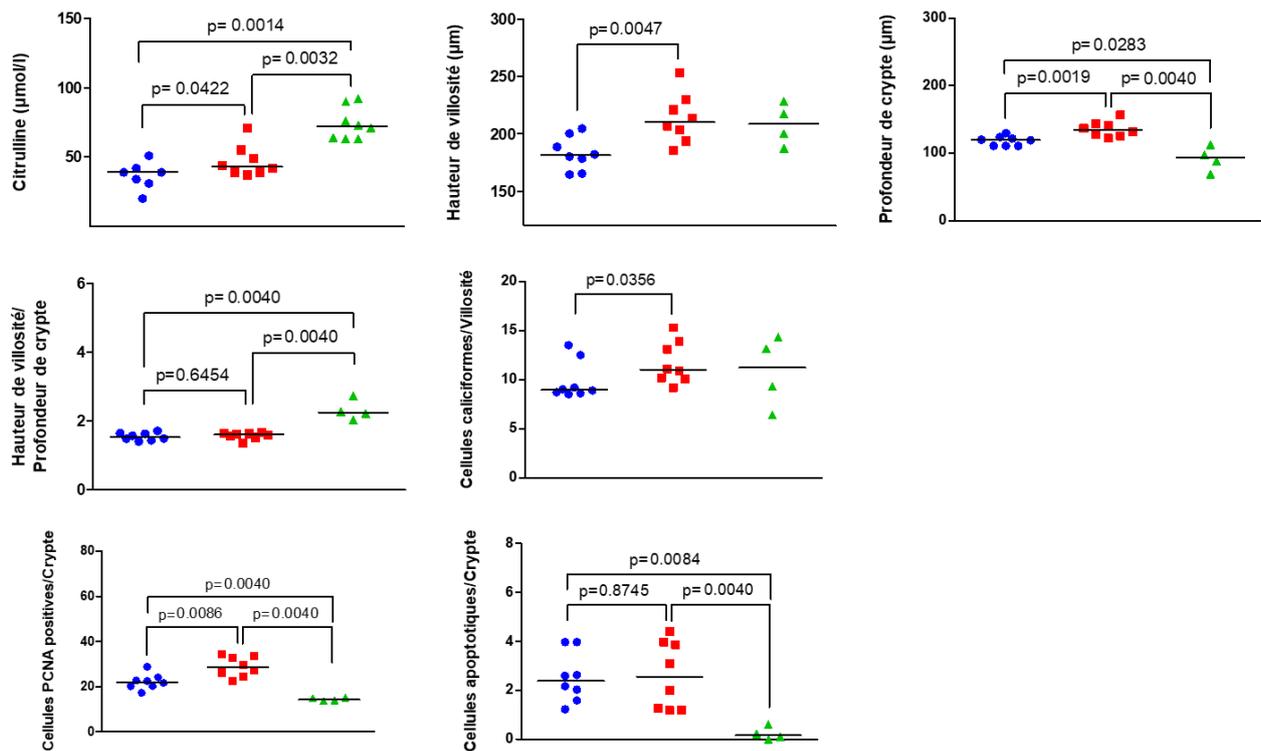


Figure 18. Histologie iléale à J+3 après la chimiothérapie. Les souris Wt (n=8 ; cercles bleus), Tg222 (Tg) (n=8 ; carrés rouges) ont reçu de la chimiothérapie (Doxorubicine + Aracytine) tandis que leurs sœurs Ctrl (n=4 ; triangles verts) ont reçu du PBS 1X. Test de Mann-Whitney et de Wilcoxon apparié.

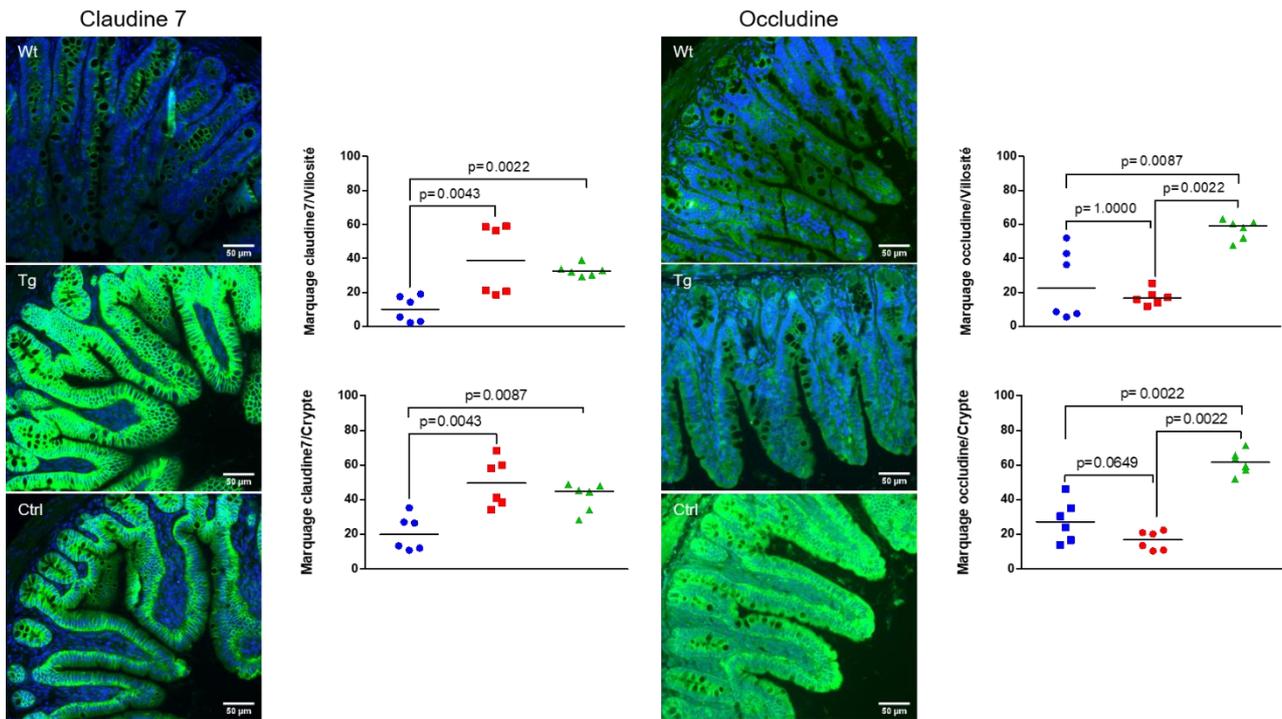
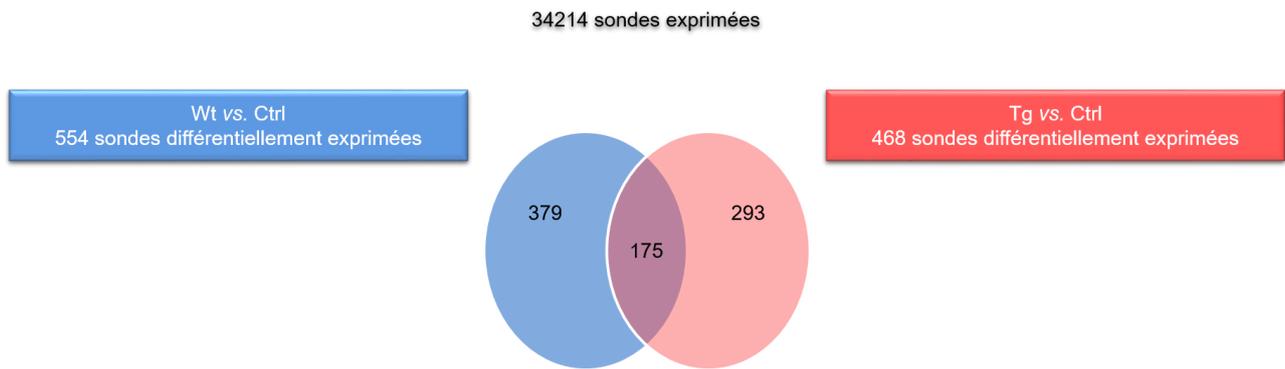


Figure 19. Immunomarquage des jonctions serrées au niveau de l'iléon à J+3 après la chimiothérapie. Les souris Wt (n=6 ; cercles bleus), Tg222 (Tg) (n=6 ; carrés rouges) ont reçu de la chimiothérapie (Doxorubicine + Aracytine) tandis que leurs sœurs Ctrl (n=6 ; triangles verts) ont reçu du PBS 1X. Le marquage de la claudine 7 et de l'occludine est vert et la contre-coloration nucléaire est bleue. La quantification de l'intensité de l'immunomarquage a été effectuée par délimitation de muqueuses sur le logiciel Image J. Test de Mann-Whitney et de Wilcoxon apparié.

L'analyse comparative du transcriptome des iléons distaux totaux ne montrait d'expression différentielle des gènes lorsqu'on comparait : 1. les Wt et les TG ne recevant pas de chimiothérapie ; 2. les Wt et les TG recevant la chimiothérapie. Par contre, la chimiothérapie entraînait la dérégulation de nombreux gènes par rapport à l'absence de chimiothérapie chez les Tg comme chez les Wt. Les Figures 20A et 20B montrent cette expression différentielle du nombre de sondes et de gènes, respectivement, chez les Wt (n=379), les Tg (n=293) et chez les deux à la fois (n=175). Les principaux processus biologiques dérégulés par la chimiothérapie étaient ceux de la réponse au stress, de la réponse immunitaire et de l'inflammation (Figures 20B et Tableau 1).

A



B

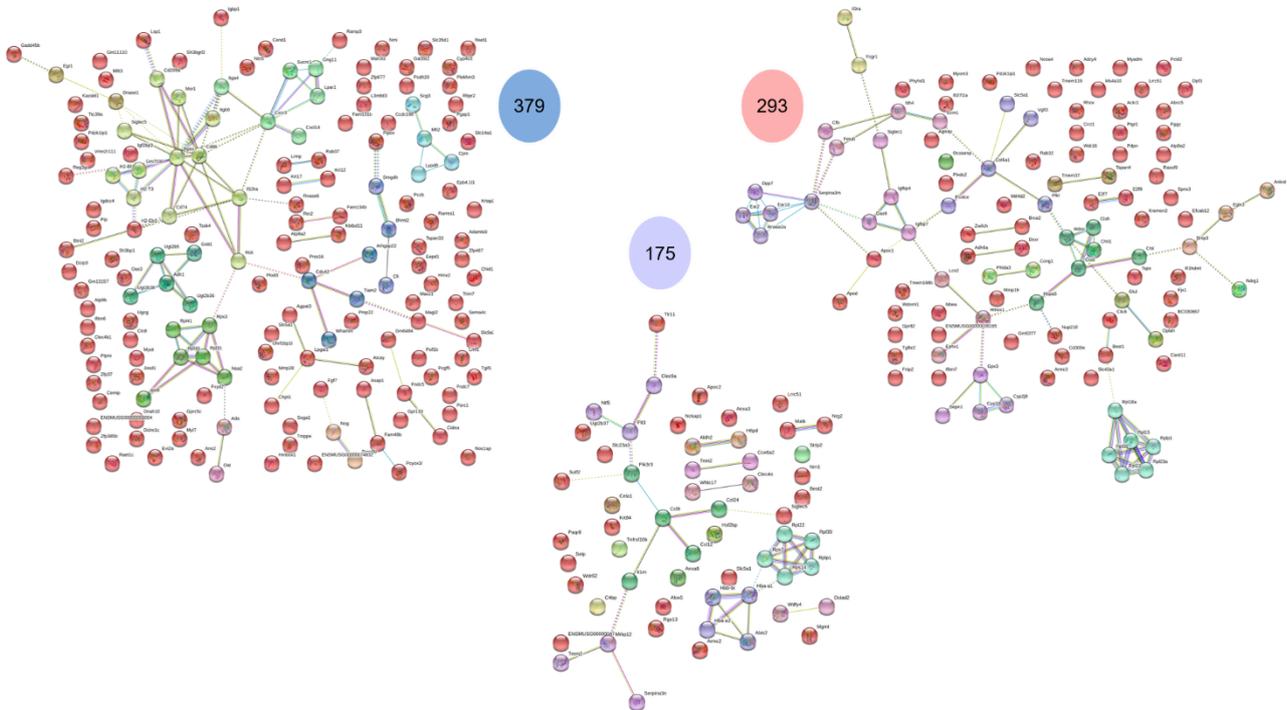


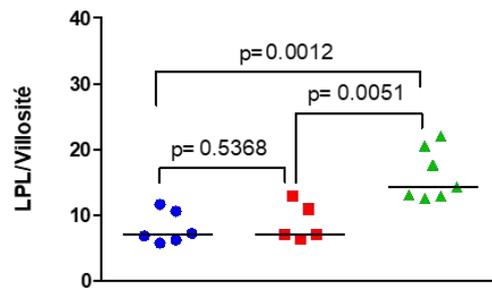
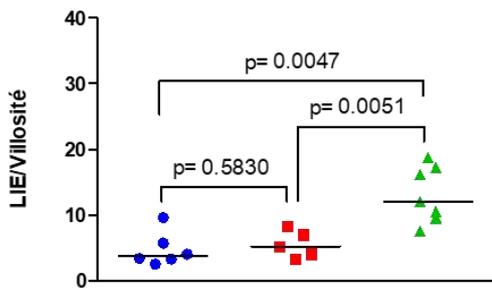
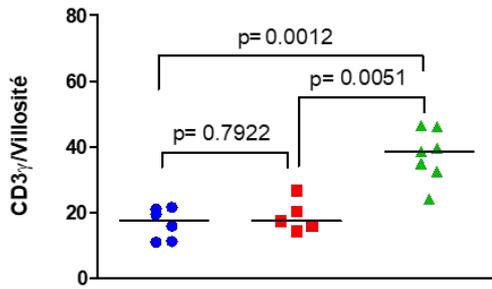
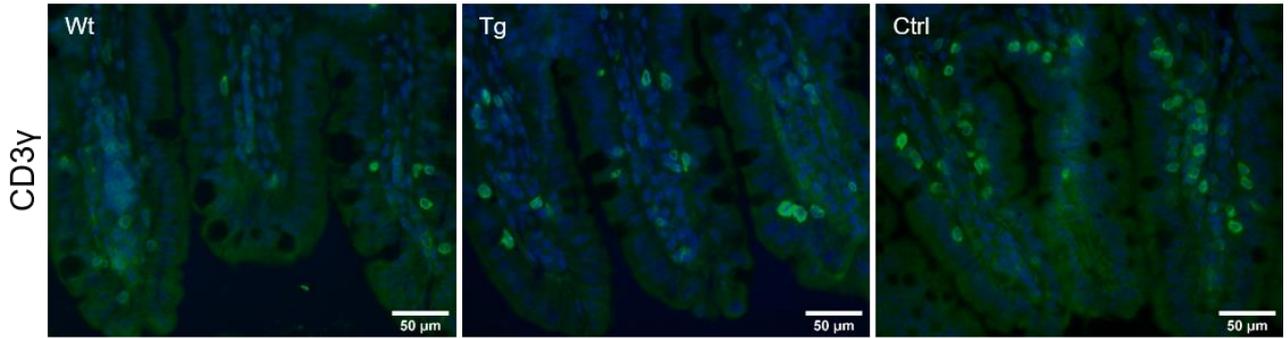
Figure 20. Transcriptome iléal à J+2.5 après chimiothérapie. (A) Représentation du nombre de sondes différentiellement exprimées sous chimiothérapie par rapport à l'absence de chimiothérapie chez les Wt (n=5 ; cercle bleu), chez les TG (n=5 ; cercle rouge) et chez les deux à la fois (intersection). (B) Représentation des gènes différentiellement exprimés en fonction des voies de signalisation et des processus biologiques référencés dans le logiciel String Network V11.0. L'expression est considérée significativement différentes si le Fold-Change >1 et $p \leq 0.05$.

Processus Biologique	Nombre de gènes observés	Nombre de gènes total	P-Valeur ajustée
Réponse au stress	21	2899	0.0016
Processus du système immunitaire	19	1703	1.97e-05
Réponse immunitaire innée	9	534	0.0022
Réaction inflammatoire	10	454	0.0012
Réponse inflammatoire aiguë	3	76	0.0352
Chimiotaxie des monocytes	3	31	0.0113
Chimiotaxie des lymphocytes	3	40	0.0162
Chimiotaxie des neutrophiles	3	58	0.0252
Réponse cellulaire au stimulus des cytokines	7	676	0.0469
Réponse cellulaire à l'interleukine-1	3	90	0.0469
Régulation positive de la sécrétion d'interféron alpha	2	9	0.0215
Différenciation érythrocytaire	4	87	0.0113
Migration des leucocytes	4	186	0.0415
Différenciation cellulaire myéloïde	5	229	0.0215
Hématopoïèse	7	600	0.0334
Réponse cellulaire au facteur de nécrose tumorale	4	160	0.0319
Réponse aux bactéries	7	566	0.0283
Transport d'oxygène	2	8	0.0215
Traduction cytoplasmique	4	55	0.0032
Voie de signalisation du récepteur de surface cellulaire	13	1683	0.0215
Voie de signalisation de la protéine tyrosine kinase du récepteur transmembranaire	6	360	0.0215
Régulation de l'activité catalytique	14	2057	0.0277

Tableau 1. Processus biologiques impactés par la chimiothérapie dans l'iléon lors de l'étude du transcriptome.

