

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE I

# THÈSE

de Doctorat d'Université

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

## EXPRESSION DES GÈNES DE MUCINES HUMAINES

*Etude de la stabilité, de l'hétérogénéité et du polymorphisme des ARNm*

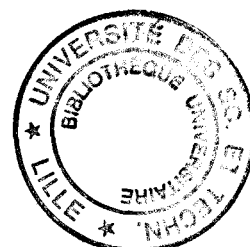
présentée par

**Virginie DEBAILLEUL**

Soutenue le 1<sup>er</sup> avril 1997 devant la commission d'examen

### JURY

Président : Professeur André VERBERT  
Rapporteurs : Docteur Dallas SWALLOW  
Docteur Bruno CLEMENT  
Membres : Professeur Pierre DEGAND  
Professeur Philippe DELANNOY  
Docteur Nicole PORCHET



Cinq années passées dans un laboratoire de Recherche,  
c'est à la fois une chance et un défi.

La Recherche...où se mêlent Attente, Désillusion, et Joie.

Comment acquérir de l'Expérience, et l'Humilité.

*Je tiens à remercier très sincèrement :*

Monsieur le Professeur Degand : Vous m'avez accueillie au sein de votre laboratoire depuis mon D.E.A. jusqu'à mon doctorat. Je tiens à vous remercier pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail et au temps que vous avez consacré à mon avenir.

Madame le Docteur Nicole Porchet : Tu as accepté de m'encadrer et m'as aidée tout au long de ce travail de thèse. Pendant ces cinq années, tu m'as fait partager ton enthousiasme et tes compétences pour la recherche, je t'en suis très reconnaissante.

Monsieur le Docteur Jean-Pierre Aubert: Ta disponibilité, ton soutien et tes conseils efficaces m'ont grandement aidée, je te remercie sincèrement.

Madame le Docteur Anne Laine : Ta gentillesse, tes encouragements dans les moments difficiles, m'ont été d'un réel soutien, je t'en remercie très vivement.

Marie-Paule, Pascal, Danièle et Viviane : Je vous remercie vivement pour votre aide technique si précieuse et votre disponibilité à tout moment.

Séverine, Jean-Luc, Marie-Pierre, Nicolas et Isabelle : Notre connivence restera un excellent souvenir. Je vous adresse toute mon amitié.

Je remercie également Madame le Docteur Guillemette Huet, Madame le Docteur Galieque-Zouitina, Madame le Docteur Maud Collyn-D'Hooghe et Monsieur Claude Denis pour leur efficace et aimable collaboration.

Je remercie Monsieur Claude Vandepierre pour la qualité de la documentation photographique.

*Je remercie très sincèrement pour l'honneur qu'ils me font :*

*Monsieur le Professeur André Verbert,*

*en acceptant de présider ce jury;*

*Madame le Docteur Dallas Swallow,*

*Monsieur le Docteur Bruno Clément,*

*en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse;*

*Monsieur le Professeur Pierre Degand,*

*Monsieur le Professeur Philippe Delannoy,*

*Madame le Docteur Nicole Porchet, mon tuteur de thèse*

*en acceptant de juger ce travail.*

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans l'équipe de Recherche sur la Génétique des Apomucines Humaines, sous la direction scientifique de **Madame le Docteur PORCHET**, au sein de l'Unité de Recherche N°377 "Biologie et Physiopathologie des Cellules Mucipares" de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) dirigée par **Monsieur le Professeur DEGAND**.

**Il a bénéficié de la collaboration de :**

Madame le Docteur G. HUET (Unité INSERM N°377, à Lille),

Madame le Docteur M. COLLYN (Unité INSERN N°124 à Lille);

Madame le Docteur S. GALIEGUE (Unité INSERN N°124 à Lille);

## *PUBLICATIONS*

**V. Guyonnet Duperat, J.P. Audié, V. Debailleul, A. Laine, M.P. Buisine, S. Galieguezouitina, P. Pigny, P. Degand, J.P. Aubert and N. Porchet**

Characterization of the human mucin gene MUC5AC : a consensus cysteine-rich domain for 11p15 mucin genes?

*Biochem. J.*, 1995, 305: 211-219

**N. Porchet, P. Pigny, M.P. Buisine, V. Debailleul, P. Degand, A. Laine and J.P. Aubert**

Human mucin genes: genomic organization and expression of MUC4, MUC5AC and MUC5B.

*Biochem. Soc. Trans.*, 1995, 23: 800-805

**M.P. Buisine, B. Vandehaute, V. Debailleul, N. Porchet et J.P. Aubert**

Expression des gènes de mucines au niveau hepato-biliaire (résumé).

*J. Clin. Biol.*, 1996, 20: 392

**B. Vandehaute, M.P. Buisine, V. Debailleul, B. Clément, N. Moniaux, M.C. Dieu, P. Degand., N. Porchet et J.P. Aubert**

Mucin gene expression in biliary epithelial cells.

*J. Hepatology*, *soumis pour publication*

*Ce travail de thèse fera l'objet de deux publications, dont l'une en cours de rédaction sera soumise à Biochemical Journal.*

## *COMMUNICATIONS*

**J.P. Audié, V. Debailleul, V. Guyonnet Duperat, A. Laine, J.P. Aubert and N. Porchet**

Expression and structural features of human gastric mucins ascertained by cDNA cloning.

*2nd international workshop on carcinoma-associated mucins, 2-6 août 1992*

**A. Laine, J.P. Audié, V. Debailleul, V. Guyonnet Duperat, J.Dufossé, N. Porchet and J.P. Aubert**

Expression and structural features of human mucins. 4th joint meeting of the nederlandse vereniging voor de bestudering van glycoconjugaten.

*Organon OSS, 26-27 novembre 1992*

**V. Debailleul, V. Guyonnet Duperat, A. Laine, M.P.Buisine, P. Pigny, J.P.Aubert and N. Porchet**

Characterization of the human mucin gene MUC 5AC: a consensus cysteine-rich domain for 11p15 mucin genes?

*3rd international workshop on carcinoma-associated mucins, Cambridge, 1994*

**A. Laine, V. Guyonnet Duperat, V. Debailleul, M.P. Buisine, P. Pigny, J.P. Aubert and N. Porchet**

Study of the genomic organization of MUC 5B mucin gene

*3rd international workshop on carcinoma-associated mucins, Cambridge, 1994*

**M.P.Buisine, A.Laine; V.Debailleul, V. Guyonnet Duperat, P. Pigny, N.Porchet and J.P. Aubert**

Aberrant expression of a mucin gene (MUC5AC) in rectosigmoid villous adenoma ascertained by in situ hybridization

*3rd international workshop on carcinoma-associated mucins, Cambridge, 1994*

**P. Pigny, V. Guyonnet Duperat, A. Laine, V. Debailleul, M.P. Buisine, J.P. Aubert et N. Porchet**

Progrès dans l'étude de l'organisation des gènes de mucines humaines en 11p15

*3eme campagne d'animation de la recherche de l'INSERM, Lille, 1994*

**M.P.Buisine, A. Janin, P. Pigny, A. Laine, V.Debailleul, N.Porchet et J.P.Aubert**

Etude de l'expression des gènes de mucines au niveau respiratoire, digestif et génital par hybridation in situ

*3eme campagne d'animation de la recherche de l'INSERM, Lille, 1994*

**M.P.Buisine, V.Debailleul, B.Vandenhoute, N.Porchet et J.P. Aubert**

Mucin gene expression in the human hepato-biliary tract.

*4th international workshop on carcinoma-associated mucins, Cambridge, 1996*

## ABREVIATIONS

---

AA	acide aminé
Ac	anticorps
ADN	acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire à l'ARNm
Ag	antigène
ApoB	apolipoprotéine B
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ATP	adénosine triphosphate
c.p.m.	coups par minute
Da	dalton
dATP	déoxyadénosine triphosphate
dCTP	déoxycytosine triphosphate
DEPC	diéthylpyrocarbonate
D.O.	densité optique
EDTA	acide éthylène dinitrilotétraacétique
Gal	galactose
GalNAc	N-acétyl galactosamine
GlcNAc	N-acétyl glucosamine
HIS	hybridation <i>in situ</i>
Ig	immunoglobuline
kb	kilobase
M	molaire
mM	millimolaire
MOPS	acide 3-(N-morpholino)-propane sulfonique
PAS	periodic acid Schiff
pb	paire de bases
PBS	phosphate buffered saline
P.C.R.	polymerase chain reaction
PFGE	pulsed field gel electrophoresis
<sup>32</sup> P	phosphore 32
qsp	quantité suffisante pour
RER	réticulum endoplasmique rugueux
RNase	ribonucléase
SA	semaine d'aménorrhée
SDS	sodium dodecyl sulfate
spDNA	salmon sperm DNA
TE	Tris-EDTA
Tris	tris-(hydroxyméthyl)-aminoéthane
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat
vWF	facteur von Willebrand



# SOMMAIRE

## INTRODUCTION

---

<b>I LE MUCUS</b> .....	<b>1</b>
-------------------------	----------

<b>II MUCUS ET PATHOLOGIES</b> .....	<b>3</b>
--------------------------------------	----------

<b>1- Maladies respiratoires</b> .....	<b>3</b>
<i>a - les pathologies broncho-pulmonaires de l'enfant</i> .....	<b>3</b>
<i>b - la bronchite chronique</i> .....	<b>3</b>
<i>c - l'asthme</i> .....	<b>4</b>
<i>d - la mucoviscidose</i> .....	<b>4</b>
<b>2- Maladies inflammatoires du tube digestif</b> .....	<b>6</b>
<i>a - la rectocolite hémorragique</i> .....	<b>6</b>
<i>b - la maladie de Crohn</i> .....	<b>6</b>
<i>c- gastrite et ulcère</i> .....	<b>7</b>
<b>3 - Cancers épithéliaux</b> .....	<b>7</b>
<b>4 - Gynécologie</b> .....	<b>8</b>

<b>III LES MUCINES</b> .....	<b>10</b>
------------------------------	-----------

<b>A - FONCTIONS BIOLOGIQUES DES MUCINES</b> .....	<b>10</b>
--	-----------

<b>1- les mucines sécrétées</b> .....	<b>10</b>
---------------------------------------	-----------

2- les mucines membranaires .....	11
<i>a- caractéristiques biochimiques</i> .....	11
<i>b- caractéristiques fonctionnelles</i> .....	11
3- rôle des mucines dans les cellules tumorales .....	12
<b>B - PROPRIETES BIOCHIMIQUES DES MUCINES</b> .....	13
1- Purification des mucines.....	13
2- Structure des mucines.....	14
<i>a- modèle de Allen</i> .....	16
<i>b- modèle de Carlsedt</i> .....	16
3- Les glycannes .....	19
<i>a- les mucines neutres, acides et très acides</i> .....	19
<i>b- les chaînes glycaniques</i> .....	19
<i>c- diversité des glycosyltransférases</i> .....	21
4- Les axes peptidiques.....	24
<i>a - approche par la biochimie classique</i> .....	24
<i>b - approche par la biologie moléculaire</i> .....	25
*MUC 1, MUC 2 .....	26
*MUC 3, MUC 6 .....	29
*MUC 4, MUC 5AC .....	30
*MUC 5B .....	33
*MUC 7.....	35
5- Biosynthèse des mucines .....	37
<i>a-N- et O- glycosylations</i> .....	37
<i>b- formation d'oligomères</i> .....	38
<i>c- transport intracellulaire et sécrétion</i> .....	39
6- Histochimie des mucines.....	40
<i>a - principe</i> .....	40
<i>b - principaux types histochimiques de mucines</i> .....	40
<i>c - méthodes histochimiques</i> .....	41
7- Les mucines animales.....	41
<b>C- LES GENES DE MUCINES</b> .....	44
1- Connaissances actuelles des différents gènes de mucines .....	44
2- Les gènes de mucines en 11p15.5.....	51

<b>3- Caractéristiques des gènes de mucines.....</b>	<b>53</b>
<i>a- taille des gènes .....</i>	<i>53</i>
<i>b- polymorphisme .....</i>	<i>53</i>
<i>c- expression en Northern blot .....</i>	<i>54</i>
<b>3- Expression des gènes de mucines.....</b>	<b>55</b>
<i>a- expression tissulaire par la technique de Northern blot.....</i>	<i>55</i>
<i>b- expression cellulaire par la technique d'hybridation in situ .....</i>	<i>57</i>
<i>c- expression des gènes de mucines au cours du développement.....</i>	<i>57</i>