L'étude du système immunitaire iléal montrait un nombre de cellules lymphocytaires CD3 γ + significativement plus faible chez les souris Tg et Wt comparées aux Ctrl. Cette diminution concernait autant les LIE que les LPL. Aucune différence quantitative des lymphocytes n'était observée entre les Tg et les Wt (Figure 21A). La proportion des différentes populations et sous-populations composant les LIE et les LPL étaient comparables chez les Tg, les Wt et les Ctrl (Figure 21B).

A



B

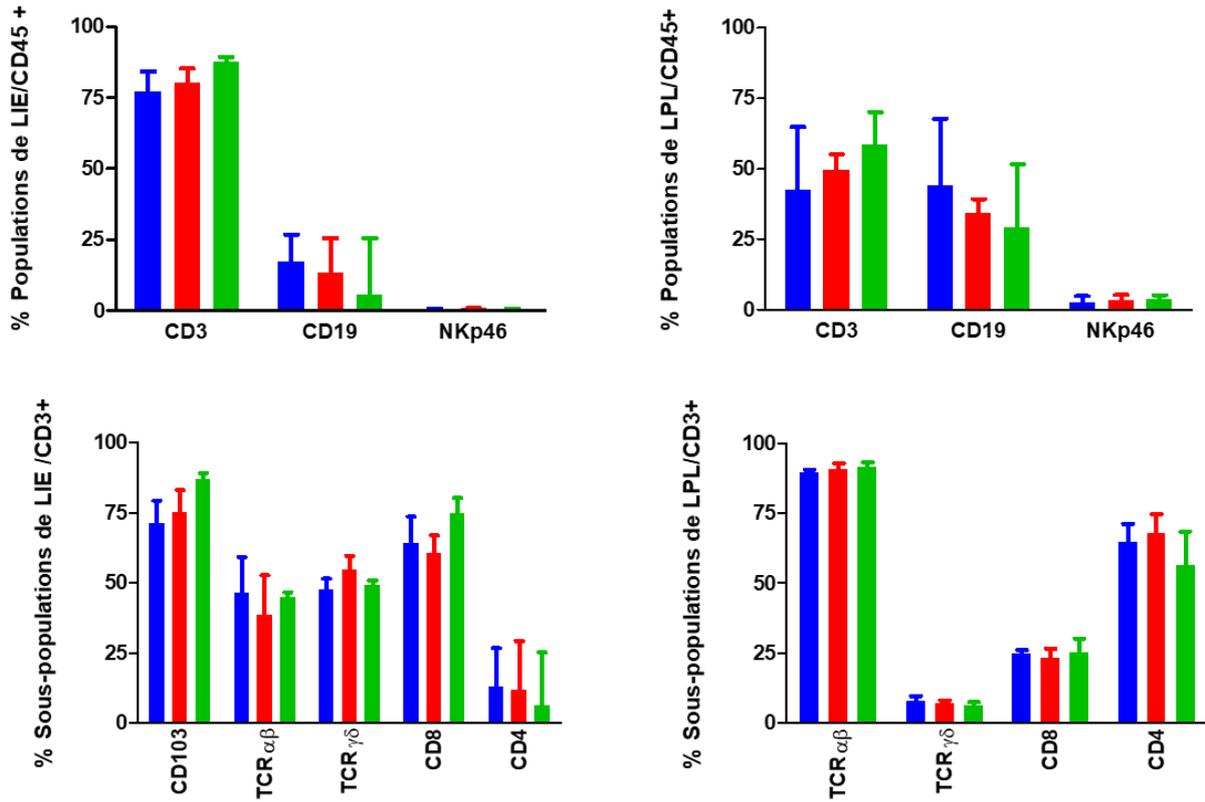


Figure 21. Système immunitaire de la muqueuse iléale à J+2.5 après la chimiothérapie. Les souris Wt (n=5 ; cercles bleus), Tg222 (Tg) (n=6 ; carrés rouges) ont reçu de la chimiothérapie (Doxorubicine + Aracytine) tandis que leurs sœurs Ctrl (n=7 ; triangles verts) ont reçu du PBS 1X. (A) Immunomarquage CD3 γ sur des coupes d'iléon. Le marquage CD3 γ est vert et la contre-coloration nucléaire est bleue. La quantification des cellules CD3 γ a été effectuée sous l'objectif 40X du microscope à fluorescence (B) Cytométrie en flux de LIE et LPL de lysats iléaux totaux. Test de Mann-Whitney et de Wilcoxon apparié.

Analyse des résultats

Afin d'évaluer l'impact propre de la chimiothérapie d'induction de LMA sur la barrière intestinale, nous avons reproduit cette cure d'induction chez des souris, mais sans leur administrer aucun antibiotique. Nous avons constaté chez ces souris une perte de poids et de masse fonctionnelle entérocytaire illustrée par la diminution des taux de citrulline et de la hauteur des villosités, qui s'avérait maximale le jour suivant la fin de la chimiothérapie (J+1) pour s'améliorait ensuite.

En l'absence de chimiothérapie (souris Ctrl), une citrulline plus élevée chez les souris Tg que chez les Wt suggérait l'existence d'une masse entérocytaire plus importante chez les souris sécrétant un mucus renforcé. Cependant, l'analyse histologique (hauteur des villosités et profondeur des cryptes) d'un nombre certainement trop faible de souris Ctrl (n=6) ne permettait pas de le confirmer.

Trois jours après la fin de la chimiothérapie, les souris Wt comme Tg montraient des signes de régénération de l'épithélium se manifestant par une profondeur de crypte plus importante et un rapport hauteur des villosités sur profondeur des cryptes plus faible par rapport aux souris n'en recevant pas. Cependant, la masse entérocytaire et la repousse villositaire (citrulline, hauteur des villosités, PCNA et claudine 7) apparaissait plus importante chez les Tg que chez les Wt. A la différence de la claudine 7 dont l'expression chez les Tg n'était pas différente des Ctrl, celle de l'occludine restait significativement inférieure. Ces données suggèrent l'existence de cinétiques de renouvellement différentes en fonction du type de protéine de jonction. Une étude récente le confirme en montrant que le renouvellement des claudines se fait de manière continue par polymérisation extracellulaire sur la trame résiduelle existante, tandis que celui de l'occludine se fait par polymérisation intracellulaire en remplacement de la trame détruite (Van Itallie et al., 2019). Une étude de ces protéines de jonction à J+1 et à J+5

permettrait de confirmer qu'il s'agit effectivement d'une différence liée à leur mode de renouvellement.

L'étude du transcriptome n'a permis de mettre en évidence ni les gènes, ni les voies métaboliques impliquées dans la meilleure régénération épithéliale constatée chez les Tg. Cette faible rentabilité de l'étude du transcriptome pouvait être liée : 1. Au nombre insuffisant d'échantillons analysés (3 à 5 par groupe Wt et Tg, avec et sans chimio) ; 2. Au choix d'effectuer cette analyse à J+2,5, c'est à dire juste avant que la différence de régénération histologique soit maximale entre les Wt et les Tg ; 3. A l'analyse de lysats d'iléons totaux contenant non seulement la muqueuse, mais également d'autres tissus (vaisseaux, nerf, éléments figurés du sang, tissus musculaire, adipeux et conjonctif). Cette analyse du transcriptome a néanmoins permis d'identifier que les voies de la réponse immunitaire étaient impliquées au décours de la chimiothérapie.

L'étude des lymphocytes CD3 γ ⁺ par immunomarquage nous a permis de constater que leur nombre diminuaient de façon comparable sous chimiothérapie, dans l'épithélium comme dans la lamina propria, chez les TG comme chez les Wt par rapport aux Ctrl. Cependant, l'étude de cytométrie en flux des LIE et des LPL ne montrait pas de différence dans la distribution des populations lymphocytaires, et ce quel que soit le groupe ou le traitement considérés. Des données récentes suggèrent pourtant l'implication du GALT dans la réparation intestinale de colite induite chez la souris (L. Wang et al., 2015).

Au total, ces résultats montrent : 1. qu'un mucus renforcé n'a pas d'influence sur les dommages initiaux constatés dans l'épithélium intestinal après cette chimiothérapie, puisqu'ils étaient maximums et comparables à J+1 chez les Tg et les Wt ; 2. qu'un mucus renforcé permet une régénération villositaire plus rapide. En revanche nous n'avons pas été capable de mettre en évidence le ou les mécanismes endogènes qui explique(nt) cette meilleure régénération.

Mais la restauration de la barrière intestinale ne dépend pas seulement de facteurs endogènes, elle dépend également de facteurs exogènes, et entre autre du microbiote (Patel et al., 2012; Sánchez de Medina et al., 2013; Turner, 2009). Dans la suite de ce travail, notre but a donc été de déterminer si l'effet bénéfique du mucus renforcé persistait après avoir éliminé le microbiote de ces souris.

III.6.2. Impact du mucus renforcé sur les dommages intestinaux induits par la chimiothérapie après éradication du microbiote intestinal par les antibiotiques

A J+3, les concentrations de citrulline plasmatique des Tg et des Wt étaient comparables, mais inférieures aux Ctrl. On ne constatait aucune différence dans la hauteur des villosités, la profondeur des cryptes ou le nombre de cellules caliciformes entre les Tg et les Wt (Figure 22). Le rapport hauteur des villosités sur profondeur des cryptes était supérieur chez les Tg et les Wt par rapport aux Ctrl. L'immunomarquage des cellules apoptotiques était augmenté chez les souris Tg par rapport aux Wt, tandis que celui des PCNA était comparable (Figure 23). Dans les villosités et les cryptes, l'expression de la claudine 7 était plus faible chez les Tg et les Ctrl que chez les Wt. L'expression de l'occludine était plus faible chez les Tg que chez les Wt et les Ctrl qui étaient comparables entre elles (Figure 24).

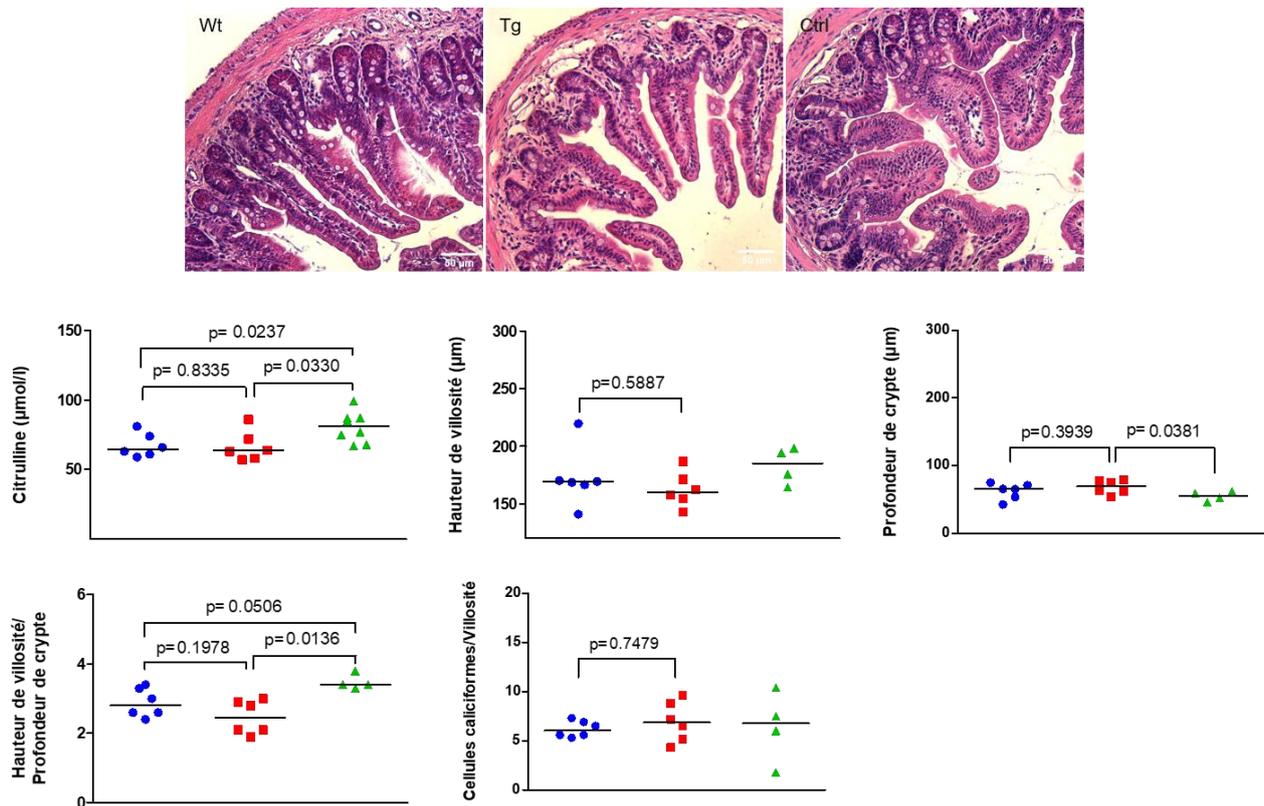


Figure 22. Histologie iléale sous antibiotiques à J+3 après la chimiothérapie. Les souris Wt (n=6 ; cercles bleus), Tg222 (Tg) (n=6 ; carrés rouges) ont reçu de la chimiothérapie (Doxorubicine + Aracytine) tandis que leurs sœurs Ctrl (n=4 ; triangles verts) ont reçu du PBS 1X. Toutes les souris ont reçu le traitement antibiotique (Amoxicilline/Acide Clavulanique + Vancomycine + Metronidazole + Ciprofloxacine + Impénème/cilastatine). Coloration HE (Hématoxyline Eosine). Test de Mann-Whitney et de Wilcoxon apparié.

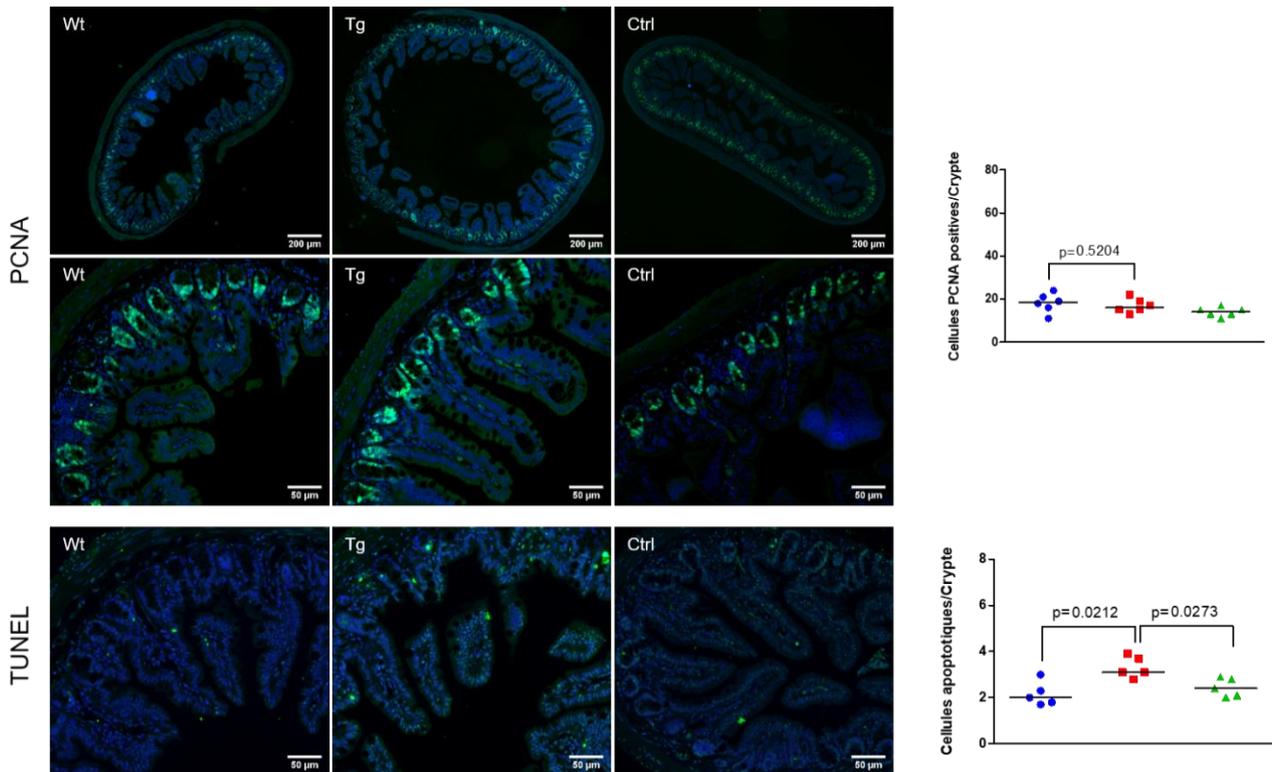


Figure 23. Immunomarquage de la prolifération et l'apoptose au niveau des iléons sous antibiotiques à J+3 après la chimiothérapie. Les souris Wt (n=6 ; cercles bleus), Tg222 (Tg) (n=6 ; carrés rouges) ont reçu de la chimiothérapie (Doxorubicine + Aracytine) tandis que leurs sœurs Ctrl (n=6 ; triangles verts) ont reçu du PBS 1X. Toutes les souris ont reçu le traitement antibiotique (Amoxicilline/Acide Clavulanique + Vancomycine + Metronidazole + Ciprofloxacine + Impénème/cilastatine). Le marquage des cellules PCNA positives et apoptotiques est vert et la contre-coloration nucléaire est bleue. La quantification des cellules immunomarquées a été effectuée sous l'objectif 40X du microscope à fluorescence. Test de Mann-Whitney et de Wilcoxon apparié.

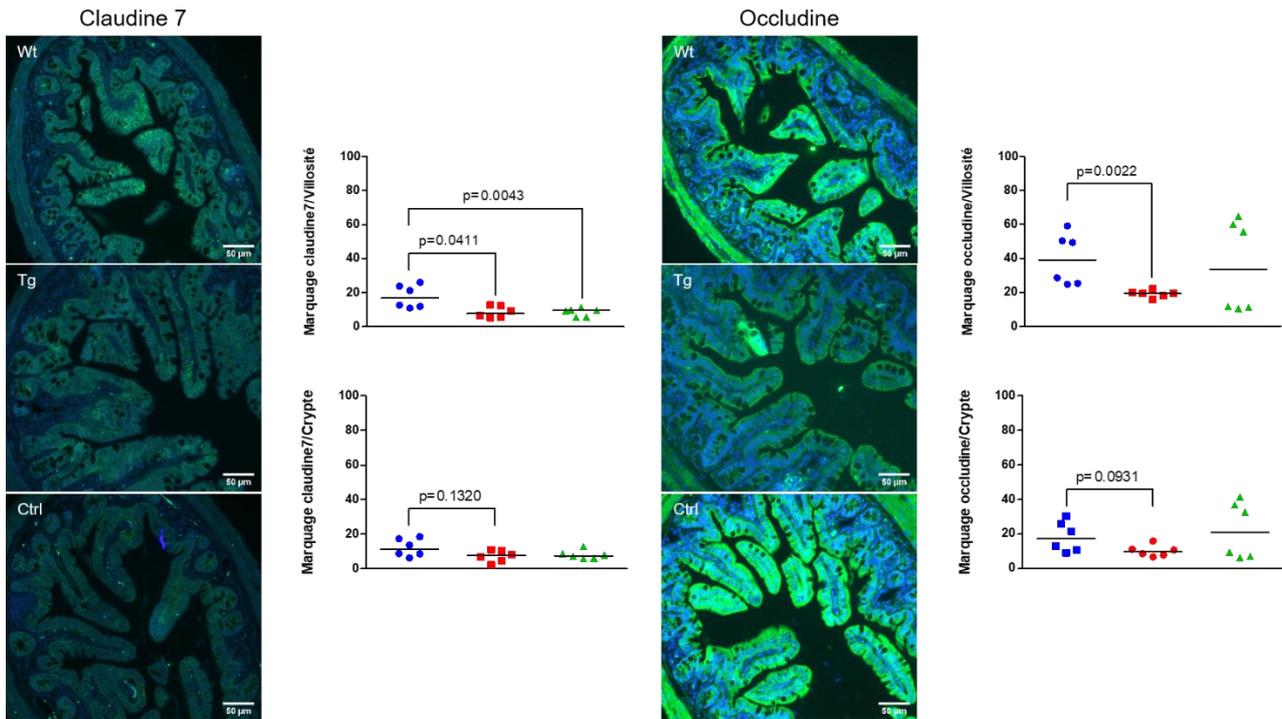


Figure 24. Immunomarquage des jonctions serrées sous antibiotiques au niveau des iléons à J+3 après la chimiothérapie. Les souris Wt (n=6 ; cercles bleus), Tg222 (Tg) (n=6 ; carrés rouges) ont reçu de la chimiothérapie (Doxorubicine + Aracytine) tandis que leurs s eurs Ctrl (n=6 ; triangles verts) ont reçu du PBS 1X. Toutes les souris ont reçu le traitement antibiotique (Amoxicilline/Acide Clavulanique + Vancomycine + Metronidazole + Ciprofloxacine + Imipénème/cilastatine). Le marquage de la claudine 7 et de l'occludine est vert et la contre-coloration nucléaire est bleue. La quantification de l'intensité de l'immunomarquage a été effectu e par délimitation de muqueuses sur le logiciel Image J. Test de Mann-Whitney et de Wilcoxon apparié.

Analyse des résultats

Ne disposant pas de souris axéniques nous permettant de nous affranchir du microbiote intestinal pour réaliser cette expérimentation, nous avons choisi d'administrer une association d'antibiotiques par voie orale dont l'efficacité a pu être démontrée. Cependant, l'utilisation d'une antibiothérapie à large spectre nous permettait de nous rapprocher davantage de la réalité clinique des patients recevant une chimiothérapie de conditionnement de LAM puisqu'ils nécessitent constamment une antibiothérapie pour aplasie fébrile le plus souvent secondaire à des germes d'origine digestive.

Avec cette antibiothérapie à large spectre administrée par voie orale, les souris Wt et Tg montraient, trois jours après la fin de la chimiothérapie, des signes de régénération de l'épithélium (profondeur de crypte plus importante et rapport villosités sur cryptes plus faible), par rapport aux souris Ctrl sans chimiothérapie. Cependant, l'antibiothérapie annulait l'effet du transgène sur la régénération villositaire, puisque les taux de citrulline, la hauteur des villosités et le nombre de cellules PCNA étaient comparables chez les Tg et WT. Par contre, l'expression de la claudine 7, qui était plus élevée chez les Tg dans l'expérimentation sans antibiotiques, était cette fois moins élevée sous antibiotiques par rapport aux Wt qui montraient également une expression d'occludine supérieure. Des données chez la souris montrent que l'administration d'un traitement antibiotique à large spectre provoque une activation de l'inflammasome NLRP3 avec autophagie responsable de perturbations des jonctions serrées intestinales se manifestant notamment par une diminution d'expression d'occludine, des claudines et de ZO1 (Feng et al., 2019).

Sous antibiotiques, on constatait chez les souris Tg et Wt, une diminution importante du nombre de cellules caliciformes, comme cela a été constaté chez les souris axéniques dont la couche de mucus est plus fine que celle des souris sauvages (Kandori et al., 1996; Szentkuti et al., 1990). Bien que la couche de mucus ait longtemps été

considérée comme une barrière passive sécrétée sous la seule dépendance des cellules caliciformes, différentes études montrent que la différenciation et la sécrétion de celles-ci sont fortement influencées par la présence du microbiote intestinal (Kim and Ho, 2010b; McCauley and Guasch, 2015; Schroeder, 2019). La toxine cholérique et celle de la listéria, ont été décrites comme de puissants inducteurs de la production de mucine par les cellules caliciformes (Kim and Ho, 2010b; McCauley and Guasch, 2015; Schroeder, 2019). La nature des glycanes fixés sur les molécules de mucines constituent une source de nutriments permettant de sélectionner et de favoriser les bactéries qui peuvent spécifiquement s'y lier et les dégrader (Kim and Ho, 2010b; McCauley and Guasch, 2015; Schroeder, 2019). Ceci pourrait expliquer pourquoi nos souris Tg222 semblent favoriser le développement des lactobacilles (Gouyer et al., 2015) et pourquoi à J+3 après la chimiothérapie leur flore iléale adhérente contenait une concentration plus importante de *Clostridium leptum* que les Wt (Hueso et al., 2019a).

Indépendamment des groupes Tg ou Wt considérés, ces résultats suggéraient un effet propre des antibiotiques sur la réponse de la muqueuse intestinale soumise à une chimiothérapie. Bien que ces expérimentations n'aient pas été menées sur des groupes contemporains, nous avons, dans la suite, comparé les résultats obtenus avec et sans antibiotiques en poolant les données des Wt et des Tg, afin de juger de cet effet propre aux antibiotiques.

III.6.3. Impact de l'éradication du microbiote intestinal sur les dommages intestinaux induits par la chimiothérapie

Chez les Ctrl la concentration de citrulline semblait comparable chez les souris recevant ou non des antibiotiques. Par contre, l'usage des antibiotiques semblait limiter la chute de la citrulline et permettre sa restauration plus rapide à J+3 et J+5 après la chimiothérapie (Figure 25). De même, la diminution de la taille des villosités à J+1 après la chimiothérapie semblait en proportion moindre sous antibiotiques comparée aux Ctrl, mais leur repousse semblait meilleure à J+3 sans antibiotiques. Les signes de régénération de l'épithélium (profondeur de crypte plus importante et rapport hauteur de villosité sur profondeur de crypte plus faible) étaient plus importants chez les souris ne recevant pas versus celles recevant les antibiotiques, qu'il s'agisse des Ctrl ou des souris à J+1 et J+3 après la chimiothérapie (Figure 25 et 26).

A J+3 après la chimiothérapie l'usage des antibiotiques semblait également diminuer le nombre de cellules caliciformes et de cellules PCNA positive. Le nombre de cellules apoptotiques ne semblaient pas différentes chez les souris recevant la chimiothérapie, mais il augmentait chez les souris Ctrl recevant des antibiotiques. L'expression cryptique de la claudine 7 et de l'occludine semblaient diminuées sous antibiotiques, que les souris reçoivent ou non la chimiothérapie. (Figure 26).

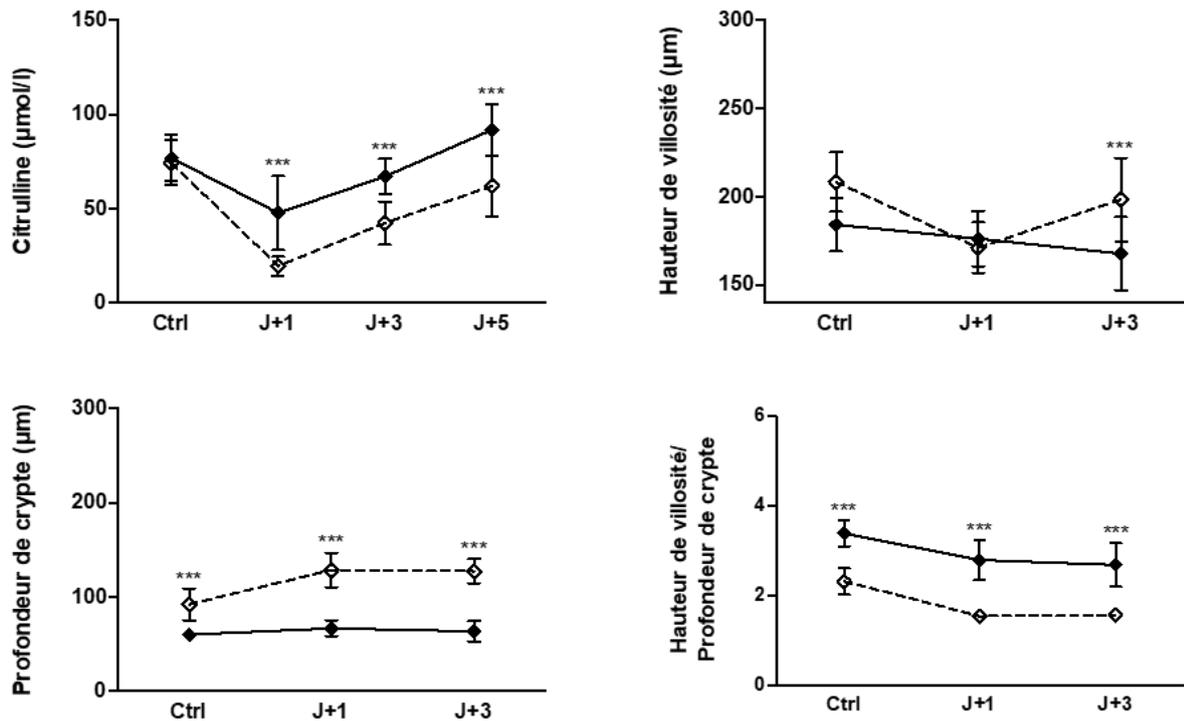


Figure 25. Comparaison des citrulline plasmatiques, des hauteurs de villosités des profondeurs de cryptes et du rapport hauteur de villosité/profondeur de crypte à J+1, J+3 et J+5 après la chimiothérapie avec et sans antibiotiques. Les souris Wt et Tg222 (Tg) ont reçu de la chimiothérapie (Doxorubicine + Aracytine) tandis que les Ctrl ont reçu du PBS 1X. Les souris ayant reçu des antibiotiques (Amoxicilline/Acide Clavulanique + Vancomycine + Metronidazole + Ciprofloxacine + Impipénème/cilastatine) (losanges pleins et ligne continue) sont comparées aux souris n'en ayant pas reçu (losanges vides et ligne discontinue). Test de Mann-Whitney et de Wilcoxon apparié * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

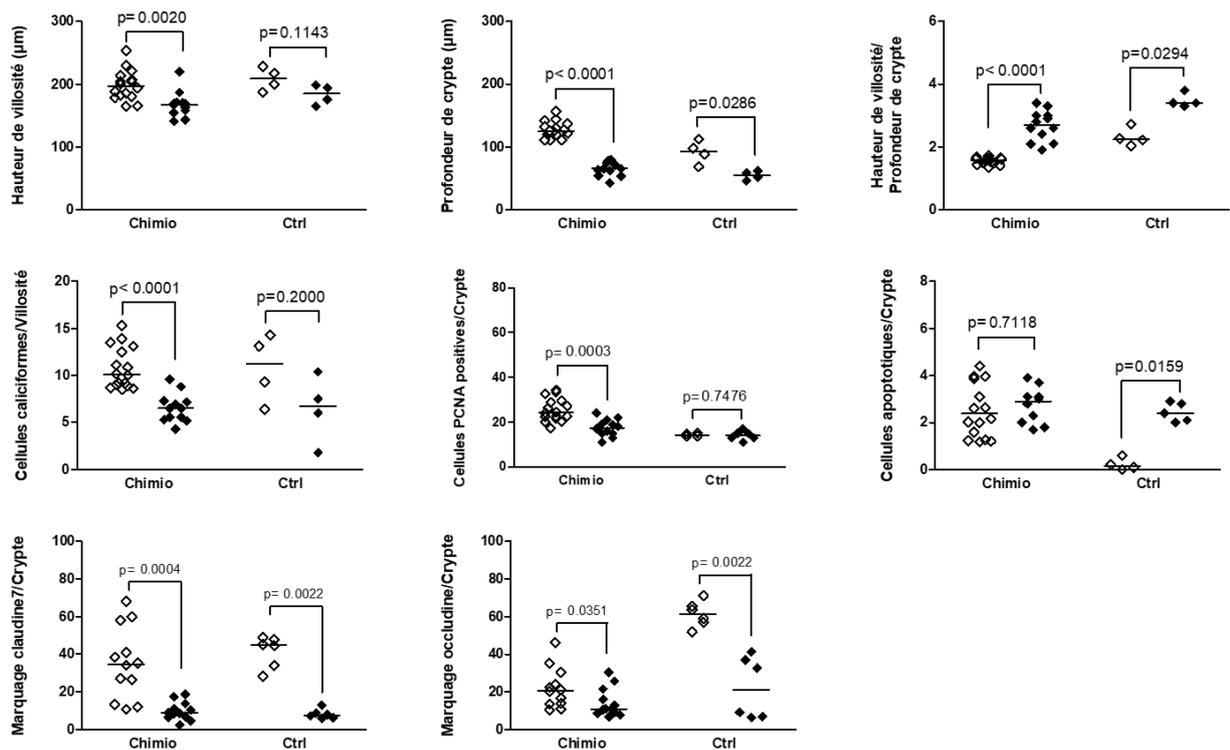


Figure 26. Comparaison des paramètres histologiques des iléons murins à j+3 après la chimiothérapie avec et sans antibiotiques. Les souris Wt et Tg222 (Tg) ont reçu de la chimiothérapie (Doxorubicine + Aracytine) tandis que les Ctrl ont reçu du PBS 1X. Les souris ayant reçu des antibiotiques (Amoxicilline/Acide Clavulanique + Vancomycine + Metronidazole + Ciprofloxacine + Impénème/cilastatine) (losanges pleins) sont comparées aux souris n'en n'ayant pas reçu (losanges vides). Test de Mann-Whitney et de Wilcoxon apparié.