## **D- MUCINES ET PATHOLOGIES .....59**

<b>1- Modifications de la composition des chaînes glycaniques de mucines au cours de la carcinogénèse.....</b>	<b>60</b>
<i>a- modifications des chaînes glycaniques.....</i>	<i>60</i>
<i>b- modifications des antigènes de mucines accompagnant les processus de transformation maligne et de métastase .....</i>	<i>61</i>
<i>c- perspectives en applications cliniques.....</i>	<i>61</i>
<b>2- Modifications de l'expression des gènes de mucines .....</b>	<b>62</b>
<i>a- cancers épithéliaux et expression du gène MUC 1 .....</i>	<i>62</i>
<i>b- cancer du sein.....</i>	<i>62</i>
<i>c- tumeurs coliques.....</i>	<i>63</i>
* <i>cancer du côlon.....</i>	<i>63</i>
* <i>tumeurs villoses rectosigmoïdiennes.....</i>	<i>63</i>
<i>d- cancer du pancréas.....</i>	<i>64</i>
<i>e- cancer de l'estomac.....</i>	<i>64</i>
<i>f- cancer du poumon.....</i>	<i>65</i>
<i>g- vésicule biliaire : lithiase et cancer.....</i>	<i>65</i>

## **STRATEGIE**

67

### **I SITUATION DU SUJET .....69**

<b>1- Profils d'expression observés en Northern blot : constat d'un signal inusuel...69</b>	<b>69</b>
<b>2- Hypothèses soulevées dans la littérature .....</b>	<b>75</b>

<b>3- Nos hypothèses .....</b>	<b>76</b>
<i>a- hypothèse d'une hétérogénéité réelle.....</i>	<i>77</i>
<i>b- hypothèse d'une hétérogénéité artificielle.....</i>	<i>78</i>
<b>4- Les continuums décrits dans la littérature à propos d'autres protéines .....</b>	<b>79</b>
<i>a- les continuums liés à un phénomène biologique.....</i>	<i>79</i>
<i>b- les continuums reliés à un artefact.....</i>	<i>79</i>

<b>II STRATEGIE ADOPTEE.....</b>	<b>82</b>
----------------------------------	-----------

## **RESULTATS**

---

<b>I RECHERCHE D'UNE RELATION ENTRE HETEROGENEITE CELLULAIRE ET HETEROGENEITE DU SIGNAL D'EXPRESSION DES APOMUCINES : COMPARAISON DE L'EXPRESSION DANS LES TISSUS ET DANS LES LIGNEES CELLULAIRES.....</b>	<b>84</b>
--	-----------

<b>A- MATERIEL BIOLOGIQUE.....</b>	<b>84</b>
------------------------------------	-----------

<b>B- RESULTATS .....</b>	<b>86</b>
---------------------------	-----------

<b>C- DISCUSSION .....</b>	<b>86</b>
----------------------------	-----------

<b>II ETUDE DE LA DEMI-VIE DES ARNm DE MUCINES DANS LES CELLULES HT 29-MTX.....</b>	<b>87</b>
---	-----------

<b>A- GENERALITES .....</b>	<b>87</b>
-----------------------------	-----------

<b>1- Rôle du turnover des ARN dans le contrôle de l'expression des gènes ..</b>	<b>87</b>
<i>a- au cours de l'embryogénèse et de la différenciation cellulaire .....</i>	<i>88</i>
<i>b- en réponse à des facteurs externes.....</i>	<i>88</i>
<i>c- autorégulation de la dégradation.....</i>	<i>89</i>
<i>d- cas particuliers des oncogènes, lymphokines et cytokines .....</i>	<i>90</i>

<b>2- Les séquences de l'ARNm qui déterminent la demi-vie .....</b>	<b>90</b>
<i>a- la région 5' non traduite .....</i>	<i>90</i>
<i>b- la région codante.....</i>	<i>91</i>
<i>c- la région 3' non traduite .....</i>	<i>91</i>
<i>d- la queue poly(A) .....</i>	<i>92</i>

<b>B- METHODOLOGIE</b> .....	<b>94</b>
<b>C -RESULTATS</b> .....	<b>95</b>
<b>D-DISCUSSION</b> .....	<b>103</b>
<b>III PREPARATION DE L'ARN NUCLEAIRE, POLYSOMAL ET CYTOPLASMIQUE</b> .....	<b>104</b>
<b>A- GENERALITES</b> .....	<b>104</b>
<b>B- METHODOLOGIE</b> .....	<b>104</b>
<b>C- RESULTATS</b> .....	<b>106</b>
<b>D- DISCUSSION</b> .....	<b>106</b>
<b>IV ADAPTATION DE LA TECHNIQUE D'ELECTROPHORESE EN CHAMPS PULSES AUX ARN</b> .....	<b>109</b>
<b>A- GENERALITES</b> .....	<b>109</b>
<b>B- METHODOLOGIE</b> .....	<b>111</b>
<b>C- RESULTATS</b> .....	<b>112</b>
<b>D- DISCUSSION</b> .....	<b>112</b>

<b>V HYPOTHESE D'UN EXTRÊME FRAGILITE DES ARN D'APOMUCINES MUC 2 à MUC 6.</b>	<b>112</b>
<b>A- METHODOLOGIE</b>	<b>114</b>
<b>B- RESULTATS</b>	<b>115</b>
1- Essai de lavages stringents	115
2- Electrophorèse avec des quantités décroissantes d'ARN	118
3- Variations des paramètres de l'électrophorèse	118
4- Le transfert	118
5- Confirmation de nos résultats	120
<b>VI SELECTION DES ARN POLY(A<sup>+</sup>)</b>	<b>124</b>
<b>VII TAILLE DES ARNm DE MUCINES</b>	<b>126</b>
1- Profil obtenu en Northern blot	126
2- Taille des ARNm de mucines	126
<i>a- problèmes rencontrés pour l'étalonnage</i>	<i>126</i>
<i>b- résultats</i>	<i>130</i>
3- Questions posées	130
<b>VII ETUDE PRELIMINAIRE DU POLYMORPHISME</b>	<b>132</b>
1- Southern blot	132
2- Polymorphisme des gènes de mucines : études préliminaires	142
<b>DISCUSSION</b>	<b>144</b>
<hr/>	
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>150</b>
<hr/>	
<b>I PREPARATION DES ARN TOTAUX</b>	<b>150</b>

1- Technique utilisée dite "classique" .....	150
2- Autres techniques testées .....	153
<i>a- la méthode urée/LiCl</i> .....	153
<i>b- la technique décrite par Chomczynski</i> .....	154

## II ANALYSE DES ARN PAR LA TECHNIQUE DE NORTHERN BLOT 154

1- Electrophorèse des ARN en milieu dénaturant-formamide.....	154
<i>a- préparation du matériel et des échantillons</i> .....	154
<i>b- électrophorèse</i> .....	155
2- Electrophorèse des ARN en milieu dénaturant-glyoxal.....	155
<i>a- préparation du matériel et des échantillons</i> .....	155
<i>b- électrophorèse en milieu phosphate</i> .....	156
3- Transfert et hybridation .....	156
<i>a- transfert</i> .....	156
<i>b- préhybridation et hybridation</i> .....	156

## V SELECTION DES ARN POLY(A<sup>+</sup>) .....

1- Affinité sur colonne oligo dT cellulose.....	157
2- Affinité sur billes magnétiques .....	158

## IV ETUDE DE LA DEMI-VIE DES ARNm DE MUCINES.....

1- Culture des cellules HT 29-MTX.....	158
2- Culture des cellules en présence d'actinomycine D.....	159

## V QUANTIFICATION DES ARN PAR LA TECHNIQUE DE DOT BLOT .....

1- Préparation des échantillons.....	160
2- Transfert et hybridation .....	160
3- Quantification .....	160

<b>VI PREPARATION DE L'ARN NUCLEAIRE, POLYSOMAL ET CYTOPLASMIQUE .....</b>	<b>161</b>
--	------------

<b>VII ELECTROPHORESE D'ARN EN CHAMPS PULSES.....</b>	<b>162</b>
---	------------

1- Matériel .....	162
-------------------	-----

2- Préparation des échantillons d'ARN .....	162
---	-----

3- Paramètres utilisés pour l'électrophorèse.....	163
---	-----

<i>a- le gel d'agarose et le tampon d'électrophorèse.....</i>	<i>163</i>
---	------------

<i>b- l'électrophorèse .....</i>	<i>163</i>
----------------------------------	------------

4- Transfert et hybridation .....	163
-----------------------------------	-----

<b>VIII ANALYSE DE L'ADN GENOMIQUE PAR LA TECHNIQUE DE SOUTHERN BLOT.....</b>	<b>164</b>
---	------------

1- Préparation de l'ADN génomique .....	165
---	-----

<i>a- lyse cellulaire .....</i>	<i>165</i>
---------------------------------	------------

<i>b- protéolyse.....</i>	<i>165</i>
---------------------------	------------

<i>c- précipitation de l'ADN.....</i>	<i>165</i>
---------------------------------------	------------

<i>d- quantification et pureté.....</i>	<i>166</i>
---	------------

2- Hydrolyse enzymatique.....	166
-------------------------------	-----

3- Electrophorèse.....	166
------------------------	-----

4- Transfert .....	166
--------------------	-----

5- Hybridation à une sonde nucléique.....	167
---	-----

<i>a- préhybridation et hybridation.....</i>	<i>167</i>
--	------------

<i>b- lavages.....</i>	<i>167</i>
------------------------	------------

<i>c- autoradiographie.....</i>	<i>167</i>
---------------------------------	------------

<b>VIII MARQUAGE DES SONDAS NUCLEIQUES.....</b>	<b>168</b>
---	------------

<b>IX PROTOCOLE ORIGINAL ADAPTE A LA PREPARATION DE GRANDS ARN .....</b>	<b>168</b>
--	------------



**LEXIQUE DES FORMULES**

170

---

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

173

---

# **INTRODUCTION**

---

# INTRODUCTION

---

## I LE MUCUS

Les épithélia des tractus respiratoire, digestif et reproducteur sont recouverts d'un gel protecteur, le mucus, qui constitue une barrière sélective entre l'épithélium et le milieu extérieur. Il constitue notre première ligne de défense contre le milieu environnant (gaz, particules toxiques, bactéries, virus, allergènes, agressions mécaniques, enzymes, pH extrêmes). Il est synthétisé et sécrété par des cellules épithéliales spécialisées dans les fonctions de stockage et sécrétion.

Le mucus possède plusieurs fonctions plus ou moins spécifiques de la muqueuse qui le produit [7]:

- Au niveau *respiratoire*, il maintient l'humidification des voies aériennes et l'hydratation des muqueuses qui sont au contact de l'air, le système mucociliaire conserve la stérilité du milieu en éliminant les particules et les micro-organismes inhalés.

- Au niveau *gastro-intestinal*, il est impliqué dans la protection de la muqueuse œsophagienne contre les reflux gastriques très acides, il protège l'estomac et le duodénum contre les enzymes digestives et le pH acide. Il lubrifie les parois du tractus digestif pour les protéger des forces mécaniques lors du passage du bol alimentaire et au cours de la digestion. Le mucus est également la première barrière défensive contre les parasites et autres agents pathogènes.

- Au niveau *génital*, chez la femme, les propriétés du mucus cervical dépendent du cycle hormonal. Au moment de l'ovulation, le mucus est abondant et peu visqueux, protégeant ainsi les spermatozoïdes et permettant leur migration. Par contre, en dehors de cette période, le mucus est épais et imperméable aux spermatozoïdes.

Il a été montré, au moins pour le mucus respiratoire et cervical, qu'il se compose de deux phases : une phase superficielle dense et visco-élastique en mouvement sur une phase fluide et peu visqueuse, au contact direct de la muqueuse.

Ses caractéristiques physiques et fonctionnelles dites rhéologiques sont la viscosité, l'élasticité, l'adhésivité et la filance.

La protection et la lubrification des surfaces épithéliales grâce à une couche superficielle de mucus est un mode de protection cellulaire très ancien au cours de l'évolution, déjà retrouvé chez les vers et les poissons.

Le mucus est composé de 95% d'eau et 5% de glycoprotéines : les *mucines*. Il contient également de faibles quantités d'électrolytes, des protéines sériques (protéases, anti-protéases, albumine, lysozyme), des Ig A sécrétoires, des lipides et des acides nucléiques.

## II MUCUS ET PATHOLOGIES

La recherche en santé s'intéresse à l'étude du mucus depuis environ trente ans. En effet, de nombreuses pathologies associées au mucus ont été décrites, elles concernent de nombreux domaines médicaux et étudie les relations mucines/microorganismes, mucines/maladies inflammatoires et mucines/carcinomes :

### 1- Maladies respiratoires

#### *a - les pathologies broncho-pulmonaires de l'enfant*

Les infections bronchiques à répétition sont fréquentes en pathologies pédiatriques [120]. Leur origine est souvent virale (virus respiratoire syncytial, adénovirus, virus de la rougeole, micro-organismes apparentés tels que le *Mycoplasma pneumoniae*), parfois allergique. Elles entraînent chez des enfants prédisposés une inflammation bronchique chronique aboutissant à des tableaux sévères d'obstruction bronchique, d'emphysème, d'atélectasie, de dilatation des bronches. Dans ces pathologies, il a été montré des altérations au niveau des cellules ciliées (une diminution du pourcentage des cellules ciliées mobiles et vivantes) et au niveau des sécrétions bronchiques (une augmentation des protéines dérivées du sérum, la présence d'une élastase leucocytaire active libre et une diminution du transport du mucus).