Analyse des résultats

Cette analyse poolée de données non contemporaines suggère que le microbiote :

1. en condition basale, semble stimuler le renouvellement intestinale (profondeur des cryptes plus importante et hauteur de villosités sur profondeur de cryptes plus faible sans antibiotiques); 2. sous chimiothérapie, semble potentialiser les dommages intestinaux initiaux (diminution de la citrulline et de la taille des villosité à J+1), mais inversement semble favoriser la régénération épithéliale à la phase de récupération (hauteur de villosités plus importante, nombre de cellules caliciformes et de cellules PCNA positives plus élevé, expression de claudine 7 et d'occludine plus importante).

Cet effet protecteur en condition physiologique et aggravant en condition d'agression n'a jamais jusqu'alors été rapporté en contexte de chimiothérapie, mais a pu être décrit sur un modèle murin de colite au DSS. En effet, chez des souris recevant des antibiotiques, Hernández-Chirlaque et al. ont pu montrer que la dysbiose induite augmente la translocation bactérienne traduisant une altération de la fonction de barrière, mais qu'elle réduit considérablement l'inflammation intestinale provoquée par le DSS (sulfate de dextrane sodique) (Hernández-Chirlaque et al., 2016) .

III.7. CONCLUSION

Ces travaux sur la souris Tg222 ont permis de montrer que si un mucus renforcé ne permettait pas de réduire les dommages de l'épithélium intestinal provoqué par une chimiothérapie d'induction de LAM, il permettait en revanche une meilleure régénération de celui-ci. L'amélioration de l'effet de barrière de l'intestin constitue en cela un enjeu important susceptible de diminuer la morbidité et la mortalité des patients nécessitant une chimiothérapie intense. Différents candidats ont été envisagés pour augmenter cet effet de barrière. Notre équipe a pu montrer le rôle bénéfique de la nutrition entérale précoce qui, probablement grâce à son effet trophique sur l'intestin grêle, permet de diminuer la mortalité post allo-SCT et la fréquence comme la gravité de la GvHD sévère (Gonzales et al., 2018; Seguy et al., 2012, 2006). Depuis nous avons d'ailleurs pu confirmer que la chimiothérapie d'induction et de consolidation, telle qu'elle est réalisée lors de la LAM est associée à l'existence d'une atteinte séquellaire de la barrière intestinale qui expose à la survenue d'une GvHD sévère (Hueso et al., 2018, 2017). D'autres ont proposé l'utilisation de facteurs de croissance tel que le kératinocyte growth factor (KFG) ou le glucagon-like peptide-2 (GLP-2) (Jeppesen, 2014; Spielberger et al., 2004; Vippera and O'Keefe, 2013). Mais à notre connaissance, notre équipe est la première à montrer qu'on peut également influencer cet effet de barrière au cours de la chimiothérapie, en modifiant les propriétés physico-chimiques du mucus.

De plus, l'éradication du microbiote de nos souris nous a permis de comprendre combien les bactéries commensales semblaient indispensables à la sécrétion de mucus et au renouvellement de l'épithélium intestinal, que ce soit en condition physiologique ou lors de sa régénération consécutive à la chimiothérapie. L'annulation de l'effet « mucus renforcé » des souris Tg222 sous antibiotiques soulignait en cela le rôle essentiel que le microbiote semble avoir dans cette régénération. A côté de cet effet bénéfique du

microbiote, nos résultats suggèrent qu'au contraire sa présence semble accentuer les dommages intestinaux provoqués par la chimiothérapie. Ces résultats, nécessitent maintenant d'être confirmés en renouvelant les expériences réalisées sur des groupes contemporains de souris recevant ou non cette antibiothérapie permettant d'éradiquer leur microbiote intestinal.

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail met en valeur le potentiel des modèles de mucines gélifiantes (GFM) génétiquement modifiées dans la compréhension de leurs mécanismes d'expression et de régulation, dans leurs interactions avec l'épithélium et le microbiote en conditions physiologiques ou pathologique.

Les modèles de souris transgéniques Muc5b-GFP et Muc5b -/- nous ont permis de préciser l'expression et la localisation respective des deux principales GFM des cavités nasales, Muc5ac et Muc5b. Muc5b, est préférentiellement sialylée et elle est produite par les glandes de Bowman dans l'épithélium olfactif, alors que Muc5ac est préférentiellement fucosylée et elle est produite uniquement dans l'épithélium respiratoire. Les souris Tg222 nous ont permis de mieux comprendre que l'interaction de la flore adhérente avec le mucus contribue à maintenir l'effet de barrière de l'iléon, et à sa restauration au décours d'une chimiothérapie.

Ces modèles transgéniques de GFM nous offrent de nombreuses possibilités de prolonger ce travail. Nous en évoquerons trois : 1. Ces souris Muc5b-GFP et Muc5b -/- permettent de déterminer l'influence de la distribution différentielle de Muc5b, de Muc5ac et de leur O-glycosylations sur les propriétés du mucus, la composition du microbiote nasal et leurs conséquences sur les fonctions olfactives. Ces dernières pouvant être évaluées grâce à des études comportementales. 2. Les souris Tg222 et les Muc2 -/- permettent de réaliser une étude différentielle des voies de régulation des cellules caliciformes par la flore commensale et de leurs modifications aux cours de la chimiothérapie. 3. Du fait de sa toxicité nerveuse, il existe très fréquemment une altération de l'olfaction (hyposmie, anosmie, dysosmie) chez les patients recevant de la chimiothérapie (Bernhardson et al., 2009). Cette altération de l'olfaction n'est pas sans conséquences sur l'appétit, l'état nutritionnel et finalement la iatrogénicité de cette chimiothérapie. La mise au point d'un mucus renforcé Muc5b inspiré du modèle Tg222

nous permettrait de comparer les capacités olfactives de ces souris à celles de souris Wt au cours de la chimiothérapie, avec et sans antibiotiques, afin déterminer la responsabilité éventuelle du mucus et du microbiote dans ces troubles de l'olfaction.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Aihara, E., Engevik, K.A., Montrose, M.H., 2017. Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 357-380.
- Ali, M.S., Pearson, J.P., 2007. Upper airway mucin gene expression: a review. *The Laryngoscope* 117, 932-938.
- Ambort, D., van der Post, S., Johansson, M.E.V., Mackenzie, J., Thomsson, E., Kregel, U., Hansson, G.C., 2011. Function of the CysD domain of the gel-forming MUC2 mucin. *Biochem. J.* 436, 61-70.
- Andersch-Björkman, Y., Thomsson, K.A., Larsson, J.M.H., Ekerhovd, E., Hansson, G.C., 2007. Large Scale Identification of Proteins, Mucins, and Their O-Glycosylation in the Endocervical Mucus during the Menstrual Cycle. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 708-716.
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J.R., Pfeffer, K., Coffey, P.J., Rudensky, A.Y., 2013. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504, 451-455.
- Asker, N., Axelsson, M.A.B., Olofsson, S.-O., Hansson, G.C., 1998. Dimerization of the Human MUC2 Mucin in the Endoplasmic Reticulum Is Followed by a N-Glycosylation-dependent Transfer of the Mono- and Dimers to the Golgi Apparatus. *J. Biol. Chem.* 273, 18857-18863.
- Aust, M.R., Madsen, C.S., Jennings, A., Kasperbauer, J.L., Gendler, S.J., 1997. Mucin mRNA expression in normal and vasomotor inferior turbinates. *Am. J. Rhinol.* 11, 293-302.

B

- Bansil, R., Turner, B.S., 2018. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 124, 3-15.
- Bansil, R., Turner, B.S., 2006. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11, 164-170.
- Berg, D.J., Davidson, N., Kühn, R., Müller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson-Snipes, L., Leach, M.W., Rennick, D., 1996. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J. Clin. Invest.* 98, 1010-1020.

- Bernhardson, B.-M., Tishelman, C., Rutqvist, L.E., 2009. Olfactory changes among patients receiving chemotherapy. *Eur. J. Oncol. Nurs. Off. J. Eur. Oncol. Nurs. Soc.* 13, 9-15.
- Blijlevens, N.M.A., Lutgens, L.C.H.W., Schattenberg, A.V.M.B., Donnelly, J.P., 2004. Citrulline: a potentially simple quantitative marker of intestinal epithelial damage following myeloablative therapy. *Bone Marrow Transplant.* 34, 193-196.
- Brunelli, R., Papi, M., Arcovito, G., Bompiani, A., Castagnola, M., Parasassi, T., Sampaolese, B., Vincenzoni, F., De Spirito, M., 2007. Globular structure of human ovulatory cervical mucus. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21, 3872-3876.
- Buisine, M.-P., Devisme, L., Copin, M.-C., Durand-Réville, M., Gosselin, B., Aubert, J.-P., Porchet, N., 1999. Developmental Mucin Gene Expression in the Human Respiratory Tract. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20, 209-218.

C

- Cao, R., Wang, T.T., DeMaria, G., Sheehan, J.K., Kesimer, M., 2012. Mapping the Protein Domain Structures of the Respiratory Mucins: A Mucin Proteome Coverage Study. *J. Proteome Res.* 11, 4013-4023.
- Cao, X., Bansil, R., Bhaskar, K.R., Turner, B.S., LaMont, J.T., Niu, N., Afdhal, N.H., 1999. pH-Dependent Conformational Change of Gastric Mucin Leads to Sol-Gel Transition. *Biophys. J.* 76, 1250-1258.
- Castells, M.T., Ballesta, J., Madrid, J.F., Aviles, M., Martinez-Menarguez, J.A., 1991. Characterization of glycoconjugates in developing rat respiratory system by means of conventional and lectin histochemistry. *Histochemistry* 95, 419-426.
- Chakraborty, S., Bonthu, N., Swanson, B.J., Batra, S.K., 2011. Role of mucins in the skin during benign and malignant conditions. *Cancer Lett.* 301, 127-141.
- Chen, C.R., Kachramanoglou, C., Li, D., Andrews, P., Choi, D., 2014. Anatomy and cellular constituents of the human olfactory mucosa: a review. *J. Neurol. Surg. Part B Skull Base* 75, 293-300.
- Chen, G., Volmer, A.S., Wilkinson, K.J., Deng, Y., Jones, L.C., Yu, D., Bustamante-Marin, X.M., Burns, K.A., Grubb, B.R., O'Neal, W.K., Livraghi-Butrico, A., Boucher, R.C., 2018. Role of Spdef in the Regulation of Muc5b Expression in the Airways of Naive and Mucoobstructed Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 59, 383-396.
- Chen, J., Kaiyala, K.J., Lam, J., Agrawal, N., Nguyen, L., Ogimoto, K., Spencer, D., Morton, G.J., Schwartz, M.W., Dichek, H.L., 2015. In vivo structure-function studies of

human hepatic lipase: the catalytic function rescues the lean phenotype of HL-deficient (hl-/-) mice. *Physiol. Rep.* 3.

- Chen, Y., Zhao, Y.H., Kalaslavadi, T.B., Hamati, E., Nehrke, K., Le, A.D., Ann, D.K., Wu, R., 2004. Genome-Wide Search and Identification of a Novel Gel-Forming Mucin MUC19/Muc19 in Glandular Tissues. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30, 155-165.
- Coffey, R.J., Romano, M., Goldenring, J., 1995. Roles for transforming growth factor-alpha in the stomach. *J. Clin. Gastroenterol.* 21 Suppl 1, S36-39.
- Corfield, A.P., 2015. Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1850, 236-252.
- Crenn, P., Coudray-Lucas, C., Thuillier, F., Cynober, L., Messing, B., 2000. Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. *Gastroenterology* 119, 1496-1505.
- Crenn, P., Messing, B., Cynober, L., 2008. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 27, 328-339.
- Culp, D.J., Robinson, B., Cash, M.N., Bhattacharyya, I., Stewart, C., Cuadra-Saenz, G., 2015. salivary mucin 19 glycoproteins innate immune functions in streptococcus mutans-induced caries in mice and evidence for expression in human saliva. *j. biol. chem.* 290, 2993-3008.

D

- De Koning, B.A.E., Sluis, M. van der, Lindenbergh-Kortleve, D.J., Velcich, A., Pieters, R., Büller, H.A., Einerhand, A.W.C., Renes, I.B., 2007. Methotrexate-induced mucositis in mucin 2-deficient mice. *J. Cell. Physiol.* 210, 144-152.
- Demouveau, B., Gouyer, V., Gottrand, F., Narita, T., Desseyn, J.-L., 2018. Gel-forming mucin interactome drives mucus viscoelasticity. *Adv. Colloid Interface Sci.* 252, 69-82.
- Desseyn, J.-L., 2009. Mucin CYS domains are ancient and highly conserved modules that evolved in concert. *Mol. Phylogenet. Evol.* 52, 284-292.
- Desseyn, J.-L., Aubert, J.-P., Porchet, N., Laine, A., 2000. Evolution of the Large Secreted Gel-Forming Mucins. *Mol. Biol. Evol.* 17, 1175-1184.
- Desseyn, J.-L., Laine, A., 2003. Characterization of mouse muc6 and evidence of conservation of the gel-forming mucin gene cluster between human and mouse☆☆Sequence data from this article have been deposited with the GenBank Data Library

under Accession Nos. AF533526, AY184385, AY184386, AY184387, and AY184388. *Genomics* 81, 433-436.

Desseyn, J.-L., Portal, C., Gottrand, F., Gouyer, V., 2018. Transgenic Mouse Reporter to Study *Muc5b* In Vivo. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 15, S149-S153.

Desseyn, J.-L., Tetaert, D., Gouyer, V., 2008. Architecture of the large membrane-bound mucins. *Gene* 410, 215-222.

E

Ehre, C., Worthington, E.N., Liesman, R.M., Grubb, B.R., Barbier, D., O'Neal, W.K., Salenave, J.-M., Pickles, R.J., Boucher, R.C., 2012. Overexpressing mouse model demonstrates the protective role of *Muc5ac* in the lungs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 16528-16533.

Elting, L.S., Cooksley, C., Chambers, M., Cantor, S.B., Manzullo, E., Rubenstein, E.B., 2003. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. *Cancer* 98, 1531-1539.

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., 2017. 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.

Evans, C.M., Raclawska, D.S., Ttofali, F., Liptzin, D.R., Fletcher, A.A., Harper, D.N., McGing, M.A., McElwee, M.M., Williams, O.W., Sanchez, E., Roy, M.G., Kindrachuk, K.N., Wynn, T.A., Eltzschig, H.K., Blackburn, M.R., Tuvim, M.J., Janssen, W.J., Schwartz, D.A., Dickey, B.F., 2015. The polymeric mucin *Muc5ac* is required for allergic airway hyperreactivity. *Nat. Commun.* 6, 6281.

F

Fahrbach, K.M., Malykhina, O., Stieh, D.J., Hope, T.J., 2013. Differential Binding of IgG and IgA to Mucus of the Female Reproductive Tract. *PLOS ONE* 8, e76176.

Feng, Y., Huang, Y., Wang, Y., Wang, P., Song, H., Wang, F., 2019. Antibiotics induced intestinal tight junction barrier dysfunction is associated with microbiota dysbiosis, activated NLRP3 inflammasome and autophagy. *PloS One* 14, e0218384.

Foligné, B., Plé, C., Titécat, M., Dendooven, A., Pagny, A., Daniel, C., Singer, E., Pottier, M., Bertin, B., Neut, C., Deplanque, D., Dubuquoy, L., Desreumaux, P., Capron,

- M., Standaert, A., 2019. Contribution of the Gut Microbiota in P28GST-Mediated Anti-Inflammatory Effects: Experimental and Clinical Insights. *Cells* 8.
- François, A., Grebert, D., Rhimi, M., Mariadassou, M., Naudon, L., Rabot, S., Meunier, N., 2016. Olfactory epithelium changes in germfree mice. *Sci. Rep.* 6, 24687.
- Fujiwara, M., Kato, S., Niwa, Y., Suzuki, T., Tsuchiya, M., Sasazawa, Y., Dohmae, N., Simizu, S., 2016. C-mannosylation of R-spondin3 regulates its secretion and activity of Wnt/B-catenin signaling in cells. *FEBS Lett.* 590, 2639-2649.
- Furmanek, A., Hofsteenge, J., 2000. Protein C-mannosylation: facts and questions. *Acta Biochim. Pol.* 47, 781-789.