#### *b - la bronchite chronique*

La pathologie bronchique de l'adulte modifie les caractères biochimiques, physiques et rhéologiques des sécrétions entraînant une altération du système muco-ciliaire dont le rôle est l'élimination des particules étrangères inhalées [171]. Des bouchons muqueux peuvent obstruer bronches et bronchioles. Au cours de la bronchite, le poids sec des sécrétions augmente. Les sulfomucines et les mucines neutres augmentent aux dépens des sialomucines. Au début de la bronchite chronique, la stimulation des sécrétions protéiques (sialomucines, IgA

sécrétoires, lysozyme) produit un mucus très visqueux et très élastique. Puis, l'apparition des mucines neutres, de sérum-albumine et la diminution des IgA sécrétoires conduisent à une expectoration fluide avec diminution de la structure fibrillaire, de la viscosité et de l'élasticité du mucus. L'infection augmente l'exsudation des protéines plasmatiques et la libération d'ADN; ce qui entraînera ensuite l'augmentation de la viscosité du mucus.

#### *c - l'asthme*

Au cours de l'asthme intrinsèque, les caractères du mucus sont très voisins de ceux de la bronchite chronique, l'hypertrophie glandulaire est identique. Au cours de l'asthme extrinsèque, l'hypertrophie glandulaire est peu importante [171]. Une analyse montre la présence de complexes mucines-lipides et une augmentation de la longueur des chaînes oligosaccharidiques des mucines par rapport à l'asthme intrinsèque. L'hypersécrétion bronchique est due à la libération de médiateurs. L'expectoration des asthmatiques est dense et géliforme pouvant obstruer bronches et bronchioles.

#### *d - la mucoviscidose*

La mucoviscidose est l'une des maladies génétiques les plus fréquentes. Elle atteint, en Europe, un enfant sur 2000 naissances, 1 individu sur 20 est porteur. 50 % des enfants n'atteignent pas l'âge adulte.

Il s'agit d'une maladie autosomique récessive, dont le gène responsable (gène CF) est porté par le chromosome 7. La séméiologie est très complexe car elle concerne plusieurs organes. Cependant, elle est dominée par l'atteinte des voies respiratoires. Il s'agit d'une exocrinopathie d'origine génétique dominée par l'existence d'une bronchopathie hypersécrétante chronique et évolutive [44]. Elle s'accompagne d'une sensibilité à certaines souches bactériennes responsables d'infections respiratoires en particulier *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Dans la mucoviscidose, le gène codant pour la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) est anormal. L'anomalie la plus fréquente (70% des cas) est la délétion de trois nucléotides (mutation  $\Delta$  F508) entraînant la disparition d'un acide aminé dans la protéine. La protéine CFTR est insérée dans la membrane apicale des cellules épithéliales et est impliquée dans le transport des ions chlorure. La physiopathologie de la

mucoviscidose est encore mal connue, en dépit de la découverte des mutations du gène CF, néanmoins, l'hypothèse admise serait que lorsque la protéine CFTR est mutée, le flux des ions chlorures vers la lumière des voies respiratoires est faible et l'absorption des ions sodium par l'épithélium est excessive [192]. Or la régulation de l'hydratation du mucus est contrôlée par l'absorption d'ions sodium et la sécrétion d'ions chlorure, une anomalie dans la protéine CFTR entraîne donc une déshydratation très importante du mucus s'accompagnant d'infections et d'obstruction bronchique sévère. L'anomalie génétique à l'origine de la mucoviscidose perturbe le fonctionnement de plusieurs autres organes, car différents conduits finissent par être obstrués par un mucus épais et visqueux : au niveau du foie, du pancréas, de l'intestin grêle, de l'appareil reproducteur et de la peau (la transpiration des personnes atteintes contient un excès de sel, on diagnostique la maladie en mesurant la concentration en ions chlorure dans la sueur).

On observe chez les patients atteints de mucoviscidose des modifications qualitatives et quantitatives du mucus. Le taux d'hydratation des sécrétions bronchiques est diminué et la viscosité augmente notamment en période de surinfection [44]. Dans la mucoviscidose, de nombreuses études ont porté sur la détermination de la structure glycanique des mucines bronchiques. Il a été montré une augmentation de la composante acide des chaînes glycaniques (sialomucines et sulfomucines), mais ceci a également pu être observé dans d'autres bronchopathies chroniques de l'enfant [132]. Les chaînes glycaniques des mucines très diverses [29] constituent des sites potentiels de fixation des virus et bactéries au niveau de l'épithélium respiratoire [229]. La relative spécificité de l'infection bronchique dans la mucoviscidose (*Staphylococcus aureus* et surtout *Pseudomonas aeruginosa*) constitue le problème majeur auquel sont confrontés les malades et explique l'intérêt porté à l'étude des structures glycaniques des mucines.

L'hypothèse d'une anomalie intrinsèque du mucus sécrété dans la mucoviscidose a été avancée et une particularité de la structure des mucines bronchiques sécrétées par ces malades, responsable de la spécificité de l'infection broncho-pulmonaire a été évoquée et recherchée. En effet, l'existence de sites récepteurs de *Pseudomonas aeruginosa* sur les mucines bronchiques humaines a été démontrée [180]. Des études ultérieures sont donc nécessaires pour savoir si la déshydratation du mucus est bien le seul facteur responsable de l'altération du système muco-ciliaire et de l'infection.

## 2 - Maladies inflammatoires du tube digestif

Des anomalies du mucus ont été décrites dans les maladies inflammatoires du tube digestif : la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn, qui sont des maladies chroniques, invalidantes, évoluant par poussées entrecoupées de périodes de rémission.

### *a - la rectocolite hémorragique*

L'incidence de cette maladie est de 6 pour 100000. Les lésions atteignent le rectum et le côlon gauche. 30% des patients atteints subissent une colectomie totale. Les lésions atteignent la muqueuse et la sous-muqueuse avec diminution de la mucosécrétion par les cellules caliciformes [74]. L'épaisseur du mucus est quasiment nulle en zone ulcérée. Des études ont montré certaines modifications des mucines dans la rectocolite hémorragique : une augmentation des sialomucines (souvent associées à une muqueuse dysplasique) et une diminution de la sulfatation et de la O-acétylation des sialomucines [53]. D'autre part, l'analyse par chromatographie d'échange d'ions a révélé l'effondrement de l'une des six fractions d'élution (appelée fraction IV) [170]. Ce résultat est néanmoins controversé [181]. L'étude des chaînes glycaniques a montré une diminution de longueur des glycanes à la fois dans la rectocolite hémorragique et dans la maladie de Crohn [37, 50]. Ces modifications biochimiques des mucines pourraient rendre la muqueuse plus vulnérable à la dégradation par les enzymes fécales [53], elles pourraient également modifier le spectre de la colonisation bactérienne [53].

### *b - la maladie de Crohn*

L'incidence de la maladie de Crohn varie de 1 à 6 pour 100000. C'est une maladie de l'adulte jeune. Elle peut atteindre n'importe quel segment du tube digestif avec une prédilection pour l'iléon terminal, le côlon et l'anus. La maladie de Crohn dure toute la vie. En l'absence d'étiologie reconnue, le traitement a pour but de traiter les poussées et d'éviter ou espacer les récives. La mucosécrétion est préservée voire augmentée [179]. De même, l'histochimie des mucines montre un profil normal, cependant une augmentation des sialomucines serait en rapport avec le degré de gravité de la maladie [56].



### *c - gastrite et ulcère*

La gastrite est due à l'inflammation et à l'ulcération de la muqueuse antrale. Il s'agit d'une maladie chronique, douloureuse qui touche environ 10% de la population des pays industrialisés, elle est provoquée par la destruction localisée de cellules de la muqueuse corrélée à une sécrétion accrue d'HCl. Des études ont montré que la bactérie *Helicobacter pylori* joue un rôle majeur dans le développement des gastrites (dans 90% des cas), des ulcères mais aussi des adénocarcinomes de l'estomac [22]. Une lignée cellulaire humaine (HMO2), cultivée en présence d'un extrait de milieu de culture d'*Helicobacter pylori* voit se réduire fortement la synthèse et la sécrétion de mucines, de plus, apparaissent des modifications dans la nature de leurs résidus glycaniques : les résidus de N-acétylgalactosamine et fucose sont relativement augmentés alors que les résidus de glucosamine ne sont pas modifiés. Ces modifications à la fois quantitatives et qualitatives induites par *Helicobacter pylori* pourraient se révéler importantes dans la pathogénèse des gastrites et ulcères peptiques [81].

### **3- Cancers épithéliaux**

Dans les pays industrialisés, le cancer constitue la deuxième cause de mortalité, après les maladies cardio-vasculaires.

Entre 1973 et 1992, le taux de mortalité par cancer a augmenté de 6,3%.

L'OMS estime que le cancer tue dans le monde six millions de personnes chaque année. Cependant, durant cette période, la mortalité due à certains types de cancers a chuté nettement grâce aux progrès dans la détection précoce, dans les traitements et dans la prévention. Cependant, il est à noter que les cancers les plus malins restent les cancers affectant les organes mucipares : trachée, poumon, bronches, œsophage, côlon, rectum, prostate, sein, et ovaires (figure 1).

Une étude réalisée par l'INSERM, en France, cible les douze cancers majeurs, dont neuf affectent les organes mucisécrétants. Ces données chiffrées justifient à elles seules les innombrables travaux relatant depuis trente ans l'étude des molécules caractéristiques des épithélia sécrétoires, dans le but de définir des marqueurs tumoraux utiles au diagnostic

(recherche dans le sérum de molécules ou d'épitopes typiques des cellules tumorales circulantes) et au pronostic (survie à cinq ans, indications thérapeutiques de chimiothérapie-radiothérapie-chirurgie).

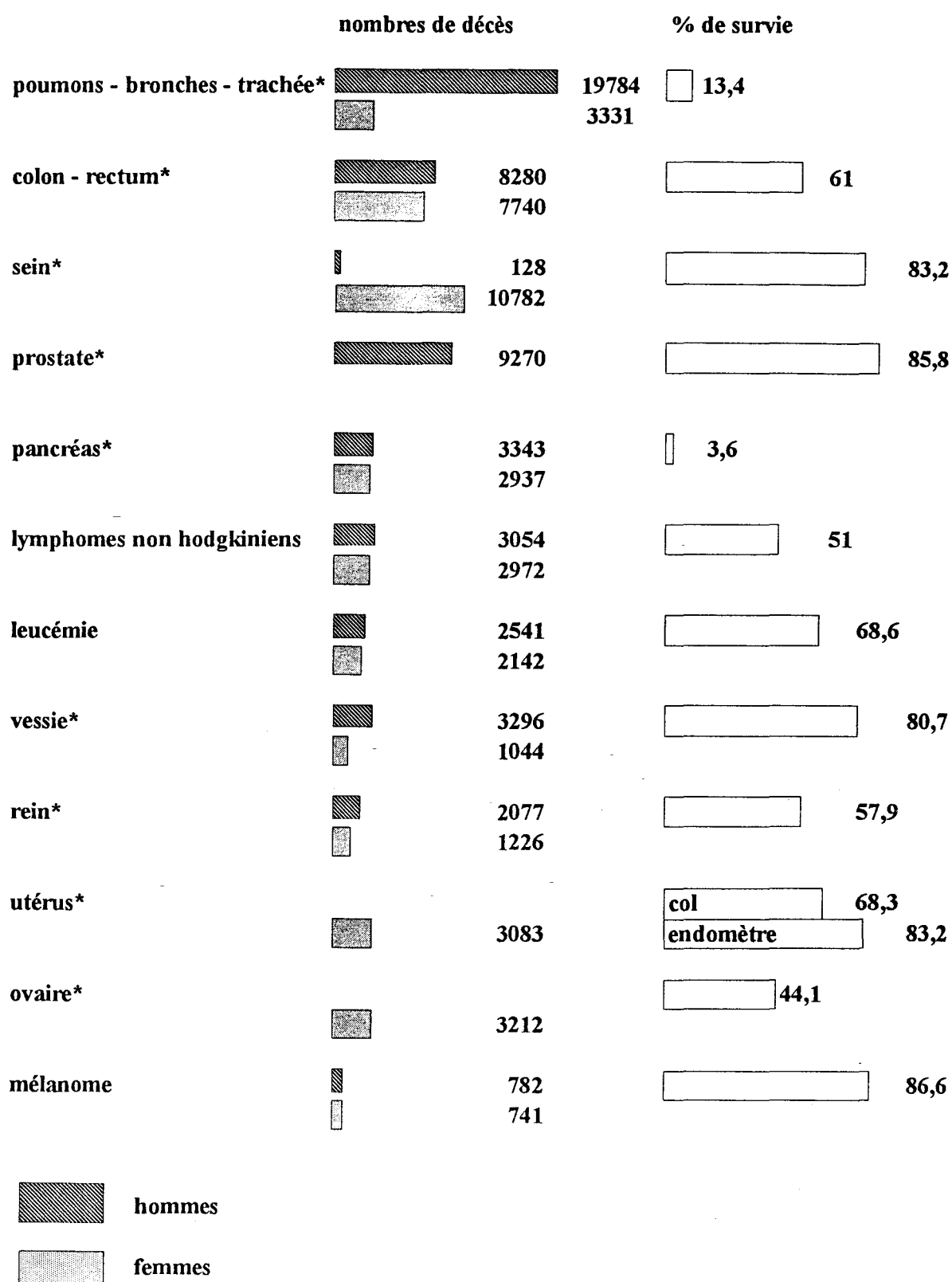
Les mucines et en particulier leurs chaînes glycaniques, ont fait l'objet d'une recherche d'épitopes nouveaux en relation avec les perturbations des mécanismes de glycosylation observés dans les cellules tumorales, par exemple : Ag T et Tn, démasqués dans les cellules tumorales mammaires, Ag sialyl Tn dans les carcinomes de l'estomac et des ovaires [58, 212]. Des marqueurs sériques tumoraux communément utilisés en clinique sont issus de ces études (CA 15-3, CA 19-9).