G

- Garattini, S., Guaitani, A., Nanni, E., Palma, V., 1967. Studies on the selectivity of anti-tumor agents. *Cancer Res.* 27, 1309-1437.
- Gerbe, F., Jay, P., 2016. Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal Immunol.* 9, 1353-1359.
- Gipson, I.K., 2004. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp. Eye Res.* 78, 379-388.
- Girod, S., Galabert, C., Lecuire, A., Zahm, J.M., Puchelle, E., 1992a. Phospholipid composition and surface-active properties of tracheobronchial secretions from patients with cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary diseases. *Pediatr. Pulmonol.* 13, 22-27.
- Girod, S., Zahm, J.M., Plotkowski, C., Beck, G., Puchelle, E., 1992b. Role of the physicochemical properties of mucus in the protection of the respiratory epithelium. *Eur. Respir. J.* 5, 477-487.
- Gondolesi, G., Ghirardo, S., Raymond, K., Hoppenhauer, L., Surillo, D., Rumbo, C., Fishbein, T., Sansaricq, C., Sauter, B., 2006. The value of plasma citrulline to predict mucosal injury in intestinal allografts. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 6, 2786-2790.
- Gonzales, F., Bruno, B., Alarcón Fuentes, M., De Berranger, E., Guimber, D., Behal, H., Gandemer, V., Spiegel, A., Sirvent, A., Yakoub-Agha, I., Nelken, B., Duhamel, A., Seguy, D., 2018. Better early outcome with enteral rather than parenteral nutrition in children undergoing MAC allo-SCT. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 37, 2113-2121.
- Gosalia, N., Leir, S.-H., Harris, A., 2013. Coordinate Regulation of the Gel-forming Mucin Genes at Chromosome 11p15.5. *J. Biol. Chem.* 288, 6717-6725.

- Gouyer, V., Dubuquoy, L., Robbe-Masselot, C., Neut, C., Singer, E., Plet, S., Geboes, K., Desreumaux, P., Gottrand, F., Desseyn, J.-L., 2015. Delivery of a mucin domain enriched in cysteine residues strengthens the intestinal mucous barrier. *Sci. Rep.* 5, 9577.
- Gouyer, V., Gottrand, F., Desseyn, J.-L., 2011. The Extraordinarily Complex but Highly Structured Organization of Intestinal Mucus-Gel Unveiled in Multicolor Images. *PLOS ONE* 6, e18761.
- Guo, X., Pace, R.G., Stonebraker, J.R., Commander, C.W., Dang, A.T., Drumm, M.L., Harris, A., Zou, F., Swallow, D.M., Wright, F.A., O'Neal, W.K., Knowles, M.R., 2011. Mucin variable number tandem repeat polymorphisms and severity of cystic fibrosis lung disease: significant association with MUC5AC. *PloS One* 6, e25452.
- Guy-Grand, D., Griscelli, C., Vassalli, P., 1978. The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell. Nature, origin, and traffic in mice in normal and graft-versus-host conditions. *J. Exp. Med.* 148, 1661-1677.

H

- Hanisch, F.-G., Bonar, D., Schloerer, N., Schrotten, H., 2014. Human Trefoil Factor 2 Is a Lectin That Binds α -GlcNAc-capped Mucin Glycans with Antibiotic Activity against *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 289, 27363-27375.
- Harada, N., Iijima, S., Kobayashi, K., Yoshida, T., Brown, W.R., Hibi, T., Oshima, A., Morikawa, M., 1997. Human IgGFc binding protein (Fc γ BP) in colonic epithelial cells exhibits mucin-like structure. *J. Biol. Chem.* 272, 15232-15241.
- Harkema, J.R., Carey, S.A., Wagner, J.G., 2006. The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol. Pathol.* 34, 252-269.
- Hasnain, S.Z., Evans, C.M., Roy, M., Gallagher, A.L., Kindrachuk, K.N., Barron, L., Dickey, B.F., Wilson, M.S., Wynn, T.A., Grencis, R.K., Thornton, D.J., 2011. Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes. *J. Exp. Med.* 208, 893-900.
- Hernández-Chirlaque, C., Aranda, C.J., Ocón, B., Capitán-Cañadas, F., Ortega-González, M., Carrero, J.J., Suárez, M.D., Zarzuelo, A., Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O., 2016. Germ-free and Antibiotic-treated Mice are Highly Susceptible to Epithelial Injury in DSS Colitis. *J. Crohns Colitis* 10, 1324-1335.

- Heydel, J.-M., Coelho, A., Thiebaud, N., Legendre, A., Le Bon, A.-M., Faure, P., Neiers, F., Artur, Y., Golebiowski, J., Briand, L., 2013. Odorant-binding proteins and xenobiotic metabolizing enzymes: implications in olfactory perireceptor events. *Anat. Rec. Hoboken NJ* 2007 296, 1333-1345.
- Ho, S.B., Takamura, K., Anway, R., Shekels, L.L., Toribara, N.W., Ota, H., 2004. The adherent gastric mucous layer is composed of alternating layers of MUC5AC and MUC6 mucin proteins. *Dig. Dis. Sci.* 49, 1598-1606.
- Hodges, R.R., Dartt, D.A., 2013. Tear film mucins: Front line defenders of the ocular surface; comparison with airway and gastrointestinal tract mucins. *Exp. Eye Res., Tears: A Unique Mucosal Surface Secretion* 117, 62-78.
- Hoffmann, W., Hauser, F., 1993. The P-domain or trefoil motif: a role in renewal and pathology of mucous epithelia? *Trends Biochem. Sci.* 18, 239-243.
- Hong, Z., Chasan, B., Bansil, R., Turner, B.S., Bhaskar, K.R., Afdhal, N.H., 2005. Atomic Force Microscopy Reveals Aggregation of Gastric Mucin at Low pH. *Biomacromolecules* 6, 3458-3466.
- Hovenberg, H.W., Davies, J.R., Carlstedt, I., 1996. Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells. *Biochem. J.* 318 (Pt 1), 319-324.
- Hueso, T., Coiteux, V., Joncquel Chevalier Curt, M., Labreuche, J., Jouault, T., Yakoub-Agha, I., Seguy, D., 2017. Citrulline and Monocyte-Derived Macrophage Reactivity before Conditioning Predict Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 23, 913-921.
- Hueso, T., Ekpe, K., Mayeur, C., Gatse, A., Joncquel Chevalier Curt, M., Gricourt, G., Rodriguez, C., Burdet, C., Ulmann, G., Neut, C., Amini, S.-E., Lepage, P., Raynard, B., Willekens, C., Micol, J.-B., De Botton, S., Yakoub-Agha, I., Desseyn, J.-L., Thomas, M., Woerther, P.-L., Seguy, D., 2019a. Consequences of induction chemotherapy on intestinal barrier and microbiota in acute myeloid leukemia: a translational study. Submitted
- Hueso, T., Gauthier, J., Joncquel Chevalier-Curt, M., Magro, L., Coiteux, V., Dulery, R., Carpentier, B., Labreuche, J., Damaj, G., Yakoub-Agha, I., Seguy, D., 2018. Association Between Low Plasma Level of Citrulline Before Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation and Severe Gastrointestinal Graft vs Host Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 16, 908-917.e2.

Hueso, T., Johnson-Ansah, H., Decamp, M., Maitre, E., Henry, A., Mensi, S., Vilque, J.-P., Chantepie, S., Damaj, G., 2019b. Successful Imatinib therapy as a bridge to transplant in an atypical myeloproliferative neoplasm. *Curr. Res. Transl. Med.*

I

Iontcheva, I., Oppenheim, F.G., Offner, G.D., Troxler, R.F., 2000. Molecular mapping of statherin- and histatin-binding domains in human salivary mucin MG1 (MUC5B) by the yeast two-hybrid system. *J. Dent. Res.* 79, 732-739.

Itoh, T., Yonezawa, S., Nomoto, M., Ueno, K., Kim, Y.S., Sato, E., 1996. Expression of mucin antigens and Lewis X-related antigens in carcinomas and dysplasia of the pharynx and larynx. *Pathol. Int.* 46, 646-655.

J

Jeppesen, P.B., 2014. New approaches to the treatments of short bowel syndrome-associated intestinal failure. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 30, 182-188.

Johansson, M.E.V., Larsson, J.M.H., 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.

Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G.C., 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15064-15069.

K

Kandori, H., Hirayama, K., Takeda, M., Doi, K., 1996. Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. *Exp. Anim.* 45, 155-160.

Kato, L.M., Kawamoto, S., Maruya, M., Fagarasan, S., 2014. The role of the adaptive immune system in regulation of gut microbiota. *Immunol. Rev.* 260, 67-75.

Keefe, D.M., Elting, L.S., Nguyen, H.T., Grunberg, S.M., Aprile, G., Bonaventura, A., Selva-Nayagam, S., Barsevick, A., Koczwara, B., Sonis, S.T., 2014. Risk and outcomes of chemotherapy-induced diarrhea (CID) among patients with colorectal cancer receiving multi-cycle chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 74, 675-680.

- Kennel, C., Gould, E.A., Larson, E.D., Salcedo, E., Vickery, T., Restrepo, D., Ramakrishnan, V.R., 2019. Differential Expression of Mucins in Murine Olfactory Versus Respiratory Epithelium. *Chem. Senses* 44, 511-521.
- Kerschner, J.E., Hong, W., Khampang, P., Johnston, N., 2014. Differential response of gel-forming mucins to pathogenic middle ear bacteria. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 78, 1368-1373.
- Kim, Y.S., Ho, S.B., 2010a. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 319-330.
- Kim, Y.S., Ho, S.B., 2010b. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 319-330.
- Kondo, K., Watanabe, K., Sakamoto, T., Suzukawa, K., Nibu, K., Kaga, K., Yamasoba, T., 2009. Distribution and severity of spontaneous lesions in the neuroepithelium and Bowman's glands in mouse olfactory mucosa: age-related progression. *Cell Tissue Res.* 335, 489-503.
- Kouznetsova, I., Gerlach, K.L., Zahl, C., Hoffmann, W., 2010. Expression Analysis of Human Salivary Glands by Laser Microdissection: Differences Between Submandibular and Labial Glands. *Cell. Physiol. Biochem.* 26, 375-382.
- Kovács, T., Varga, G., Érces, D., Tökés, T., Tizlavicz, L., Ghyczy, M., Boros, M., Kaszaki, J., 2012. Dietary Phosphatidylcholine Supplementation Attenuates Inflammatory Mucosal Damage in a Rat Model of Experimental Colitis. *Shock* 38, 177-185.
- Krieg, J., Hartmann, S., Vicentini, A., Gläsner, W., Hess, D., Hofsteenge, J., 1998. Recognition signal for C-mannosylation of Trp-7 in RNase 2 consists of sequence Trp-x-x-Trp. *Mol. Biol. Cell* 9, 301-309.

L

- Lang, T., Hansson, G.C., Samuelsson, T., 2007. Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 16209-16214.
- Lee, C.S., Ryan, E.J., Doherty, G.A., 2014. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: the role of inflammation. *World J. Gastroenterol.* 20, 3751-3761.
- Lichtenberger, L.M., 1995. The hydrophobic barrier properties of gastrointestinal mucus. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 565-583.
- Lorand, L., Graham, R.M., 2003. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 140-156.

- Lu, P., Burger-van Paassen, N., van der Sluis, M., Witte-Bouma, J., Kerckaert, J.-P., van Goudoever, J.B., Van Seuningen, I., Renes, I.B., 2011. Colonic gene expression patterns of mucin Muc2 knockout mice reveal various phases in colitis development. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 2047-2057.
- Lüdeking, A., Fegert, P., Blin, N., Gött, P., 1998. Osmotic changes and ethanol modify TFF gene expression in gastrointestinal cell lines. *FEBS Lett.* 439, 180-184.
- Lugea, A., Salas, A., Casalot, J., Guarner, F., Malagelada, J.R., 2000. Surface hydrophobicity of the rat colonic mucosa is a defensive barrier against macromolecules and toxins. *Gut* 46, 515-521.
- Lutgens, L.C.H.W., Blijlevens, N.M.A., Deutz, N.E.P., Donnelly, J.P., Lambin, P., de Pauw, B.E., 2005. Monitoring myeloablative therapy-induced small bowel toxicity by serum citrulline concentration: a comparison with sugar permeability tests. *Cancer* 103, 191-199.

M

- Macdonald, T.T., Monteleone, G., 2005. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307, 1920-1925.
- Madsen, J., Nielsen, O., Tornøe, I., Thim, L., Holmskov, U., 2007. Tissue Localization of Human Trefoil Factors 1, 2, and 3. *J. Histochem. Cytochem.* 55, 505-513.
- Mahida, Y.R., Cunliffe, R.N., 2004. Defensins and mucosal protection. *Novartis Found. Symp.* 263, 71-77; discussion 77-84, 211-218.
- Martínez-Antón, A., DeBolós, C., Garrido, M., Roca-Ferrer, J., Barranco, C., Alobid, I., Xaubet, A., Picado, C., Mullol, J., 2006. Mucin genes have different expression patterns in healthy and diseased upper airway mucosa. *Clin. Exp. Allergy* 36, 448-457.
- Maynard, C.L., Weaver, C.T., 2009. Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity* 31, 389-400.
- McCauley, H.A., Guasch, G., 2015. Three cheers for the goblet cell: maintaining homeostasis in mucosal epithelia. *Trends Mol. Med.* 21, 492-503.
- Muskett, F.W., May, F.E.B., Westley, B.R., Feeney, J., 2003. Solution Structure of the Disulfide-Linked Dimer of Human Intestinal Trefoil Factor (TFF3): The Intermolecular Orientation and Interactions Are Markedly Different from Those of Other Dimeric Trefoil Proteins. *Biochemistry* 42, 15139-15147.

- Natividad, J.M.M., Verdu, E.F., 2013a. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota : pathological and therapeutic implications. *Pharmacol. Res.* 69, 42-51.
- Natividad, J.M.M., Verdu, E.F., 2013b. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota : pathological and therapeutic implications. *Pharmacol. Res.* 69, 42-51.
- Nordman, H., Davies, J.R., Lindell, G., de Bolós, C., Real, F., Carlstedt, I., 2002. Gastric MUC5AC and MUC6 are large oligomeric mucins that differ in size, glycosylation and tissue distribution. *Biochem. J.* 364, 191-200.

O

- Ostedgaard, L.S., Moninger, T.O., McMenimen, J.D., Sawin, N.M., Parker, C.P., Thornell, I.M., 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., 2017. Gel-forming mucins form distinct morphologic structures in airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 6842-6847.

P

- Park, J.H., Robinson, J.R., 2008. Effect of a hydrophobic phospholipid lining of the gastric mucosa in bioadhesion. *Pharm. Res.* 25, 16-24.
- Patel, R.M., Myers, L.S., Kurundkar, A.R., Maheshwari, A., Nusrat, A., Lin, P.W., 2012. Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. *Am. J. Pathol.* 180, 626-635.
- Perez-Vilar, J., Randell, S.H., Boucher, R.C., 2004. C-Mannosylation of MUC5AC and MUC5B Cys subdomains. *Glycobiology* 14, 325-337.
- 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., 1996. Human Mucin Genes Assigned to 11p15.5: Identification and Organization of a Cluster of Genes. *Genomics* 38, 340-352.
- Piton, G., Capellier, G., 2016. Biomarkers of gut barrier failure in the ICU. *Curr. Opin. Crit. Care* 22, 152-160.
- Portal, C., Gouyer, V., Magnien, M., Plet, S., Gottrand, F., Desseyn, J.-L., 2017. In vivo imaging of the Muc5b gel-forming mucin. *Sci. Rep.* 7, 44591.
- Post, S. van der, Subramani, D.B., Bäckström, M., Johansson, M.E.V., Vester-Christensen, M.B., Mandel, U., Bennett, E.P., Clausen, H., Dahlén, G., Sroka, A., Potempa, J.,

Hansson, G.C., 2013. Site-specific O-Glycosylation on the MUC2 Mucin Protein Inhibits Cleavage by the *Porphyromonas gingivalis* Secreted Cysteine Protease (RgpB). *J. Biol. Chem.* 288, 14636-14646.

R

- Rantamäki, A.H., Javanainen, M., Vattulainen, I., Holopainen, J.M., 2012. Do Lipids Retard the Evaporation of the Tear Fluid? *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 6442-6447.
- Recktenwald, C.V., Hansson, G.C., 2016. The Reduction-insensitive Bonds of the MUC2 Mucin Are Isopeptide Bonds. *J. Biol. Chem.* 291, 13580-13590.
- Reid, C.J., Harris, A., 1998. Developmental expression of mucin genes in the human gastrointestinal system. *Gut* 42, 220-226.
- Reis, C.A., David, L., Carvalho, F., Mandel, U., de Bolós, C., Mirgorodskaya, E., Clausen, H., Sobrinho-Simões, M., 2000. Immunohistochemical study of the expression of MUC6 mucin and co-expression of other secreted mucins (MUC5AC and MUC2) in human gastric carcinomas. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 48, 377-388.
- Revoredo, L., Wang, S., Bennett, E.P., Clausen, H., Moremen, K.W., Jarvis, D.L., Ten Hagen, K.G., Tabak, L.A., Gerken, T.A., 2016. Mucin-type O-glycosylation is controlled by short- and long-range glycopeptide substrate recognition that varies among members of the polypeptide GalNAc transferase family. *Glycobiology* 26, 360-376.
- Robbe, C., Capon, C., Maes, E., Rousset, M., Zweibaum, A., Zanetta, J.-P., Michalski, J.-C., 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.
- Rossez, Y., Maes, E., Lefebvre Darroman, T., Gosset, P., Ecobichon, C., Joncquel Chevalier Curt, M., Boneca, I.G., Michalski, J.-C., Robbe-Masselot, C., 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.
- Royle, L., Roos, A., Harvey, D.J., Wormald, M.R., van Gijlswijk-Janssen, D., Redwan, E.-R.M., Wilson, I.A., Daha, M.R., Dwek, R.A., Rudd, P.M., 2003. Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems. *J. Biol. Chem.* 278, 20140-20153.