Depuis 1989, le clonage des apomucines humaines ouvre un nouveau champ d'investigation : celui de la caractérisation des dérégulations d'expression des gènes d'apomucines. En effet, les travaux relatifs à la glycosylation se sont révélés trop complexes pour être rapportés à une spécificité d'organes et trop sujets à une variation inter-individuelle (structure glycanique et groupes sécréteurs/groupes sanguins), pour constituer des marqueurs spécifiques.

*L'étude des altérations des mucines synthétisées spécifiquement par les cellules épithéliales au cours des cancers épithéliaux pourrait permettre de déterminer des marqueurs biologiques de diagnostic, pronostic, suivi thérapeutique, surveillance de récurrence ainsi que définir une population à risque à surveiller particulièrement.*

#### 4 - Gynécologie

Dans l'appareil génital féminin, la sécrétion de mucus est essentiellement localisée dans le col utérin (endocol), mais aussi en quantité moins importante dans l'endomètre. Le rôle important joué par le mucus dans la mobilité et viabilité des spermatozoïdes a été étudié in vitro. En dehors du rôle important joué par les mucines en pathologie tumorale de l'endocol et de l'endomètre, il est probable que des altérations de ce mucus puisse contribuer à certaines formes de stérilité (endométriose) [69].



**FIGURE 1 :** Mortalité due au cancer en France, en 1994.  
 (statistiques INSERM sur les causes de décès en France).  
 \* 9 tissus sur 12 sont mucipares.

### III LES MUCINES

Les principales macromolécules responsables de l'architecture tridimensionnelle du mucus sont représentées par les **mucines**. Elles conditionnent les propriétés physiques et rhéologiques du mucus (viscosité, élasticité et filance). Leur rôle dans les propriétés biologiques du mucus a été mis en évidence [187, 208].

#### A- FONCTIONS BIOLOGIQUES DES MUCINES

##### 1- Les mucines sécrétées

Ce sont les mucines qui confèrent au mucus ses propriétés physicochimiques caractéristiques, les fonctions du mucus et des mucines sont donc étroitement liées.

On attribue aux mucines un certain nombre de fonctions biologiques [66]:

- très hydrophiles en raison de leur haute densité en chaînes glycaniques, elles contribuent à maintenir une *hydratation optimale* du mucus respiratoire et le protègent contre l'évaporation au contact de l'air;

- les glycannes sont considérés comme formant une mosaïque de récepteurs permettant par des mécanismes d'adhésion de *piéger les microorganismes* qui seront éliminer vers le pharynx grâce à l'activité mucociliaire. Ces molécules représentent donc un élément important de la défense de la muqueuse et du maintien de la stérilité de l'arbre trachéobronchique. Les mucines protègent également l'intestin contre la colonisation par des parasites et autres agents pathogènes grâce à certains résidus glycaniques qui favorisent le maintien de la flore naturelle (galactose et N-acétylgalactosamine);

- elles permettent la *lubrification* des muqueuses, elles assurent ainsi une protection mécanique lors de la progression du bol alimentaire et au cours de la digestion;

- elles facilitent l'absorption des nutriments par les entérocytes au niveau intestinal et constituent donc une barrière sélective d'échange [208];

- elles protègent la muqueuse d'une dégradation protéolytique en particulier au niveau gastro-intestinal riche en activités enzymatiques et sucs gastriques au pH acide, les mucines y exercent un *pouvoir tampon* [7].

## 2- Les mucines membranaires

Ces glycoprotéines, contrairement aux mucines dites sécrétées, se trouvent ancrées dans la membrane apicale de nombreuses cellules épithéliales.

C'est le clonage moléculaire des apomucines qui a permis leur découverte en 1988 [82], les mucines étant considérées jusque là uniquement comme des molécules sécrétées. Cependant, elles présentent un certain nombre de caractéristiques biochimiques et fonctionnelles communes avec les mucines sécrétées d'où leur nom de « mucin-like » :

### *a- caractéristiques biochimiques*

- leur masse moléculaire est très élevée : 250 à 500 kDa ;
- l'axe peptidique est riche en sérines et thréonines ;
- les chaînes O-glycanniques sont très nombreuses : 50% du poids moléculaire.

### *b- caractéristiques fonctionnelles*

Elles assurent la fonction de protection cellulaire, en formant un film chargé négativement. Elles peuvent établir une barrière sélective entre la membrane plasmique et le milieu extracellulaire (hydrolases, pH acides) [105, 208]. De plus, elles semblent jouer un rôle de communication intercellulaire : elles pourraient intervenir dans l'organogénèse, la

reconnaissance et l'adhésion cellulaire [28]. Elles inhiberaient l'action cytotoxique des polynucléaires éosinophiles [103].

La " mucin-like " la plus étudiée chez l'homme est l'épisialine ou MUC 1, encore appelée PUM (peanut lectin binding urinary mucin), PEM (polymorphic epithelial mucin), MAM-6 (mammary antigenic mucin-6), PAS-O, EMA (epithelial membrane antigen), NPG (non-penetrating glycoprotein), antigène HMFG, DUPAN-2, Cal, antigène NCRC11, épitectine, SGA (antigène des glandes sébacées), antigène H23 ou antigène DF3. Elle est très exprimée dans la majorité des cellules épithéliales et surexprimée dans le cancer du sein et autres carcinomes.

D'autres O-glycoprotéines membranaires de type mucine sont exprimées à la surface d'autres types cellulaires. Il s'agit de la glycophorine A et de la sialophorine appelée aussi leucosialine ou CD43. Ces deux sialoglycoprotéines sont très abondantes à la surface des érythrocytes et des leucocytes respectivement. La sialophorine empêche l'adhésion des leucocytes entre eux, ainsi que l'adhésion aux cellules endothéliales dans le torrent circulatoire. Elle module les interactions entre les lymphocytes B et T [161], de même, l'activation des monocytes ou des lymphocytes T [79]. Ce rôle biologique est en rapport avec des variations subtiles de la structure glycanique au cours des phénomènes d'activation et de différenciation des lymphocytes T [10, 123, 169].

D'autres O-glycoprotéines membranaires de type mucine ont été caractérisées. Elles fonctionnent comme des ligands des sélectines : PSGL-1, MadCAM, CD34 [225].

### **3- Rôle des mucines dans les cellules tumorales**

Dans les cellules épithéliales cancéreuses, on observe une augmentation de l'expression de la protéine MUC 1 qui recouvre alors toute la surface cellulaire. Cette surexpression entraîne une inhibition des interactions cellule-cellule et/ou cellule-matrice et favorise ainsi le processus de métastase [105]. De plus, les cellules tumorales expriment de nouveaux antigènes, absents dans les tissus sains. Les antigènes T et Tn qui sont impliqués dans l'adhésion des cellules tumorales aux cellules normales [207]. D'autres antigènes sont présents dans les cellules

tumorales, sialyl-Le<sup>a</sup> et sialyl-Le<sup>x</sup> qui sont des ligands pour des sélectines (P- et E- sélectines), molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules endothéliales [19, 100]. Cette interaction cellule tumorale/paroi vasculaire facilite le processus de dissémination au cours des métastases [86].

Les mucines exprimées dans les cellules tumorales confèrent donc à ces cellules des propriétés différentes de celles des cellules normales : se déplacer, modifier leurs interactions habituelles. On ne sait pas encore si les mucines tumorales sont différentes des mucines normales ou si seuls les déséquilibres quantitatifs sont responsables de ces nouvelles propriétés.

## **B- PROPRIETES BIOCHIMIQUES DES MUCINES**

### **1- Purification des mucines**

La purification des mucines natives a été un problème majeur pour l'étude de leur structure biochimique, elles interagissent fortement entre elles ainsi qu'avec les peptides et lipides environnants. La première étape est la solubilisation du mucus par différentes techniques : action de protéases, d'agents dissociants, destruction des ponts disulfures [187].

Les techniques les plus utilisées de fractionnement et de purification sont la gel-filtration, la centrifugation sur gradient de densité et la chromatographie d'échange ionique, basées respectivement sur la taille, la densité et la charge des molécules [145].

Deux stratégies sont utilisées [208] :

- les mucines peuvent être isolées sous des conditions non réductrices pour préserver les ponts disulfures entre les polypeptides qui sont présents dans le gel natif.
- les ponts disulfures peuvent être rompus, on isole ainsi des monomères.

La méthode la plus utilisée car donnant les meilleurs résultats (rendement et pureté) est la centrifugation sur gradient de densité en chlorure de césium

Quelle que soit la technique utilisée, il faut donc s'assurer de l'absence de contaminations par des acides nucléiques, par des protéines ou des lipides liés de manière non covalente aux mucines, ou par des protéoglycannes de la matrice extracellulaire. De plus, des inhibiteurs de protéases sont ajoutés pour prévenir la dégradation des parties non glycosylées (N- et C- terminales) très sensibles à la protéolyse.

A cause de ces interactions, de la difficulté d'isoler des mucines intactes et des différentes techniques utilisées, l'estimation de leur masse moléculaire est très variable en fonction des auteurs (de quelques centaines de milles à plusieurs millions de daltons) (**tableau 1**).

## 2- Structure des mucines

Les mucines forment une famille de O-glycoprotéines complexes et hétérogènes. Leur masse moléculaire est très importante.

Elles se composent d'un *squelette polypeptidique* (apomucine) sur lequel se greffent des *chaînes oligosaccharidiques*.

L'étude de la structure des mucines est basée sur l'utilisation de deux méthodes : la réduction de ponts disulfures et la protéolyse [130].

Elles ont respectivement permis de montrer que :

- les mucines sont constituées de *sous-unités reliées entre elles par des ponts disulfures*. La réduction des ponts disulfures entre les résidus de cystéine entraîne la disparition de la viscosité du gel de mucus [8].

Une exception est connue : les mucines sous-maxillaires bovines ne formeraient pas de ponts disulfures.

- elles sont composées de domaines *hautement glycosylés* (résistants à la protéolyse) et de *domaines "nus"* ou non glycosylés (sensibles à la protéolyse).



Auteur	Mucine	Préparation	M.M. (daltons)
Creeth et coll. 1977 [54]	mucine respiratoire humaine	- solubilisation en CsCl - ultracentrifugation en CsCl	3,3 à 7.10 <sup>6</sup>
Marshall et coll. 1978 [147]	mucine colique de porc	- gel filtration - ultracentrifugation à l'équilibre en CsCl - exclusion en gel filtration Sepharose 2B	1.10 <sup>6</sup>
Sheehan et coll. 1987 [198]	mucine cervicale humaine	- ultracentrifugation en de densité en GuCl	6 à 24.10 <sup>6</sup>
Thornton et coll. 1990 [213]	mucine trachéale humaine	- ultracentrifugation en gradient de densité en CsCl/GuCl - chromatographie Sepharose CL 2B	14 à 16.10 <sup>6</sup>
Virmani et coll. 1991 [228]	mucine trachéale canine	- chromatographie Sepharose CL 4B - ultracentrifugation en gradient de densité CsCl	11.10 <sup>6</sup>
Sheehan et coll. 1991 [199]	mucine respiratoire humaine	- extraction par centrifugation en GuCl 6M en présence d'inhibiteurs de protéases	3,2.10 <sup>6</sup>

TABLEAU 1 : *Quelques exemples de masses moléculaires de mucines*

Deux modèles ont été proposés pour établir l'agencement spatial des sous-unités:

a - le premier fut proposé par *Allen et Snary*, basé sur l'étude structurale des mucines gastriques de porc [6]. Il s'agit d'une représentation tétramérique en forme "d'ailes de moulin à vents": chacune des 4 sous-unités comporte une région glycosylée et une région non glycosylée riche en cystéine formant des ponts disulfures reliant les quatre sous-unités à une protéine de liaison (**figure 2**).