- Ruchaud-Sparagano, M.-H., Westley, B.R., May, F.E.B., 2004. The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in humangastric mucosa. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 1946-1954.
- Russo, C.L., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A., Pudney, J., Anderson, D., Gipson, I.K., 2006. Mucin gene expression in human male urogenital tract epithelia. *Hum. Reprod.* 21, 2783-2793.

S

- Salvo Romero, E., Alonso Cotoner, C., Pardo Camacho, C., Casado Bedmar, M., Vicario, M., 2015. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev. Espanola Enfermedades Dig. Organo Of. Soc. Espanola Patol. Dig.* 107, 686-696.
- Sánchez de Medina, F., Ortega-González, M., González-Pérez, R., Capitán-Cañadas, F., Martínez-Augustin, O., 2013. Host-microbe interactions: the difficult yet peaceful coexistence of the microbiota and the intestinal mucosa. *Br. J. Nutr.* 109 Suppl 2, S12-20.
- Sánchez de Medina, F., Romero-Calvo, I., Mascaraque, C., Martínez-Augustin, O., 2014. Intestinal inflammation and mucosal barrier function. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 2394-2404.
- Schroeder, B.O., 2019. Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterol. Rep.* 7, 3-12.
- Schwartz, J.L., 2014. Fcgbp - A Potential Viral Trap in RV144. *Open AIDS J.* 8, 21-24.
- Sears, P.R., Davis, C.W., Chua, M., Sheehan, J.K., 2011. Mucociliary interactions and mucus dynamics in ciliated human bronchial epithelial cell cultures. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 301, L181-L186.
- Seguy, D., Berthon, C., Micol, J.-B., Darré, S., Dalle, J.-H., Neuville, S., Bauters, F., Jouet, J.-P., Yakoub-Agha, I., 2006. Enteral feeding and early outcomes of patients undergoing allogeneic stem cell transplantation following myeloablative conditioning. *Transplantation* 82, 835-839.
- Seguy, D., Duhamel, A., Rejeb, M.B., Gomez, E., Buhl, N.D., Bruno, B., Cortot, A., Yakoub-Agha, I., 2012. Better outcome of patients undergoing enteral tube feeding after myeloablative conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation* 94, 287-294.

- Shankar, V., Gilmore, M.S., Sachdev, G.P., 1995. Further evidence that the human MUC2 gene transcripts in the intestine and trachea are identical. *Biochem. J.* 306 (Pt 1), 311-312.
- Slomiany, B.L., Murty, V.L., Sarosiek, J., Piotrowski, J., Slomiany, A., 1988. Role of associated and covalently bound lipids in salivary mucin hydrophobicity: effect of proteolysis and disulfide bridge reduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 1046-1053.
- Solbu, T.T., Holen, T., 2012. Aquaporin pathways and mucin secretion of Bowman's glands might protect the olfactory mucosa. *Chem. Senses* 37, 35-46.
- Sonis, S.T., Villa, A., 2018. Phase II investigational oral drugs for the treatment of radio/chemotherapy induced oral mucositis. *Expert Opin. Investig. Drugs* 27, 147-154.
- Spielberger, R., Stiff, P., Bensinger, W., Gentile, T., Weisdorf, D., Kewalramani, T., Shea, T., Yanovich, S., Hansen, K., Noga, S., McCarty, J., LeMaistre, C.F., Sung, E.C., Blazar, B.R., Elhardt, D., Chen, M.-G., Emmanouilides, C., 2004. Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. *N. Engl. J. Med.* 351, 2590-2598.
- Stanley, P., Taniguchi, N., Aebi, M., 2015. N-Glycans, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- Suzuki, T., 2013. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 631-659.
- Szentkuti, L., Riedesel, H., Enss, M.L., Gaertner, K., Von Engelhardt, W., 1990. Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ-free rats. *Histochem. J.* 22, 491-497.

T

- Teshima, T.H.N., Ianez, R.F., Coutinho-Camillo, C.M., Buim, M.E., Soares, F.A., Lourenço, S.V., 2011. Development of human minor salivary glands: expression of mucins according to stage of morphogenesis. *J. Anat.* 219, 410-417.
- Thim, L., 1989. A new family of growth factor-like peptides. "Trefoil" disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett.* 250, 85-90.

- Thim, L., Madsen, F., Poulsen, S.S., 2002. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur. J. Clin. Invest.* 32, 519-527.
- Thomázy, V., Fésüs, L., 1989. Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 255, 215-224.
- Tomasetto, C., Masson, R., Linares, J.L., Wendling, C., Lefebvre, O., Chenard, M.P., Rio, M.C., 2000. pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. *Gastroenterology* 118, 70-80.
- Turner, J.R., 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 799-809.

U

- Ueno, K., Hanamura, Y., Ohyama, M., 1994. Differences in terminal carbohydrate structures of sialomucin in the murine nasal cavity. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 251, 119-122.
- Uraih, L.C., Maronpot, R.R., 1990. Normal histology of the nasal cavity and application of special techniques. *Environ. Health Perspect.* 85, 187-208.

V

- Van der Heijden, P.J., Stok, W., 1987. Improved procedure for the isolation of functionally active lymphoid cells from the murine intestine. *J. Immunol. Methods* 103, 161-167.
- Van der Sluis, M., De Koning, B.A.E., De Bruijn, A.C.J.M., Velcich, A., Meijerink, J.P.P., Van Goudoever, J.B., Büller, H.A., Dekker, J., Van Seuning, I., Renes, I.B., Einerhand, A.W.C., 2006. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131, 117-129.
- Van Itallie, C.M., Lidman, K.F., Tietgens, A.J., Anderson, J.M., 2019. Newly synthesized claudins but not occludin are added to the basal side of the tight junction. *Mol. Biol. Cell* 30, 1406-1424.
- Van Klinken, B.J., Dekker, J., Büller, H.A., de Bolòs, C., Einerhand, A.W., 1997. Biosynthesis of mucins (MUC2-6) along the longitudinal axis of the human gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol.* 273, G296-302.
- Van Klinken, B.J., Dekker, J., van Gool, S.A., van Marle, J., Büller, H.A., Einerhand, A.W., 1998. MUC5B is the prominent mucin in human gallbladder and is also expressed in a subset of colonic goblet cells. *Am. J. Physiol.* 274, G871-878.

- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K., Augenlicht, L., 2002. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 295, 1726-1729.
- Verdugo, P., 2012. Supramolecular Dynamics of Mucus. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a009597.
- Vinall, L.E., Fowler, J.C., Jones, A.L., Kirkbride, H.J., de Bolós, C., Laine, A., Porchet, N., Gum, J.R., Kim, Y.S., Moss, F.M., Mitchell, D.M., Swallow, D.M., 2000. Polymorphism of human mucin genes in chest disease: possible significance of MUC2. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23, 678-686.
- Vipperla, K., O'Keefe, S.J., 2013. Study of teduglutide effectiveness in parenteral nutrition-dependent short-bowel syndrome subjects. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 683-687.
- Viswanathan, C., Bhosale, P., Ganeshan, D.M., Truong, M.T., Silverman, P., Balachandran, A., 2012. Imaging of complications of oncological therapy in the gastrointestinal system. *Cancer Imaging Off. Publ. Int. Cancer Imaging Soc.* 12, 163-172.
- Vliegthart, J.F., Casset, F., 1998a. Novel forms of protein glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 565-571.
- Vliegthart, J.F., Casset, F., 1998b. Novel forms of protein glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 565-571.

W

- Wang, L., Ray, A., Jiang, X., Wang, J., -y, Basu, S., Liu, X., Qian, T., He, R., Dittel, B.N., Chu, Y., 2015. T regulatory cells and B cells cooperate to form a regulatory loop that maintains gut homeostasis and suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis. *Mucosal Immunol.* 8, 1297-1312.
- Wang, L.W., Leonhard-Melief, C., Haltiwanger, R.S., Apte, S.S., 2009. Post-translational Modification of Thrombospondin Type-1 Repeats in ADAMTS-like 1/Punctin-1 by C-Mannosylation of Tryptophan. *J. Biol. Chem.* 284, 30004-30015.
- Wang, X., Du, M., Han, H., Song, Y., Zheng, Q., 2015. Boundary Lubrication by Associative Mucin. *Langmuir* 31, 4733-4740.
- Westcarr, S., Farshori, P., Wyche, J., Anderson, W.A., 1999. Apoptosis and differentiation in the crypt-villus unit of the rat small intestine. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 31, 15-30.

Widdicombe, J.G., 1987. Rôle of lipids in airway function. *Eur. J. Respir. Dis. Suppl.* 153, 197-204.

X

Xian, C.J., Howarth, G.S., Mardell, C.E., Cool, J.C., Familiar, M., Read, L.C., Giraud, A.S., 1999. Temporal changes in TFF3 expression and jejunal morphology during methotrexate-induced damage and repair. *Am. J. Physiol.* 277, G785-795.

Y

Yang, W., Velcich, A., Lozonschi, I., Liang, J., Nicholas, C., Zhuang, M., Bancroft, L., Augenlicht, L.H., 2005. Inactivation of p21WAF1/cip1 enhances intestinal tumor formation in *Muc2*^{-/-} mice. *Am. J. Pathol.* 166, 1239-1246.

Z

Zanetta, J.-P., Pons, A., Richet, C., Huet, G., Timmerman, P., Leroy, Y., Bohin, A., Bohin, J.-P., Trinel, P.-A., Poulain, D., Hofsteenge, J., 2004. Quantitative gas chromatography/mass spectrometry determination of C-mannosylation of tryptophan residues in glycoproteins. *Anal. Biochem.* 329, 199-206.

Zhou, Y.-F., Eng, E.T., Zhu, J., Lu, C., Walz, T., Springer, T.A., 2012. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood* 120, 449-458.

VI. ANNEXES



Muc5b is mainly expressed and sialylated in the nasal olfactory epithelium whereas Muc5ac is exclusively expressed and fucosylated in the nasal respiratory epithelium

Salah-Eddine Amini¹ · Valérie Gouyer¹ · Céline Portal^{1,2} · Frédéric Gottrand¹ · Jean-Luc Desseyn¹

Accepted: 12 April 2019

© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

The nose is a complex organ that filters and warms breathing airflow. The nasal epithelium is the first barrier between the host and the external environment and is covered by a mucus gel that is poorly documented. Mucins are large, heavily O-glycosylated polymeric molecules secreted in the nose lumen by specialized cells, and they are responsible for the biochemical properties of the mucus gel. The mucus traps particles and clears them, and it also bathes microbiota, host molecules, and receptors that are all essential for odor perception in the olfactory epithelium. We used histology and immunohistochemistry to study the expression of the two main airway polymeric mucins, Muc5ac and Muc5b, in wild-type, green fluorescent protein-reporter Muc5b, and in genetically Muc5b-deficient mice. We report that Muc5ac is produced by goblet cells at the cell surface in the respiratory epithelium but is not expressed in the olfactory epithelium, whereas Muc5b is secreted by Bowman's glands situated in the lamina propria beneath the olfactory epithelium and also by goblet cells in the distal part of the respiratory epithelium. We also observed that Muc5b-deficient mice exhibited depletion of Bowman's glands. Using lectins, we found that terminally O-glycosylated chains of Muc5b were sialylated but not fucosylated, whereas Muc5ac was fucosylated but not sialylated. Specific localization and specific terminal glycosylation of the two mucins suggest different functions of the mucins.

Keywords Mouse nose · Mucin · Muc5b · Muc5ac · Lectin · Bowman's gland

Introduction

The nose is a complex and well-structured organ, and it is the respiratory entrance hall in all mammalian species. The nasal cavity of both humans and mice is divided into compartments that are grossly organized in turbinates from the nostril to the nasopharynx. These bony structures increase

the inner nasal surface area. Among the four nasal epithelial populations, the respiratory epithelium (RE) and the olfactory epithelium (OE) are the two main epithelia covering more than 90% of the total surface epithelium. Most of the luminal surfaces of the nasal compartments are covered by a continuous gel-like mucus layer that retains a high quantity of water that humidifies the breathing air before it reaches the lungs. The mucus layer also traps and clears bacteria, viruses and particles that are moved distally by cilia toward the naso- and oropharynx, where they are swallowed by the esophagus to clear the nasal cavity (Harkema et al. 2006). The proximal half of the mouse nasal cavity is covered by RE that is much larger in humans compared with rodents. The distal half of the nasal cavity is lined by OE that covers approximately 46% of the nasal cavity in mice vs 3% in humans reflecting a loss of the olfactory system in comparison to other mammals (Gross et al. 1982).

Gel-forming mucins (GFMs) are secreted polymeric macromolecules that constitute the framework of all mammalian mucus hydrogels and are responsible for the gel properties.

Salah-Eddine Amini and Valérie Gouyer have contributed equally.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00418-019-01785-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jean-Luc Desseyn
jean-luc.desseyn@inserm.fr

¹ Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, LIRIC UMR 995, 1 place de Verdun, 59000 Lille, France

² Wilmer Eye Institute, Johns Hopkins University, School of Medicine, Baltimore, MD 21201, USA

However, other molecules such as cell-surface mucins are important components of the mucus gel. Their extracellular region can be seen as components of the mucus and may contribute to its viscoelastic properties, following shedding or direct secretion via splicing, and may bind GFMs (Linden et al. 2008; Radicioni et al. 2016). Mucins are highly O-glycosylated molecules. The numerous glycan chains are linked to Ser and Thr amino acids clustered in the central region of the mucin backbone. Three regions can be identified in O-glycan chains: the core, the backbone, and the periphery (Corfield 2017). Among the numerous terminal glycotopes, fucosylated (fucose- α -(1,2)-galactose) and sialylated (Neu5Ac- α -(2,3) and α -(2,6)-galactose) glycotopes are very common. It is believed that the different glycotopes in cells of the same tissue reflect specific functions (Corfield 2017). GFMs are encoded by five genes conserved between humans and rodents. Human MUC5B and MUC5AC (murine Muc5b and Muc5ac) are the two predominant human GFMs in the airways. The RE contains a high concentration of goblet cells, and the human RE also comprises subepithelial tubuloacinar glands (Ali and Pearson 2007). It has been reported using in situ hybridization that human MUC5AC is the major GFM, which is mainly expressed by goblet cells, whereas MUC5B is expressed by the submucosal glands in the inferior turbinates (Aust et al. 1997). Mucins from other sites may also participate in the mucus gel of the nose. Indeed, the nasolacrimal ducts that produced the GFM MUC5B, the secreted non-GFM MUC7 as well as the two other GFMs MUC5AC and MUC2 drain into the nasal cavity the tear fluid (for review see Paulsen 2006). Bowman's glands (BGs) are branched, tubular-type, submucosal glands composed of acini (Chen et al. 2014). Through narrow ducts, they secrete neutral and acidic glycoconjugates including one or more GFMs that form a mucus gel that covers the luminal surface of the OE (Harkema et al. 2006). This mucus of the OE is believed to play a major role in detecting and discriminating between odors because it bathes the cilia of the olfactory receptor neurons, odorant receptors, olfactory xenobiotic-metabolizing enzymes, and bacteria that are essential for odor perception (Heydel et al. 2013; François et al. 2016). The exact composition of GFMs in BGs is not known. Mucin production in humans is usually assessed by cell and explant culture from the RE because the OE is not easily accessible. In contrast, the mouse may be a good model for GFM studies, but immunohistochemical data must be interpreted with caution because of the size and complexity of the mucin peptide and the high number of sugar chains that decorate the mucin backbone.

We recently recorded specific fluorescent activity by confocal laser endomicroscopy in the nose of a green fluorescent protein (GFP)-reporter Muc5b mouse, engineered by homologous recombination (Portal et al. 2017b), but the specific localization of both Muc5ac and Muc5b is not clear.