D'autres protéines de liaison ont été proposées pour les mucines intestinales de porc (90kDa) [143], de rat et pour les mucines humaines (118kDa) [73, 144]. Cependant, l'existence de ce peptide de liaison fait l'objet de controverses car il a été montré une homologie entre la protéine de 118 kDa et la fibronectine [204]. Toutefois, cette protéine de 118 kDa pourrait correspondre à l'extrémité C-terminale d'une mucine de rat [238] et de la mucine humaine MUC 2 [95].

b - le second, défendu par *Carlstedt et Sheehan* [41] suggère une forme filamenteuse et linéaire où les monomères seraient reliés bout à bout par des ponts disulfures pour former un long filament. Chaque monomère comprendrait des zones glycosylées et non glycosylées (**figure 3**).

Ce modèle est en accord avec l'étude structurale des mucines effectuées en microscopie électronique. En effet, l'analyse en microscopie électronique montre les mucines sous forme de longs filaments de taille variable (de 200 à 4000 nm) [187, 200].

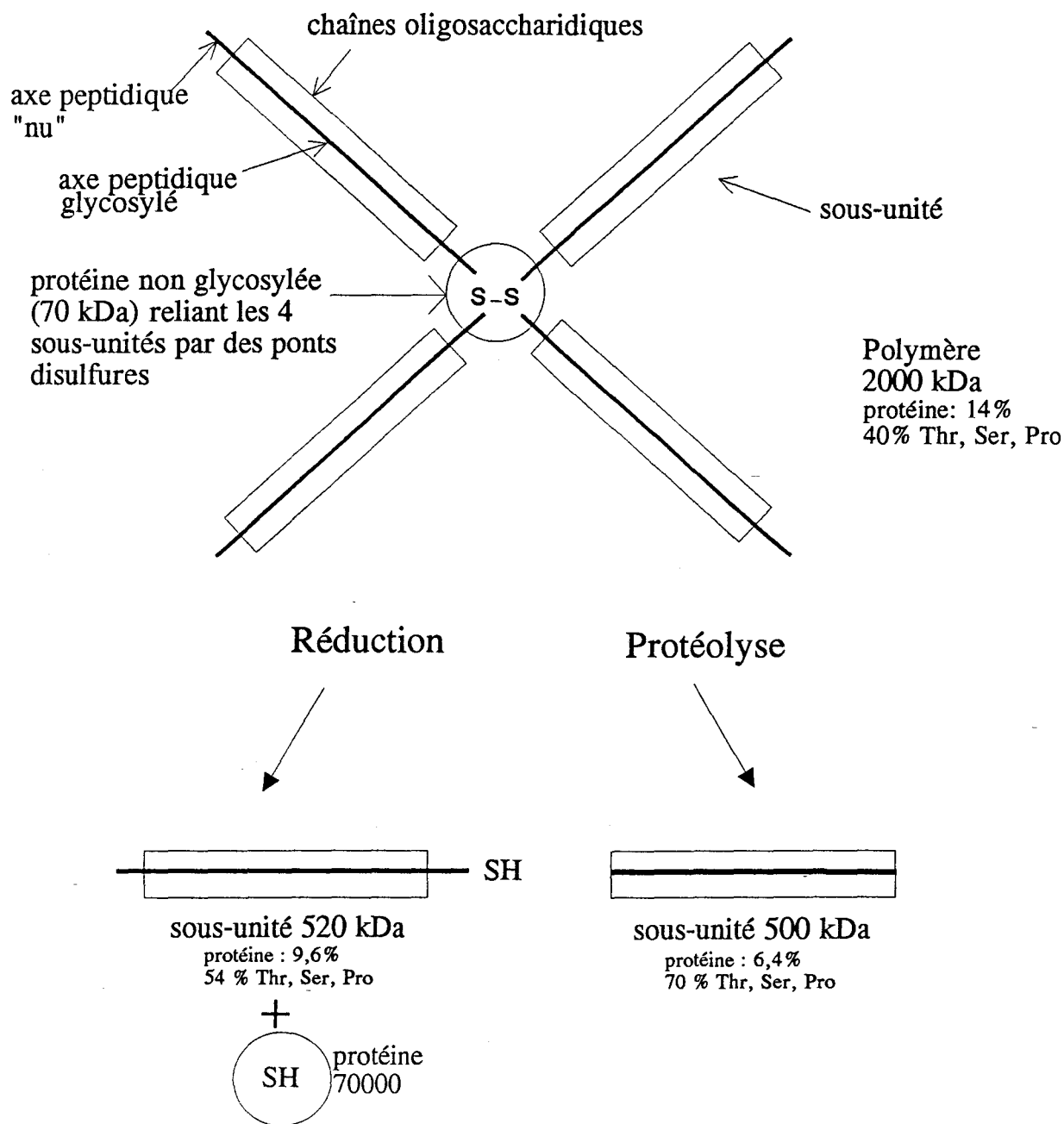
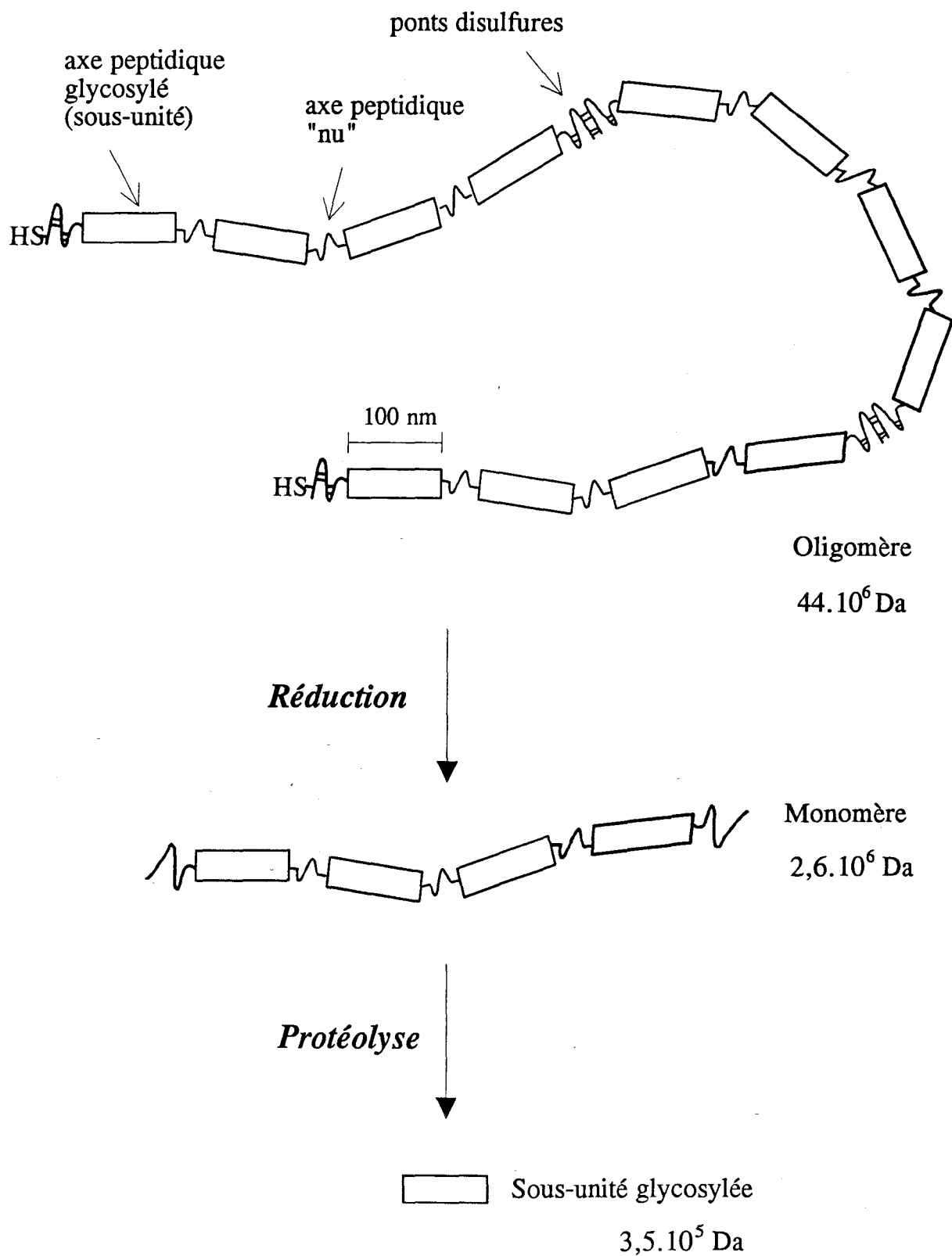


FIGURE 2 : Représentation schématique de la structure tétramérique en "moulin à vent" d'après Allen (mucine gastrique de porc) [6].



**FIGURE 3** : Représentation schématique de la structure linéaire d'après Carlstedt  
 (mucine cervicale humaine) [41].

### 3- Les glycannes

#### *a- les mucines neutres, acides et très acides*

Par chromatographie d'échange ionique, on peut fractionner les mucines en trois fractions principales en fonction de leur structures glycaniques [130] :

- les mucines neutres (pauvres en résidus acides).
- les mucines acides ou sialomucines (riches en résidus d'acide sialique).
- les mucines très acides ou sulfomucines (riches en résidus sulfate).

Les chaînes glycaniques protègent le squelette protéique d'une dégradation protéolytique et jouent un rôle important dans les caractéristiques biochimiques et fonctionnelles des mucines : grâce à cette diversité glycanique, il y a interaction entre les mucines et les microorganismes au niveau respiratoire, ce qui est primordial pour leur élimination et la défense de la muqueuse. Au niveau gastrointestinal, l'interaction mucines/souche symbiotique protège la muqueuse des infections par des agents pathogènes.

#### *b- les chaînes glycaniques*

L'étude de la structure des chaînes glycaniques est délicate car elle nécessite beaucoup de matériel. Dans le cas du mucus respiratoire, le matériel sain est inaccessible car le mucus entraîné par le système mucociliaire remonte jusqu'au pharynx où il est dégluti. Les analyses ont, de ce fait, été réalisées à partir de pools de mucines recueillies chez des sujets souffrant d'hypersécrétions bronchiques chroniques (mucoviscidose ou bronchite chronique).

Actuellement, les principales techniques utilisées pour cette étude sont :

- la chromatographie liquide de haute performance (HPLC) qui permet une purification rapide des oligosaccharides;
- la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS);
- la résonance magnétique nucléaire du proton à haut champ (H-NMR);
- la spectrométrie de masse (FAB-MS) pour la détermination des structures.

La modification post-traductionnelle majeure et typique des mucines est la O-glycosylation.

Les chaînes oligosaccharidiques sont très diverses et représentent environ de 50 à 80% de la masse moléculaire. Les O-glycannes constituent un groupe important de glycannes qui a été découvert initialement dans les mucines d'où leur autre appellation de "glycannes de type mucine". Dans cette famille, la liaison de la chaîne oligosaccharidique au peptide s'effectue par l'intermédiaire de l'hydroxyle de la thréonine ou de la sérine et la N-acétylgalactosamine. Cette liaison est labile à pH alcalin la distinguant ainsi de la liaison N-glycannique (entre un résidu de N-acétylglucosamine et un résidu d'asparagine) présente dans de nombreuses glycoprotéines sériques ou membranaires.

Elles contiennent *cinq sucres différents*:

- la N-acétylgalactosamine (GalNAc);
- la N-acétylglucosamine (GlcNAc);
- le galactose (Gal);
- le fucose (Fuc);
- l'acide N-acétylneuraminique (NeuNAc) ou acide sialique.

Des motifs peptidiques consensus pour la O-glycosylation n'ont pu être clairement mis en évidence comme ils ont pu l'être pour la N-glycosylation ou pour la O-glycosylation des protéoglycannes ou du collagène [27, 88, 148, 178, 232].

L'assemblage de ces cinq sucres conduit à une très grande hétérogénéité des chaînes différentes dans leur *composition* (plus d'une centaine), leur *longueur* (un à vingt sucres), leur *acidité* (neutres, acides ou très acides) [187] (exception : mucines sous-maxillaires bovines et porcines où un ou plusieurs de ces sucres sont absents).

Les mucines peuvent contenir également des groupements sulfates ainsi que de faibles quantités de mannose (Man) qui supposent l'existence de quelques chaînes N-glycanniques.

Les chaînes glycanniques des mucines comprennent trois parties (**figure 4**) :

- le *coeur* ou noyau constitué de N-acétylgalactosamine (GalNAc) lié à l'axe peptidique et le ou les deux sucre(s) fixé(s) sur cette GalNAc, sept coeurs différents ont été identifiés;
- le *squelette* formé par l'addition linéaire ou branchée de deux types principaux d'unités disaccharidiques de type 1 : Gal $\beta$ (1-3)-GlcNAc ou de type 2 : Gal $\beta$ (1-4)-GlcNAc;
- la *périphérie* représentée par les sucres qui viennent se greffer sur le squelette. Ce domaine est porteur des activités antigéniques reliées aux groupes sanguins (A, B, H, Lewis).

La classification des chaînes glycanniques de type mucine est basée sur l'individualisation de groupes sur les constructions séquentielles observées au cours des étapes de biosynthèse et appelés cores I, II, III, IV, V, VI et VIII, qui peuvent encore être allongés par l'addition d'autres sucres comme l'acide sialique [187, 190]. Cette classification en outre semble correspondre à l'existence de divers répertoires cellulaires d'expression des glycosyltransférases responsables de la biosynthèse des glycanes. En effet, les cores II et VIII sont représentés dans un nombre limité de cellules et de tissus [40].

#### *c- diversité des glycosyltransférases*

Les oligosaccharides diffèrent des autres polymères biologiques que sont les protéines et les acides nucléiques dans la mesure où ils sont assemblés selon des structures branchées faisant intervenir de nombreux types de liaisons chimiques. Etant donné la grande diversité des enzymes réalisant ces liaisons vis à vis du substrat donneur et de la structure acceptrice, et la complexité des structures glycanniques identifiées, le nombre de glycosyltransférases nécessaires est évalué à environ 100 à 200 [190].

Une revue générale publiée en 1994 [190], recense le clonage d'une quarantaine de glycosyltransférases de mammifères correspondant à une vingtaine de spécificités enzymatiques classées en quatre familles : galactosyltransférases, sialyltransférases, fucosyltransférases et N-acétylglycosaminyltransférases. Depuis 1993, une cinquième famille s'individualise, celle des N-acétylgalactosaminyltransférases (GalNAc T1 à T4).

Ces dernières enzymes sont responsables de l'étape-clé de la O-glycosylation que constitue la première fixation de sucre à l'apomucine.

Quatre enzymes ont été caractérisées et il apparaît clairement qu'une même apomucine puisse, sur un même site O-glycosylable donné, recevoir selon les tissus, selon les types cellulaires d'un même tissu, selon l'état physiopathologique de la cellule, des structures glycaniques variables en terme d'initiation de la chaîne glycanique. Ceci également, en fonction de la régulation de l'expression et du fonctionnement d'un registre complexe de glycosyltransférases, les spécificités donneur-accepteur des enzymes peuvent être modulables selon l'état de stimulation cellulaire.

Les gènes de glycosyltransférases commencent à être caractérisés. Il s'agit de familles de gènes en "cluster" sur une région chromosomique donnée (exemple : 9p13-21 pour les galactosyltransférases, chromosome 19 pour les fucosyltransférases) ou au contraire de gènes isolés "éparpillés" sur différents chromosomes (exemple des gènes GalNAc T1 à T4 localisés sur les chromosomes 18q12-21, 1q4.1-4.2, 2q24-31, 12q21.3q22).

L'expression de ces gènes et le contrôle de leur transcription apparaissent complexes, sous la dépendance de promoteurs multiples tissu-spécifiques, produisant grâce à des mécanismes d'épissage alternatif, de signaux de début et fin de transcription différents, un nombre important d'isoformes.





#### 4- Les axes peptidiques

##### *a - Approche par la biochimie classique*

Les techniques classiques de biochimie utilisées jusqu'en 1989 pour déterminer les séquences protéiques : coupures spécifiques par des protéases et détermination de la séquence des peptides ainsi obtenus par la dégradation d'Edman, n'ont apporté que peu d'éléments sur la composition peptidique des mucines et n'ont permis d'obtenir que de très courtes séquences en acides aminés (inférieures à 30 acides aminés) [59, 70, 106, 185].

Divers problèmes directement liés à la structure des mucines ont été rencontrés :

- l'étape de déglycosylation préalable à cette étude était délicate : une déglycosylation enzymatique était incomplète alors qu'une déglycosylation chimique plus efficace entraînait une dégradation de la partie protéique (coupure des résidus méthionine, hydrolyse acide) ;
- les très nombreuses chaînes glycaniques masquent l'axe peptidique et limite l'accès des protéases ;
- la richesse en acides aminés hydroxylés (sérine et thréonine) présents en quantité importante donne naissance, lors de la dégradation d'Edman, à des composés instables (dérivés phénylthiohydantoïnes) qui rendent l'interprétation impossible au delà de vingt cycles.

Des études ont également porté sur l'estimation de la taille de la partie protéique. Cette analyse a été réalisée en immunoprécipitant les précurseurs peptidiques non glycosylés. Les résultats ainsi obtenus à partir de mucines bronchiques humaines ont montré une grande hétérogénéité de taille de ces précurseurs : 200 à 400 kDa pour les mucines bronchiques, confirmant la polydispersion de longueur des filaments de mucines observée en microscopie électronique [146].

### *b - Approche par la biologie moléculaire*

Face à ces difficultés technologiques rencontrées dans l'étude de l'axe peptidique, plusieurs laboratoires ont développé des techniques de biologie moléculaire appliquées aux mucines.

Toutes les stratégies employées comportaient les grandes étapes suivantes :

- purification de mucines à partir d'un tissu sain, tumoral ou d'une lignée cellulaire ;
- déglycosylation chimique (par l'acide fluorhydrique ou l'acide trifluorométhane sulfonique) de ces mucines ;
- préparation d'un anticorps polyclonal dirigé contre l'axe peptidique déglycosylé ;
- vérification de la qualité de l'anticorps par immunohistochimie ou par immunotransfert ;
- construction d'une banque d'ADNc en vecteur d'expression ( $\lambda$ gt11) à partir des ARNm isolés de la muqueuse ou des cellules étudiées ;
- criblage à l'aide de l'anticorps puis extraction et purification des clones positifs
- détermination de la séquence nucléotidique puis déduction de la séquence peptidique ;
- localisation chromosomique ;
- étude du profil d'expression (Northern blot et Hybridation *in situ*, sur tissus sains et pathologiques) ;
- clonage et étude des gènes.

Cette stratégie a permis l'obtention de séquences d'ADNc de mucines humaines et animales, et de mucin-like. A ce jour, huit ADNc différents de mucines humaines sont connus; pour six d'entre-eux, il ne s'agit encore que de séquences partielles. Ils correspondent à huit gènes distincts et ont reçu le symbole MUC dans la nomenclature internationale : MUC 1, MUC 2, MUC 3, MUC 4, MUC 5AC, MUC 5B, MUC 6 et MUC 7.

## ***LES MUCINES MEMBRANAIRES***

### **MUC 1**

Des anticorps dirigés contre l'axe peptidique de la protéine MUC 1 (SM-3, HMG-1, HMG-2, DF-3, H23) ont été utilisés pour cribler une banque d'expression en vecteur  $\lambda$ gt11 réalisée à partir de cellules de cancer du sein (lignées cellulaires T74D et BT20) [83]. Une séquence très homologe a été trouvée à partir d'une banque de cancer du pancréas (cellule HPAF)[135].

L'ADNc a été entièrement séquencé [234], la protéine est constituée de plusieurs domaines. Le domaine N-terminal est composé du peptide signal et de séquences répétées dégénérées. Un grand domaine central agencé en séquences répétées (40 à 90 fois) de 60 nucléotides (20 acides aminés). Un domaine C-terminal est lui aussi composé de séquences répétées dégénérées, d'une séquence " mucin-like " unique, une région transmembranaire de 31 acides aminés puis un domaine intracellulaire de 69 acides aminés (qui pourrait interagir avec le cytosquelette). Le domaine répétitif central est riche en sérine (10%), thréonine (15%) et proline (25%) et est donc riche en sites O-glycosylables. Il contient également cinq sites potentiels de N-glycosylation.

## ***LES MUCINES GASTRO-INTESTINALES***

### **MUC 2**

L'ADNc a été isolé en 1989, par immunocriblage d'une banque d'expression réalisée à partir de la lignée tumorale colique LS174T [91, 95, 96, 215]. Trois clones (SMUC 40, SMUC 41 et SMUC 42) ont été isolés, purifiés et séquencés. Des études ultérieures utilisant la combinaison de diverses techniques (PCR, RACE-PCR, anchored PCR) ont permis l'obtention

d'un ADNc complet de MUC 2 [96]. Sa taille est de 15563 nucléotides, ce qui correspond à un axe peptidique d'environ 5100 acides aminés.

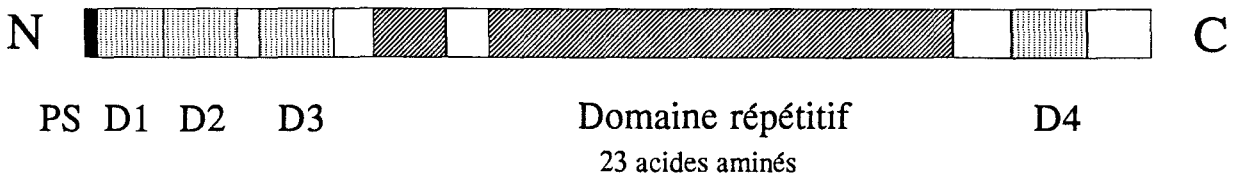
D'un point de vue structural, MUC 2 est constitué de trois régions : une région N-terminale unique, une région centrale et une région C-terminale unique (**figure 5A**).

La région centrale est composée de deux domaines répétitifs de tailles inégales. Le plus grand est constitué d'une séquence de 23 acides aminés (69 nucléotides) répétée le plus souvent une centaine de fois (le nombre de répétitions varie en fonction des individus, il est compris entre 50 et 100); ces répétitions sont homologues à 90%. Si 78% des thréonines étaient glycosylées [35], ce domaine contiendrait 1000 sites potentiels de O-glycosylation (**figure 5B**). Le second domaine, plus petit, situé en 5' du premier, comporte 347 acides aminés (1041 nucléotides), riches en sérine, thréonine et proline organisés en séquences répétées de 16 acides aminés (48 nucléotides) en moyenne. De part et d'autre de ce petit domaine se trouvent deux séquences riches en cystéine retrouvées dans le clone HGM1 et deux fois dans le clone JER 47 (ces 2 clones d'ADNc partiels font partie du gène MUC 5AC).

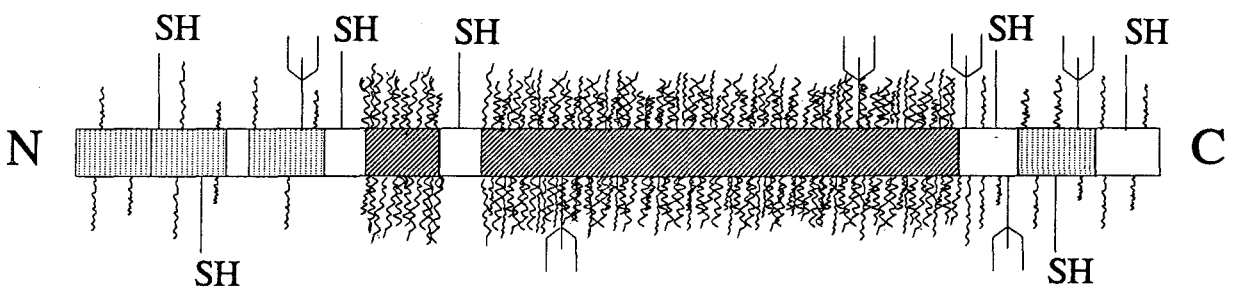
La région N-terminale comporte trois domaines D homologues aux domaines D1, D2 et D3 du prépro-facteur de von Willebrand (**figure 5A**).

La région C-terminale quant à elle, possède un domaine fortement homologue au domaine D4 du prépro-facteur de von Willebrand et possède 18 sites potentiels de N-glycosylation [95].

Ces domaines D montrent également de fortes homologies avec des mucines animales : mucines sous-maxillaires de bœuf et de porc, mucine tégumentaire de grenouille (FIM-B.1) ainsi qu'avec la protéine *Muc 2* du rat. Les domaines D du facteur de von Willebrand jouent un rôle dans son oligomérisation, son emballage dans des grains de sécrétion. Ce facteur dimérise dans le réticulum endoplasmique, forme des trimères ou multimères dans l'appareil de Golgi [96]. Or, des études réalisées sur les mucines gastriques de rat ont mis en évidence la formation de dimères et multimères dans le réticulum endoplasmique juste après la synthèse du peptide [62, 200]. La protéine MUC 2 serait capable de se dimériser grâce à la séquence Cys-X-X-Cys qui semble être impliquée dans la formation de ponts disulfures [96]. Les homologies de séquences entre la protéine MUC 2 et la protéine de von Willebrand suggèrent une voie de biosynthèse semblable.