Here we used immunohistochemistry to find that Muc5ac is expressed by the goblet cells of the RE, whereas BGs in the OE likely secrete Muc5b exclusively. Profile expression specificity of Muc5b was confirmed using wild-type (WT) and Muc5b genetically deficient (Muc5b^{-/-}) mice. Last, using lectin staining, we observed that the terminal glycotopes of GFMs of the RE are fucosylated while those of Muc5b are sialylated.

Materials and methods

Mice

Floxed Muc5b-GFP reporter mice (Muc5b^{fl/fl}) with a C57BL/6 genetic background (Desseyn et al. 2018) were bred in collaboration with Genoway (Lyon, France) with a C57BL/6 Cre recombinase-expressing deleter mouse strain (Chen et al. 2015) to excise the last two exons of *Muc5b* encompassing the single AATAAA signal, the single 3' untranslated region (UTR), and the GFP sequence. WT and GFP alleles were determined by polymerase chain reaction (PCR) using two oligonucleotides (P1 and P2) and PCR cycles as previously described (Portal et al. 2017b). The knockout allele was determined using the same conditions but a third (antisense) oligonucleotide (P3) was added in the reaction mix: 5'-GCAGTCCAGCCAGGACATTAT CAGC-3' (Fig. 1a, b). Mice were housed in a specific pathogen-free animal facility and received standard chow diet ad libitum. A total of 14 mice with different genotypes (WT, Muc5b-GFP, and Muc5b^{-/-}), aged between 8 and 12 weeks, were used in this study. Animal protocols were in accordance with the French Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and with the guidelines of the European Union.

Histology and immunohistochemistry

Mice were killed by lethal anesthesia and their noses were harvested immediately. The nasal cavity was removed by one cut along the orbital bone between the eyes and one cut in the distal hard palate at the level of the first molar teeth. Excess soft tissue was removed, and the nose was rinsed in phosphate-buffered saline (Gibco BRL, France), decalcified in 10% EDTA for at least 2 weeks, and then embedded in paraffin. Three locations in the nasal cavity were chosen: a proximal section (T1) taken immediately posterior to the upper incisor, an intermediate section taken at the level of the incisive papilla (T2), and a distal section (T3) taken at the level of the second palate ridge containing mainly OE (Fig. 1c). For each location serial five-micron-thick sections were prepared. Histological staining was performed as described before using Alcian Blue-periodic acid Schiff (AB-PAS) coloration (Gouyer et al. 2010). For

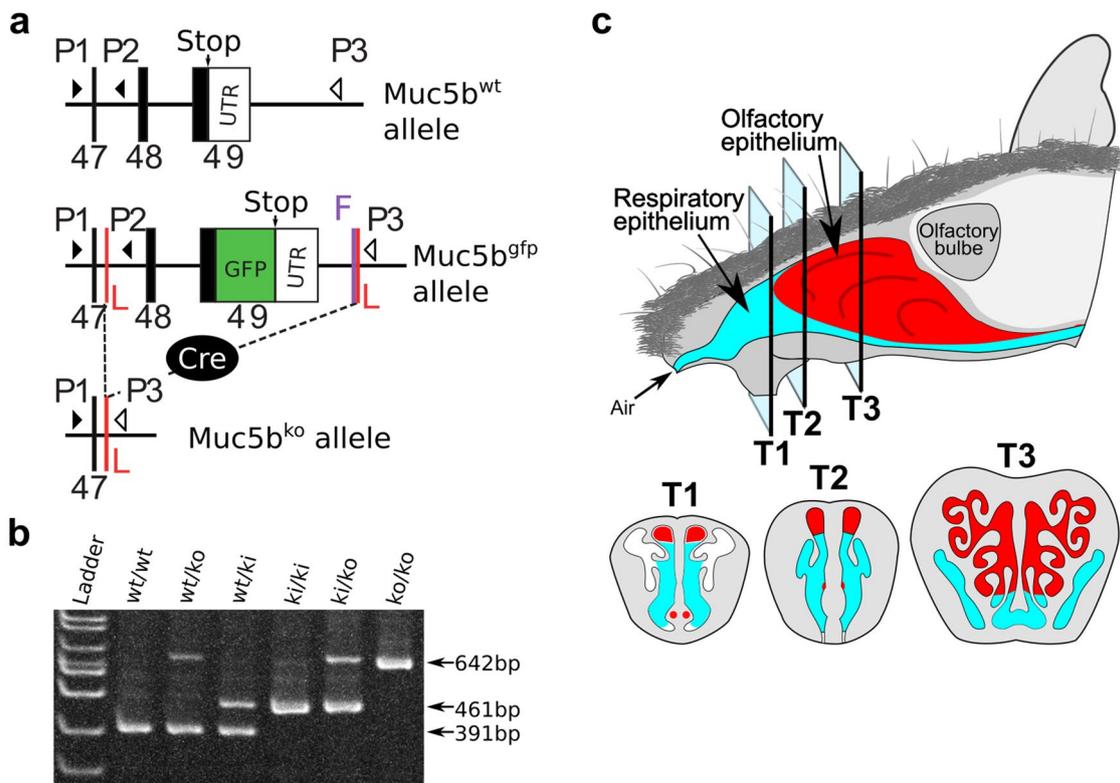


Fig. 1 *Muc5b*^{-/-} mouse line, genotyping, and schematic drawing of the epithelium of the mouse nose. **a** Schematic representation of the 3'-end of the mouse *Muc5b* with its last three exons (47–49) and its unique 3' UTR. The reporter *Muc5b*–GFP mouse was obtained by homologous recombination to insert a GFP sequence in-frame with *Muc5b* (Desseyne et al. 2018). The last two exons are flanked by *LoxP* (L) sites. A unique FRT (F) site remains after the excision of a neomycin cassette. The *Muc5b*-deficient knockout (ko) allele is obtained after Cre excision of the last two exons. The three oligonucleotides

P1–3 and their orientation used for genotyping are indicated by triangles. **b** Example of genotyping obtained by PCR analyzed in 8% acrylamide gel using DNA samples from all mouse genotypes with predicted bands of 391, 461, and 642 bp for the WT (*Muc5b*⁺), the *Muc5b*–GFP knock-in (ki), and the *Muc5b*-deficient (ko) alleles, respectively. **c** Schematic representation of the mouse nose adapted from Harkema et al. (2006) showing transversal sections T1–3 used in the study with the RE in blue and the OE in red

immunohistochemistry, primary polyclonal anti-*Muc5b* (CP1), monoclonal anti-MUC5AC (45M1, kindly given by J. Bara), and commercial rabbit polyclonal anti-GFP antibodies (ab290; Abcam, Cambridge, UK), which have been used successfully by hundreds of researchers (45M1 and anti-GFP), were used (Lidell et al. 2008; Gouyer et al. 2010; Valque et al. 2011; Portal et al. 2017a, b). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) were used to detect the primary antibodies. Because *Muc5ac* immunostaining requires a citrate pretreatment, dual *Muc5b* and *Muc5ac* immunostaining was performed only on *Muc5b*–GFP reporter and *Muc5b*^{-/-} mice using the anti-GFP antibody. FITC-conjugated anti-rabbit and tetramethylrhodamine (TRITC) anti-mouse secondary antibodies were used. TRITC-conjugated *Maackia amurensis* agglutinin (MAA) and TRITC-conjugated *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-1) lectins (EY Laboratories, San Mateo, CA, USA), which recognize mucin terminal glycotopes α -(2,3)-linked

sialic acid and fucose α -(1,2)-galactose, respectively, were used as described previously (Gouyer et al. 2015). Dual labeling using MAA and UEA-1 lectins was performed with TRITC-conjugated MAA and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated UEA-1 lectins. Nuclei (blue) were counterstained with Hoechst 33258 as before (Valque et al. 2011). Three to five noses from each genotype were analyzed. High-quality captures in bright field and fluorescence were performed, and images were digitized on an Axio Scan (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Z1 scanner and processed with ZEN software (Carl Zeiss).

Results and discussion

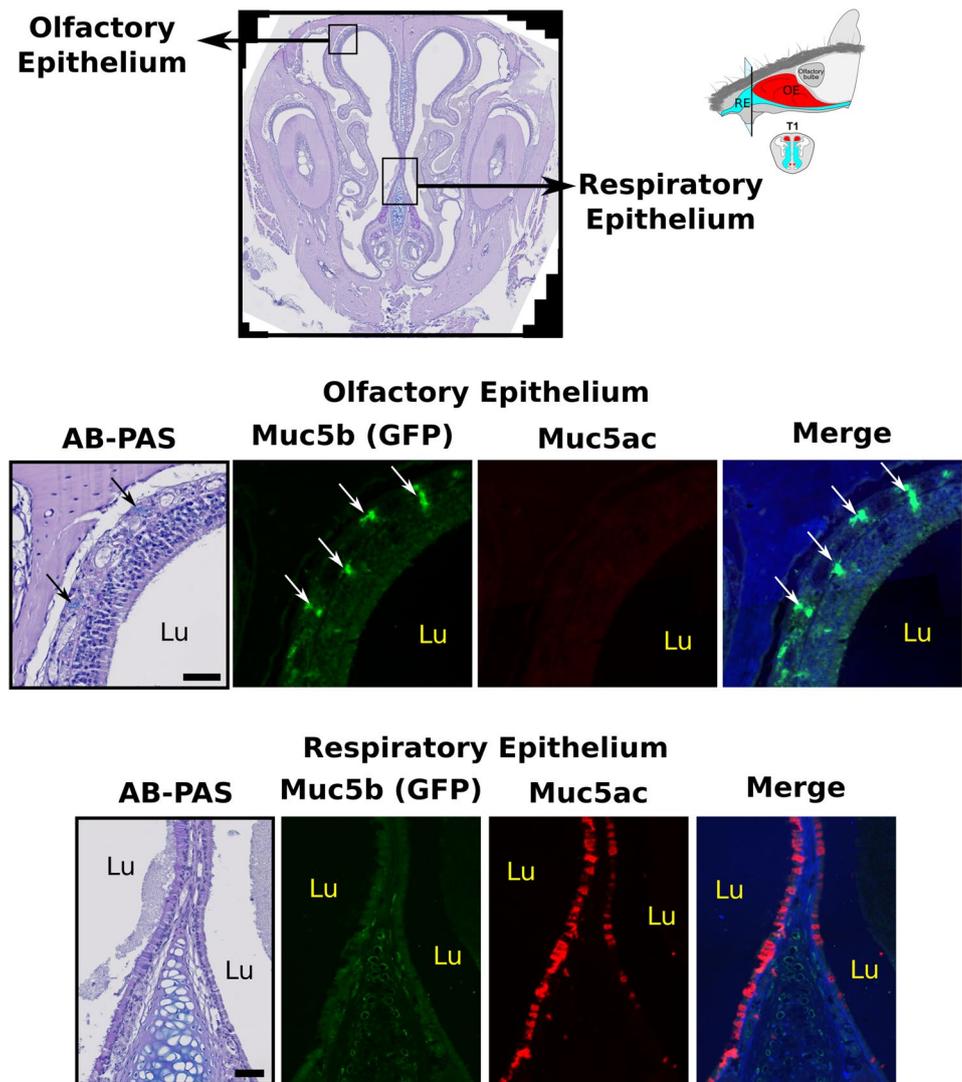
Mucin expression in the nasal airway

Muc5b production has been reported recently in mouse BGs in one study using immunohistochemistry (Chen et al.

2018), but Chen et al. noted that they could not get the currently available antibodies that are specific for mouse Muc5ac to work in decalcified specimens. Another group reported that rat and mouse BGs might produce Muc5b, but secrete mainly Muc5ac (Solbu and Holen 2012). In this last work, Muc5ac staining was observed using a mouse monoclonal antibody (Clone SPM488). However, this antibody has not been validated in mouse and is directed against a nonglycosylated synthetic 20-mer peptide from the tandem repeat sequence of the human mucin MUC5AC (Reis et al. 2000) that is not conserved in the mouse Muc5ac sequence. In the present study, we took advantage of our reporter Muc5b–GFP mouse to determine the expression pattern of Muc5b using two antibodies, one directed against a “naked” mucin peptide (Valque et al. 2011), and the other against the GFP-tag of the reporter Muc5b transgenic mouse. Additionally, we studied the expression of the other major respiratory GFM, Muc5ac (Valque et al. 2011). Transverse sections

from the proximal (T1) region, which predominantly contains RE, to the distal (T3) nasal airway (Fig. 1c), which predominantly contains OE, were analyzed by AB-PAS staining and immunohistochemistry. In the proximal nasal airway (T1), AB-PAS staining showed glycoconjugates in BGs underlying the OE and in mucous cells of the RE (Fig. 2). In the OE, BGs produced Muc5b but not Muc5ac as shown using the anti-GFP antibody in Muc5b–GFP mice (Fig. 2). This was confirmed using the anti-Muc5b antibody in WT mice (Suppl. Figure 1) and in Muc5b–GFP reporter mice (data not shown), whereas Muc5ac but not Muc5b was found exclusively in the RE of T1 sections of Muc5b–GFP reporter mice (Fig. 2) and WT mice (Suppl. Figure 2). In the distal nasal airway (T3 sections), Muc5b but not Muc5ac is produced in the OE of reporter Muc5b–GFP mice (Fig. 3). This was further confirmed using the anti-Muc5b antibody in WT (Suppl. Figure 2) and Muc5b–GFP reporter mice (data not shown). In contrast to T1, the RE was characterized by

Fig. 2 Immunohistochemical analysis of GFP and Muc5ac in nose coronal sections of the proximal (T1) nasal airway of Muc5b–GFP reporter mice. Serial sections were stained with AB-PAS and antibodies against GFP (green) and Muc5ac (red). Higher magnification images taken from the boxed areas in the OE and RE are shown. BGs (arrow) are filled with glycoconjugated materials that are AB-PAS-positive and specifically recognized by the anti-GFP antibody, but not the anti-Muc5ac antibody. Mucous cells of the RE expressed Muc5ac, but not Muc5b. Lu lumen. Scale bar = 50 μ m



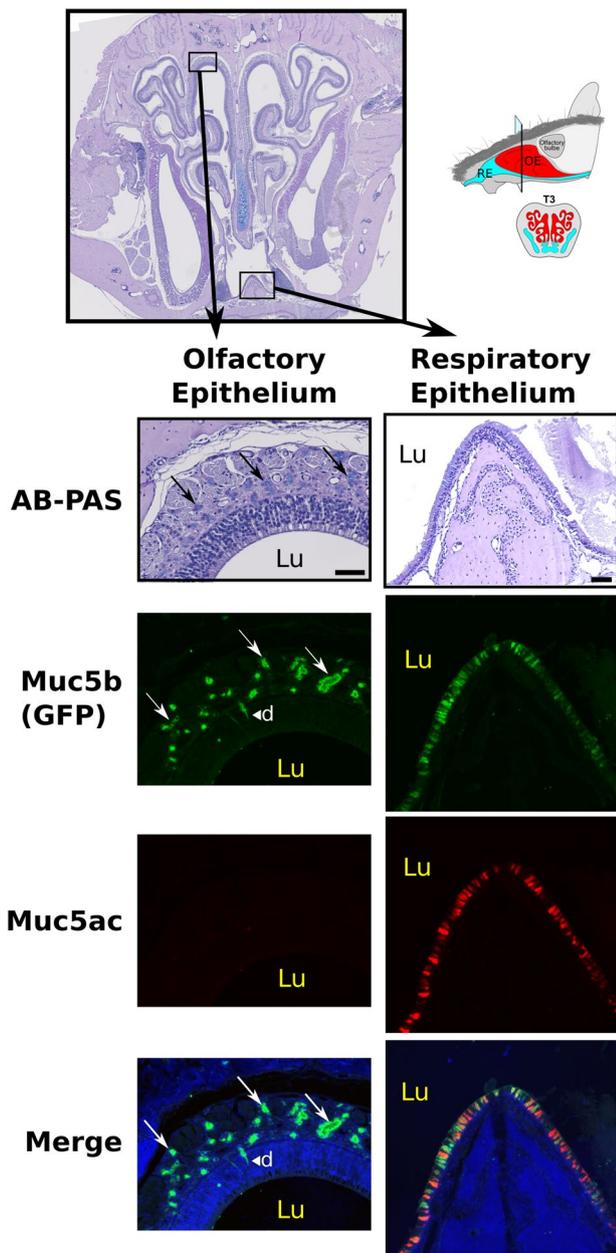


Fig. 3 Immunohistochemical analysis of GFP and Muc5ac in nose coronal sections of the distal (T3) nasal airway of Muc5b-GFP mice. Serial sections were stained with AB-PAS and antibodies against GFP (green) and Muc5ac (red). Higher magnification images taken from the boxed areas in the OE and RE are shown. BGs (arrow) in the OE are filled with glycoconjugated materials that are AB-PAS-positive and specifically recognized by the anti-GFP antibody. GFP-positive ducts (d) are also observed. Mucous cells in the RE expressed Muc5ac, Muc5b, or both. Lu lumen. Scale bar = 50 μ m

the expression of both Muc5b and Muc5ac in Muc5b-GFP reporter (Fig. 3) and WT mice (Suppl. Figure 2).

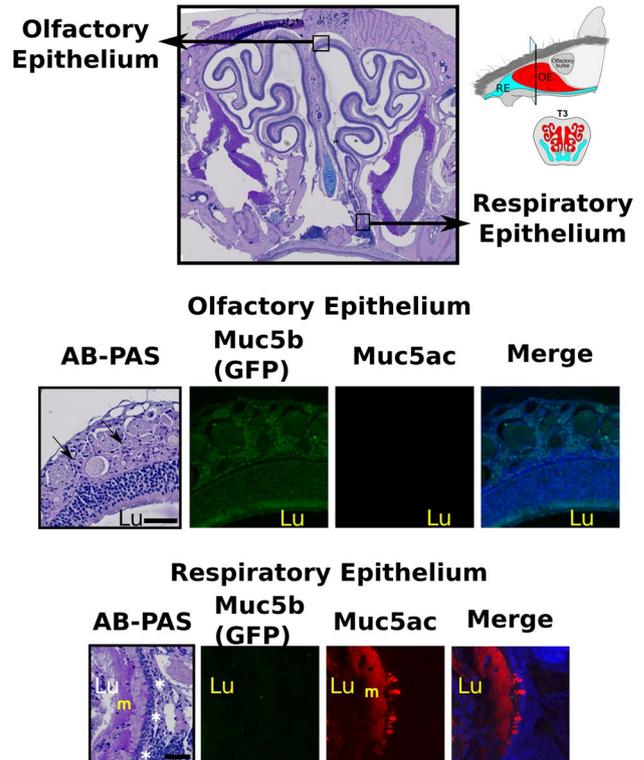
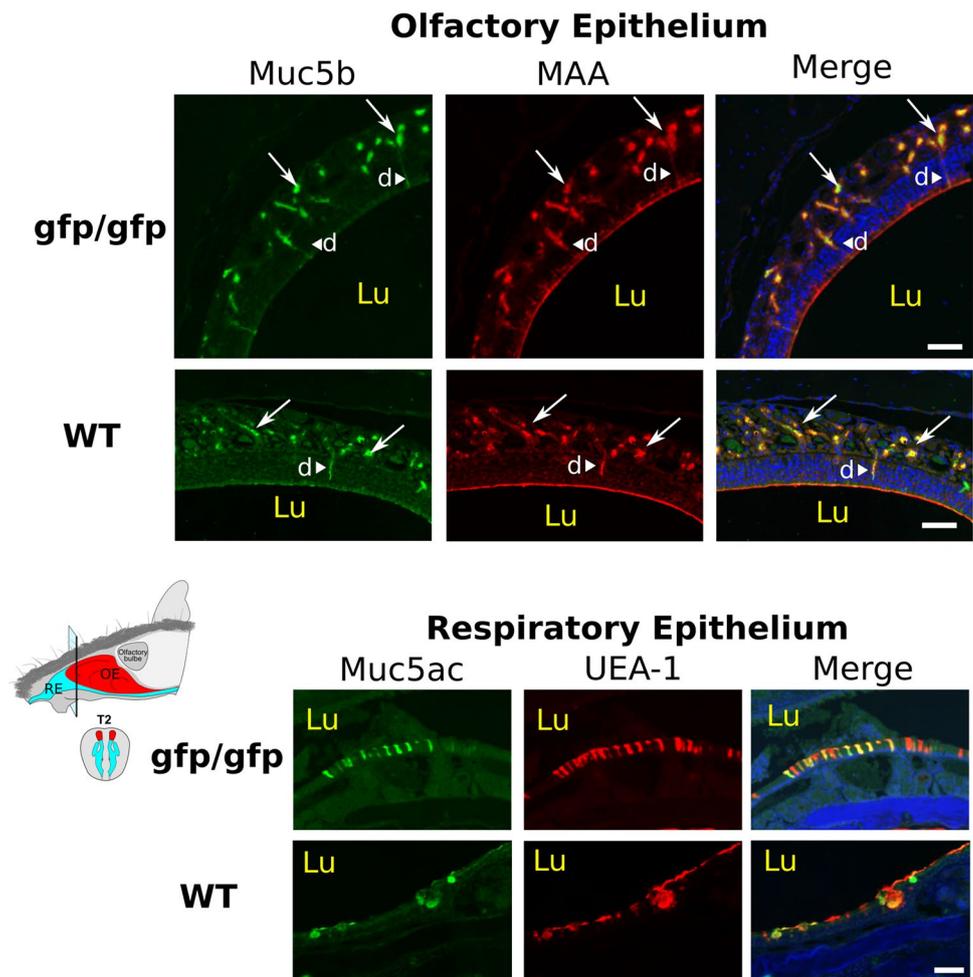


Fig. 4 Immunohistochemical analysis of GFP and Muc5ac in nose coronal sections of the proximal (T3) nasal airway from Muc5b^{-/-} mice. Serial sections were stained with AB-PAS and antibodies against GFP (green) and Muc5ac (red). Higher magnification images taken from the boxed areas in the OE and RE are shown. BGs (arrow) in the OE are depleted as almost no glycoconjugates and no GFP staining was observed. Mucous cells in the RE expressed Muc5ac, but not Muc5b. Lu lumen. Scale bar = 50 μ m

BGs are depleted in Muc5b-deficient mice

To demonstrate that genetically removing the last two exons of the floxed reporter Muc5b mouse (Desseyn et al. 2018) leads to a Muc5b-deficient mouse (Fig. 1a) and to examine whether Muc5b invalidation leads to a compensatory production of Muc5ac, Muc5b-GFP homozygous mice after Cre recombination (Muc5b^{-/-}) were studied by immunohistochemistry. Muc5b and Muc5ac expression was analyzed in transverse sections of the distal airway (T3). In Muc5b^{-/-} mice, AB-PAS staining showed a depletion of BGs that appeared nearly empty of glycoconjugates (Fig. 4). This was in agreement with the absence of staining using the anti-GFP antibody in the OE (Fig. 4) and the anti-Muc5b antibodies in Muc5b^{-/-} mice (Suppl. Figure 3a). No difference in Muc5ac expression in the RE was observed in Muc5b^{-/-} mice in comparison with Muc5b-GFP mice (see Figs. 3 and 4), and no compensatory production of Muc5ac in BGs of Muc5b^{-/-} mice was observed (Fig. 4). We also looked at Muc6 and Muc2 by immunohistochemistry using

Fig. 5 Multilabel immunohistochemical analysis of Muc5b and Muc5ac lectins in the OE and RE of coronal sections of the T2 nasal airway from WT and Muc5b–GFP reporter mice. High magnification images of the OE and RE are shown. Colocalization of Muc5b and MAA lectin was observed in BGs (arrows) underlying the OE and in Bowman's gland ducts (d). Mucous cells of the RE are recognized by UEA lectin that colocalized in many cells with Muc5ac (yellow). *Lu* lumen. Scale bar = 50 μ m



our home made antibody against mouse Muc6 (Gouyer et al. 2010) and the H300 anti-Muc2 antibody (SantaCruz, Gouyer et al. 2011). No Muc6 or Muc2 signal was observed in T1 and T3 sections from Muc5b–GFP and Muc5b^{-/-} mice (data not shown).

Muc5b- and Muc5ac-specific lectin recognition in the nasal epithelium

Immunofluorescence of pig MUC5B and MUC5AC in the lung showed that some lectins preferentially labeled either MUC5B or MUC5AC (Ermund et al. 2017; Ostedgaard et al. 2017). In the horse, the UEA-1 fucose lectin was found to label BGs in the OE (Lee et al. 2016). In the nose of mice, sialomucin with different terminal carbohydrate structures has been observed in the RE and OE, which may reflect differences in the susceptibility to bacterial colonization between the two epithelia (Ueno et al. 1994; Yoon et al. 1998). These two last studies reported that the mouse OE, but not the goblet cells of the RE is sialylated, whereas one study showed that mouse BGs produced sulfated but not sialylated glycoconjugates using high-iron diamine-AB staining

(Kondo et al. 2009). To determine if there are specific lectins for nasal Muc5ac and Muc5b mucins, we used dual labeling with the two fluorescent-conjugated MAA and UEA-1 lectins that disclosed distinct goblet cell subpopulations in the mouse intestine (Gouyer et al. 2011). In T2 sections of Muc5b–GFP reporter and WT mice, Muc5b antibody staining colocalized with MAA in BGs and BG ducts (Fig. 5). Muc5ac seemed to colocalize with UEA-1 (Fig. 5) whereas MAA staining almost disappeared, and UEA-1 did not stain the OE of Muc5b^{-/-} mice (Suppl. Figure 3a). Furthermore, MAA did not label the RE (Suppl. Figure 3a). In both Muc5b–GFP reporter and WT mice, double-labeling with fluorescent-conjugated MAA and UEA-1 lectins showed that MAA but not UEA-1 bound to BGs in the OE, whereas UEA but not MAA-labeled mucous cells of the RE (Suppl. Figure 3b). The preferential binding of MAA to Muc5b and UEA-1 to Muc5ac in the nasal airway indicates that the two main airway GFMs harbor distinct terminal glycotopes. Our observations are in agreement with results obtained in pig and rat airways. It has been shown that UEA-1 lectin and anti-MUC5AC antibodies stained the surface goblet cells in the lung of pigs (Ermund et al. 2017) and that *wheat germ*

agglutinin lectin, which binds to *N*-acetyl-D-glucosamine and sialic acid, preferentially labeled MUC5B (Ostedgaard et al. 2017). In adult rat airway epithelium, fucosylated glycoconjugates were detected by UEA-1 in goblet cells (Castells et al. 1991). How important the differential O-glycosylation of the two mucins is remains to be elucidated. It might reflect distinct mucus architecture and properties between the RE and the OE, and specific microbiome in the two epithelia. Future investigations will need to clarify whether the microbiome differs between the two sites and in the absence of Muc5b.

In conclusion, we report here using WT, Muc5b–GFP reporter, and Muc5b-deficient mice that the expression of the two main respiratory mucins at the peptide level differs in specific regions in the upper airway. Muc5ac is produced only in the RE and is preferentially fucosylated, whereas Muc5b is produced by BGs in the OE and is preferentially sialylated.

Acknowledgements We thank J. Bara for the gift of the 45M1 antibody, M.H. Gevaert (Service Commun-Morphologie Cellulaire, Université de Lille) for the slides, J. Devassine and Y. Lepage from the EOPS animal facility (Université de Lille) for mouse colony management and S. Plet and M. Magnien (LIRIC) for genotyping and dissection and the Bio-imaging Center (plate-forme de microscopie photonique, Université Lille) for Carl Zeiss Axio Scan. Z1 scanner.

Funding S.-E. A. is the recipient of a “Université de Lille” fellowship. C.P. was the recipient of a “Université Lille 2” fellowship.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

Ethical approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

References

- Ali MS, Pearson JP (2007) Upper airway mucin gene expression: a review. *Laryngoscope* 117:932–938
- Aust MR, Madsen CS, Jennings A et al (1997) Mucin mRNA expression in normal and vasomotor inferior turbinates. *Am J Rhinol* 11:293–302
- Castells MT, Ballesta J, Madrid JF et al (1991) Characterization of glycoconjugates in developing rat respiratory system by means of conventional and lectin histochemistry. *Histochemistry* 95:419–426
- Chen CR, Kachramanoglou C, Li D et al (2014) Anatomy and cellular constituents of the human olfactory mucosa: a review. *J Neurol Surg B Skull Base* 75:293–300. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1361837>
- Chen J, Kaiyala KJ, Lam J et al (2015) In vivo structure-function studies of human hepatic lipase: the catalytic function rescues the lean

- phenotype of HL-deficient (*hl*^{-/-}) mice. *Physiol Rep* 3:e12365. <https://doi.org/10.14814/phy2.12365>
- Chen G, Volmer AS, Wilkinson KJ et al (2018) Role of Spdef in the regulation of Muc5b expression in the airways of naive and mucoobstructed mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 59:383–396. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-01270C>
- Corfield A (2017) Eukaryotic protein glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochem Cell Biol* 147:119–147. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1526-4>
- Desseyn J-L, Portal C, Gottrand F, Gouyer V (2018) Transgenic mouse reporter to study Muc5b in vivo. *Ann Am Thorac Soc* 15:S149–S153. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201802-085AW>
- Ermund A, Meiss LN, Rodriguez-Pineiro AM et al (2017) 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.113>
- François A, Grebert D, Rhimi M et al (2016) Olfactory epithelium changes in germfree mice. *Sci Rep* 6:24687. <https://doi.org/10.1038/srep24687>
- Gouyer V, Leir S-H, Tetaert D et al (2010) The characterization of the first anti-mouse Muc6 antibody shows an increased expression of the mucin in pancreatic tissue of Cfr-knockout mice. *Histochem Cell Biol* 133:517–525. <https://doi.org/10.1007/s00418-010-0688-8>
- Gouyer V, Gottrand F, Desseyn J-L (2011) The extraordinarily complex but highly structured organization of intestinal mucus-gel unveiled in multicolor images. *PLoS One* 6:e18761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018761>
- Gouyer V, Dubuquoy L, Robbe-Masselot C et al (2015) Delivery of a mucin domain enriched in cysteine residues strengthens the intestinal mucous barrier. *Sci Rep* 5:9577. <https://doi.org/10.1038/srep09577>
- Gross EA, Swenberg JA, Fields S, Popp JA (1982) Comparative morphometry of the nasal cavity in rats and mice. *J Anat* 135:83–88
- Harkema JR, Carey SA, Wagner JG (2006) The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol Pathol* 34:252–269. <https://doi.org/10.1080/01926230600713475>
- Heydel J-M, Coelho A, Thiebaud N et al (2013) Odorant-binding proteins and xenobiotic metabolizing enzymes: implications in olfactory perireceptor events. *Anat Rec* 296:1333–1345. <https://doi.org/10.1002/ar.22735>
- Kondo K, Watanabe K, Sakamoto T et al (2009) Distribution and severity of spontaneous lesions in the neuroepithelium and Bowman’s glands in mouse olfactory mucosa: age-related progression. *Cell Tissue Res* 335:489–503. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0739-9>
- Lee K-H, Park C, Bang H et al (2016) Histochemical study of the olfactory mucosae of the horse. *Acta Histochem* 118:361–368. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.03.006>
- Lidell ME, Bara J, Hansson GC (2008) Mapping of the 45M1 epitope to the C-terminal cysteine-rich part of the human MUC5AC mucin. *FEBS J* 275:481–489. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06215.x>
- Linden SK, Sutton P, Karlsson NG et al (2008) Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol* 1:183–197
- Ostedgaard LS, Moninger TO, McMenimen JD et al (2017) Gel-forming mucins form distinct morphologic structures in airways. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:6842–6847. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703228114>
- Paulsen F (2006) Cell and molecular biology of human lacrimal gland and nasolacrimal duct mucins. *Int Rev Cytol* 249:229–279. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)49005-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)49005-7)
- Portal C, Gouyer V, Gottrand F, Desseyn J-L (2017a) Preclinical mouse model to monitor live Muc5b-producing conjunctival

- goblet cell density under pharmacological treatments. *PLoS One* 12:e0174764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174764>
- Portal C, Gouyer V, Magnien M et al (2017b) In vivo imaging of the Muc5b gel-forming mucin. *Sci Rep* 7:44591. <https://doi.org/10.1038/srep44591>
- Radicioni G, Cao R, Carpenter J et al (2016) The innate immune properties of airway mucosal surfaces are regulated by dynamic interactions between mucins and interacting proteins: the mucin interactome. *Mucosal Immunol* 9:1442–1454. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.27>
- Reis CA, David L, Carvalho F et al (2000) Immunohistochemical study of the expression of MUC6 mucin and co-expression of other secreted mucins (MUC5AC and MUC2) in human gastric carcinomas. *J Histochem Cytochem* 48:377–388. <https://doi.org/10.1177/002215540004800307>
- Solbu TT, Holen T (2012) Aquaporin pathways and mucin secretion of Bowman's glands might protect the olfactory mucosa. *Chem Senses* 37:35–46. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjr063>
- Ueno K, Hanamura Y, Ohyama M (1994) Differences in terminal carbohydrate structures of sialomucin in the murine nasal cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 251:119–122
- Valque H, Gouyer V, Husson M-O et al (2011) Abnormal expression of Muc5b in Cfr-null mice and in mammary tumors of MMTV-ras mice. *Histochem Cell Biol* 136:699–708. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0872-5>
- Yoon JH, Kim KS, Kim SS, Lee JG (1998) Sialoglycoproteins and penultimate sugar expression pattern in developing murine olfactory and respiratory mucosa. *Yonsei Med J* 39:20–26. <https://doi.org/10.3349/ymj.1998.39.1.20>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.