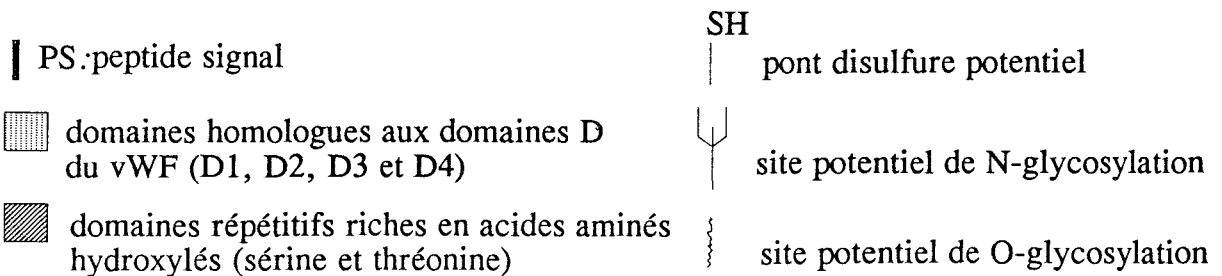


**FIGURE 5A :** Représentation schématique de l'agencement en domaines de l'axe peptidique codé par le gène MUC 2 [96].



**FIGURE 5B :** Représentation schématique de la structure de la mucine MUC 2 déduite de la figure 5A [97].

1000 acides aminés



## MUC 3

MUC 3 a été découvert en 1990, par criblage d'une banque d'expression de muqueuse jéjunale avec un anticorps polyclonal dirigé contre des mucines intestinales déglycosylées. Deux clones (SIB 124 et SIB 139) ont été isolés et séquencés [92].

A nouveau, on observe une organisation de domaines répétés en tandems : il s'agit d'une séquence de 51 nucléotides (17 acides aminés) riche en sérine et thréonine (71%), ainsi qu'en proline (6%). De plus, une région contenant des séquences « EGF-like » a été mise en évidence [32]. Contrairement à celui de MUC 2, l'ADNc de MUC 3 n'est pas connu entièrement.

## MUC 6

En 1993, le criblage d'une banque gastrique a été entreprise à l'aide de deux anticorps polyclonaux dirigés contre des mucines gastriques déglycosylées : anticorps anti-mucines antrales (A-HF) et anticorps anti-mucines fundiques (F-HF) [216]. Le clone ADNc obtenu est constitué d'un grand domaine répété en tandems qui s'étend sur 507 nucléotides (169 acides aminés), il s'agit du plus grand domaine répétitif de mucines publié à ce jour. Il est riche en thréonine (31%), en sérine (18%) et en proline (15%).

Récemment au congrès de l'AGA 1996 [217], un autre clone a été présenté, non répétitif qui correspondrait à l'extrémité C-terminale de MUC 6. Il comprend 1718 nucléotides et est composé d'un domaine codant de 1083 nucléotides (361 acides aminés), suivi d'une région 3' non codante de 632 nucléotides. La partie codante est subdivisée en deux régions : une région de 270 acides aminés riche en sérine, thréonine et proline (62%) et une région de 91 acides aminés riche en cystéine (12%). La position des 11 résidus de cystéine est conservée comme dans MUC 2, MUC 5AC, MUC 5B et le préfacteur de von Willebrand.

## **LES MUCINES TRACHEO-BRONCHIQUES**

En 1989, notre laboratoire a isolé vingt clones à partir d'une banque d'expression de muqueuse trachéobronchique grâce à un anticorps polyclonal préparé contre des mucines respiratoires humaines (déglycosylées par l'acide trifluorométhane sulfonique) et ayant la particularité de contenir un mélange équilibré de mucines neutres, sialylées et sulfatées [55]. Après séquençage et localisation chromosomique, ces clones ont été classés en quatre familles d'ADNc différents : MUC 4, MUC 5A, MUC5B et MUC 5C. Ces trois derniers ayant des séquences nucléotidiques différentes mais localisés sur le même chromosome ont reçu le symbole unique de MUC 5. Un travail réalisé au laboratoire auquel nous avons participé avant d'entreprendre ce travail de thèse, a permis de montrer l'appartenance de MUC 5A et MUC 5C au même gène, appelé dorénavant MUC 5AC, alors que MUC 5B est un gène différent [98].

### **MUC 4**

L'ADNc de MUC 4, JER 64, n'est que partiellement connu, quatre types de séquences répétitives ont été découvertes. La première codante est composée d'une région de 48 nucléotides (16 acides aminés) répétées 39 fois, riche en sérine et thréonine (50%) donc sites potentiels de O-glycosylation [172]. La seconde, en 3' de la première, est constituée d'une séquence répétée de 15 nucléotides (5 acides aminés) parfaitement conservée. Les deux autres sont en cours de caractérisation.

### **MUC 5AC**

Plusieurs clones ont été étudiés dont JER 47 et JER 58. Le clone JER 58 (0,8 kb) est caractérisé uniquement par une séquence répétée de 24 nucléotides (8 acides aminés). Le clone JER 47 (1,4 kb) est composé de deux séquences répétées de 24 nucléotides suivies par un domaine de 130 acides aminés riche en cystéine, ce domaine contient les peptides TR-3A et TR-3B [185], puis 21 séquences répétitives de 24 nucléotides interrompues par un second domaine de 130 acides aminés riche en cystéines (contenant également les peptides TR-3A et TR-3B) et se termine par 4 autres séquences répétitives de 24 nucléotides (**figure 6**)



					1	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	His	Val	Ser						
					9	Ile	Ser	Lys	Thr	Thr	His	Ser	Gln						
17	Pro	Val	Thr	Arg	Asp	<b>Cys</b>	His	Leu	Arg	<b>Cys</b>	Thr	Trp	Thr	Lys	Trp	Phe			
	Asp	Val	Asp	Phe	Pro	Ser	Pro	Gly	Pro	His	Gly	Gly	Asp	Lys	Glu	Thr			
49	Tyr	Asn	Asn	Ile	Ile	Arg	Ser	Gly	Glu	Lys	Ile	<b>Cys</b>	Arg	Arg	Pro	Glu			
	Glu	Ile	Thr	Arg	Leu	Gln	<b>Cys</b>	Arg	Ala	Glu	Ser	His	Pro	Glu	Val	Ser			
81	Ile	Glu	His	Leu	Gly	Gln	Val	Val	Gln	<b>Cys</b>	Ser	Arg	Glu	Glu	Gly	Leu			
	Val	<b>Cys</b>	Arg	Asn	Gln	Asp	Gln	Gln	Gly	Pro	Phe	Lys	Met	<b>Cys</b>	Leu	Asn			
113	Tyr	Glu	Val	Arg	Val	Leu	<b>Cys</b>	<b>Cys</b>	Glu	Thr	Pro	Lys	Gly	<b>Cys</b>	Pro	Val			
	Thr	Ser	Thr	Pro	Val	Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Pro	Ser	Gly	Arg	Ala	Thr			
			Ser	Pro	Thr	Gln	Ser	Thr	Ser	Ser	Trp	Gln							
						Lys	Ser	Arg	Thr	Thr	Thr	Leu	Val						
						Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro						
						Gln	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro						
						Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro						
						Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro						
						Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro						
						Gln	Thr	Ser	Ile	Ser	Ser	Ala	Pro						
						Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro						
						Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro						
						Thr	Ser	Ser	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala						
						Thr	Thr	Ser	Ile	Ile	Ser	Ala	Pro						
						Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Phe	Pro						
						Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Thr						
						Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro						
						Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro						
						Gln	Thr	Ser	Lys	Thr	Ser	Ala	Ala						
						Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Gly	Ser						
						Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Thr						
						Thr	Thr	Ser	Thr	Ala	Ser	Val	Ser						
						Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	His	Val	Ser						
						Val	Ser	Lys	Thr	Thr	His	Ser	Gln						
315	Pro	Val	Thr	Arg	Asp	<b>Cys</b>	His	Pro	Arg	<b>Cys</b>	Thr	Trp	Thr	Lys	Trp	Phe			
	Asp	Val	Asp	Phe	Pro	Ser	Pro	Gly	Pro	His	Gly	Gly	Asp	Lys	Glu	Thr			
347	Tyr	Asn	Asn	Ile	Ile	Arg	Ser	Gly	Glu	Lys	Ile	<b>Cys</b>	Arg	Arg	Pro	Glu			
	Glu	Ile	Thr	Arg	Leu	Gln	<b>Cys</b>	Arg	Ala	Lys	Ser	His	Pro	Glu	Val	Ser			
379	Ile	Glu	His	Leu	Gly	Gln	Val	Val	Gln	<b>Cys</b>	Ser	His	Glu	Glu	Gly	Leu			
	Val	<b>Cys</b>	Arg	Asn	Gln	Asp	Gln	Gln	Gly	Pro	Phe	Lys	Met	<b>Cys</b>	Leu	Asn			
411	Tyr	Glu	Val	Arg	Val	Leu	<b>Cys</b>	<b>Cys</b>	Glu	Thr	Pro	Lys	Gly	<b>Cys</b>	Pro	Val			
	Thr	Ser	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Pro	Ser	Gly	Arg	Ala	Thr			
			Ser	Pro	Thr	Gln	Ser	Thr	Ser	Ser	Trp	Gln							
						Lys	Ser	Arg	Thr	Thr	Thr	Leu	Val						
						Thr	Ser	Ser	Ile	Thr	Ser	Thr	Thr						
						Gln	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro						
						Thr													

TR3A : \_\_\_\_\_

TR3B : - - - - -

FIGURE 6 : Séquence peptidique déduite de l'ADNc JER 47 appartenant au gène MUC 5AC : la région répétitive de 8 AA est interrompue par 2 domaines riches en cystéine [98].

MUC 5AC a donc une structure composée de séquences répétées de 24 nucléotides alternées avec des domaines riches en cystéine. Ce domaine riche en cystéines a été retrouvé à deux reprises dans MUC 2 : un localisé entre le domaine D3 et la région répétitive riche en thréonine, sérine et proline et le second localisé entre la région riche en thréonine, sérine et proline, et le grand domaine répétitif de 23 acides aminés.

A part notre laboratoire, d'autres équipes ont publié des séquences partielles d'ADNc de MUC 5AC :

Une autre séquence d'ADNc, le clone NP3a (3168 nucléotides) contenant les peptides TR-3A et TR-3B a également été publiée et rapportée à MUC 5AC [151]. Ce clone a été obtenu à partir d'une banque d'ADNc de polype nasal criblée avec une sonde réalisée par P.C.R. La séquence des oligonucléotides-amorces de la P.C.R. a été déterminée après purification de mucines respiratoires d'un patient asthmatique et séquençage des peptides ainsi obtenus. Le clone NP3a est riche en sérine, thréonine (18%) et cystéines (8%). Les cystéines sont réparties dans la séquence de 1056 nucléotides. Il ne contient pas les séquences consensus de 24 nucléotides mais une séquence TTVGP/S répétée cinq fois et une séquence GQCGTCTN. Une séquence riche en cystéine (8,2%) est homologue à des séquences trouvées dans MUC 2 et MUC 5B, l'homologue de MUC 2 chez le rat (MLP), la mucine bovine sous-maxillaire (BSM), la mucine sous-maxillaire de porc (PSM) et le prépro-facteur de von Willebrand. Ce clone NP3a représenterait l'extrémité C-terminale de MUC 5AC.

Le clone ADNc L31 a également été rapporté à l'extrémité C-terminale de MUC 5AC [139]. Il a été isolé à partir d'une banque d'expression de cellules HT-29 MTX, lignée cellulaire de cancer du côlon résistante au méthotrexate  $10^{-6}$  M et exprimant des mucines de type gastrique. Un anticorps polyclonal dirigé contre les mucines gastriques normales a été utilisé pour le criblage. L31 présente une forte homologie avec NP3a au niveau nucléotidique (98,6%). Cependant, l'homologie en séquence peptidique est plus faible à cause de changements de cadre de lecture répartis sur 4 petites séquences. Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer ces différences, elles seraient dues à un polymorphisme interindividuel, à un épissage alternatif. L31 code pour une protéine de 1042 acides aminés riche en cystéine (9,2%) et comprenant le domaine D4 retrouvé dans vWF, MUC 2 et MUC 5B.

Enfin, un dernier clone ADNc correspondant cette fois-ci à l'extrémité N-terminale de MUC 5AC a été publié [127]. Le clone HGM-1 a été obtenu à partir d'une banque d'estomac humain criblée avec un oligonucléotide. La séquence de l'oligonucléotide a été déterminée

après purification de mucines gastriques humaines et séquençage des peptides obtenus. L'ADNc est constitué de 4 domaines riches en cystéine dont un est homologue au domaine D retrouvé dans vWF, MUC 2 et MUC 5B. Ces domaines sont séparés par 3 petites séquences non répétitives riches en sérine et thréonine.

Comme il a été spéculé pour MUC 2, il semble que ces régions riches en cystéine retrouvées dans L31, NP3a et HGM-1 et homologues au prépro-facteur de von Willebrand soient impliquées dans la polymérisation des mucines trachéo-bronchiques par des ponts disulfures [127, 151].

Ces 4 clones partiels : HGM-1 (extrémité N-terminale), JER 47 et L31/NP3a (extrémité C-terminale), grâce à leurs homologies avec MUC 2, MUC 5B et vWF permettent d'ébaucher la structure de l'ADNc de MUC 5AC (**figure 7**). Cet alignement met en évidence une structure de MUC 5AC beaucoup plus proche de celle de MUC 5B que celle de MUC 2.

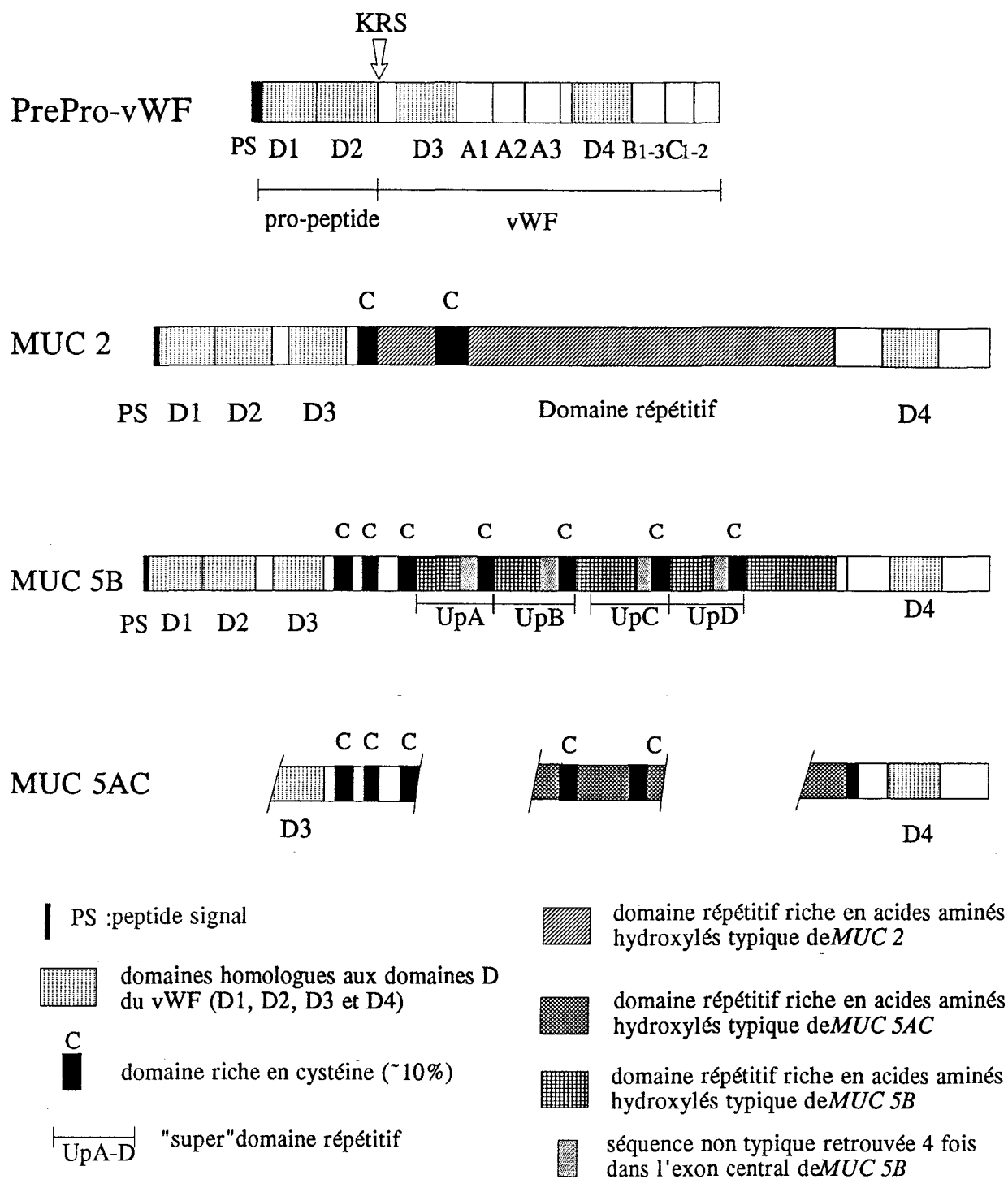
## **MUC 5B**

MUC 5B a été caractérisé par le clone JER 57 (1,83kb) [12, 68].

La région centrale de 3570 acides aminés (10713 nucléotides) est constituée de "super" domaines de 528 acides aminés répétés 4 fois (UpA à UpD), ils sont constitués de 11 répétitions irrégulières de 29 acides aminés (87 nucléotides) riches en sérine (15%), thréonine (37%) et proline (11%), d'un sous-domaine de 111 acides aminés unique mais riche en sérine, thréonine et alanine et d'une région de 108 acides aminés riche en cystéine (10 résidus de cystéine). Ces régions riches en cystéine sont retrouvés 2 fois dans MUC 2 et au moins 6 fois dans MUC 5AC [65] (**figure 7**).

La région N-terminale comporte 3 domaines homologues aux domaines D du prépro-facteur de von Willebrand. Ces 3 domaines sont présents dans MUC 2.

La région C-terminale est elle aussi homologue au prépro-facteur de von Willebrand (domaine D4) retrouvée également dans MUC 2 et MUC 5AC.



**FIGURE 7 :** Représentation schématique des homologies de structure entre le prépro-facteur von Willebrand (vWF) et les apomucines codées par les gènes localisés en 11p15 : MUC 2, MUC 5B et MUC 5AC.

## **pAM1**

Récemment, un nouveau clone issu d'une banque de trachée humaine criblée avec un anticorps polyclonal dirigé contre des mucines trachéo-bronchiques déglycosylées a été publié [195]. L'ADNc pAM1 est composé de séquences répétitives de 41 nucléotides, codant pour un peptide répétitif non parfait, suivies d'une région 3' non codante de 49 pb et code pour un peptide de 313 acides aminés (941 nucléotides). Il a été localisé sur le chromosome 12 en q24.3 Son profil d'expression n'est pas connu. Son rattachement à la " famille MUC " semble controversé [224] et n'a pas encore été réalisé.

## ***LES MUCINES SALIVAIRES***

### **MUC 7**

Avec MUC 1 et MUC 2, MUC 7 est le troisième ADNc de mucine entièrement séquencé [23]. Deux types de mucines salivaires ont été purifiées, de haut et de bas poids moléculaire : MG1 et MG2 respectivement [176]. MUC 7 a été isolé à partir d'une banque de mucines salivaires criblée par un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine MG2 déglycosylée [23]. MUC 7 est une petite mucine. L'ADNc de 2350 nucléotides code pour une protéine de 377 acides aminés (1131 nucléotides, 39 kDa) et contient une région de 6 répétitions de 23 acides aminés presque parfaits riches en sérine (12%), thréonine (17%) et proline (21%). La partie N-terminale (164 acides aminés) contient une région hydrophobe de 20 acides aminés qui correspond probablement au peptide signal. Les deux résidus de cystéine présents dans la région codante, en amont du domaine répétitif seraient impliqués dans la formation de ponts intramoléculaires plutôt qu'intermoléculaires- qui eux sont rencontrés dans les autres mucines sécrétées, puisque la protéine MUC 7 n'existerait que sous la forme de monomères . La partie C-terminale est une séquence type « mucin-like » de 75 acides aminés, riche en sérine et thréonine (33%) ainsi qu'en proline (9%). Cinq sites potentiels de N-glycosylation ont été trouvés, quatre se trouvent dans la partie N-terminale et un dans la partie C-terminale.

Gènes	Longueur de la région répétée en pb	Longueur de la région répétée en AA	Séquences consensus	Ref.
MUC 1	60 pb	20 AA	GSTAPPAHGVTSAPDTRPAP	83
MUC 2	69 pb	23 AA	PTTTPITTTTTVTPTPTGTQT	91
MUC 3	51 pb	17 AA	HSTPSFTSSITTTETTS	92
MUC 4	48 pb	16 AA	TSSASTGHATPLPVD	172
MUC 5AC	24 pb	8 AA	TTSTTSAP	12, 98
MUC 5B	87 pb	29AA	ATGSTATPSSTPGTTHTPPVLTT TATTPT	12, 65
MUC 6	507 pb	169 AA	AASPFSSTGPMATSFQTTTTYPT PSHPQTTLPTHVPPFSTSLVTPSTG TVITP <sup>T</sup> HAQMATSASIHSTPTGTIP PPTTLKATGSTHTAPPMTPTTSGT SQHAHSSFSTAKTSTSHSHTSS <sup>T</sup> H HPEVTPTSTTTITPNPTSTGTSTPV AHTTSATSSRLPTPFTTHSPPTGS	216
MUC 7	69pb	23 AA	TTAAPPTPSATTPAPPSSSAPPE	23

**TABLEAU 2:** *Caractéristiques des séquences consensus répétitives des différentes mucines humaines.*

*Les sites potentiels de O-glycosylation sont représentés en caractères gras (acides aminés hydroxylés : sérine et thréonine)*

## 5- Biosynthèse des mucines

Les mucines sont synthétisées et sécrétées par des cellules spécialisées de la muqueuse : les cellules caliciformes.

Ces cellules ont un réticulum endoplasmique rugueux (RER) concentré dans la partie basale. L'appareil de Golgi est bien développé ce qui correspond à une activité importante de glycosylation.

Ces cellules sont polarisées et caractérisées par la présence de granules de sécrétion au pôle apical.

Un certain nombre d'incertitudes demeurent quant à la séquence et à la localisation des événements de biosynthèse des mucines en particulier sur le nombre de compartiments impliqués dans la O-glycosylation dans l'appareil de Golgi et sur la possibilité d'événements précoces dans le réticulum endoplasmique [149].

La biosynthèse des mucines comprend plusieurs étapes dont l'ordre serait :

- N- glycosylation
- oligomérisation
- O- glycosylation
- stockage intracellulaire
- sécrétion

### *a- N- et O- glycosylations*

Le précurseur peptidique (apomucine) est synthétisé par les ribosomes associés au RER puis se retrouve dans la lumière du RER (probablement par clivage du peptide signal) où il est N-glycosylé. Au cours de cette étape, est ajouté un oligosaccharide riche en mannose à un résidu d'asparagine par un lipide donneur (dolichol). Pour que l'asparagine soit glycosylée, elle doit être comprise dans la séquence consensus Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr (où X représente n'importe quel acide aminé excepté la proline ou l'acide aspartique) [208].

Après les premières étapes de la N-glycosylation dans le RER, la mucine est transportée vers l'appareil de Golgi. Les chaînes glycaniques N-liées sont modifiées et grâce à une série de glycosyltransférases, la protéine est O-glycosylée, le premier sucre ajouté est la N-acétylgalactosamine sur un résidu sérine ou thréonine suivi d'un nombre variable (jusqu'à vingt) de résidus glucidiques supplémentaires.

Aucune séquence consensus de O-glycosylation n'est connue, cependant un résidu de proline à proximité des résidus de sérine ou thréonine faciliterait l'accès à la N-acétylgalactosamine transférase [232].

Enfin, des quantités variables de résidus d'acide sialique et de sulfate sont ajoutées.

On obtient ainsi des mucines très hétérogènes dans leur structure et dans leur charge, caractéristiques importantes pour les propriétés des mucines.

#### *b- Formation d'oligomères*

La grande majorité des mucines sécrétées forment des oligomères (exception supposée : les mucines sous-maxillaires dont MUC 7).

Les mécanismes de cet assemblage ne sont pas encore parfaitement élucidés mais il semble qu'il y ait de fortes similitudes avec l'oligomérisation du facteur de von Willebrand (vWF) puisque plusieurs apomucines ont révélées de fortes homologues par leurs régions N- et C- terminales aux domaines D du vWF. Ces domaines D interviennent dans la dimérisation avec une réaction entre les extrémités C-terminales grâce à l'établissement de ponts disulfures [233].

Cette dimérisation a lieu dans le réticulum endoplasmique pour ensuite s'oligomériser par leurs extrémités N-terminales grâce à des ponts disulfures dans les compartiments du *trans*-Golgi.

Cette conformation est stabilisée par des ponts disulfures intramoléculaires. Ces liaisons seraient établies grâce à une enzyme particulière contenue dans le RER.



Il a été montré que la présence de liaisons N- glycaniques est indispensable à l'oligomérisation et que l'oligomérisation a lieu avant la O-glycosylation [11, 62, 126].

De plus, l'oligomérisation précède le transport vers l'appareil de Golgi. La taille finale de l'oligomère est déterminée dans le RER par le nombre de sous-unités liées les unes aux autres.

### *c - Transport intracellulaire et sécrétion*

Lorsque la biosynthèse est achevée, les mucines sortent de l'appareil de Golgi (réseau *trans*-golgien) sous forme de vésicules ou granules de sécrétion qui se forment par bourgeonnement à partir du Golgi.

Les mucines sont alors *empaquetées, condensées* (phénomène visible par augmentation de la densité en microscopie électronique), et *stockées* dans ces vésicules du côté apical de la cellule. La charge négative des mucines joue un rôle important dans ce stockage, les mucines forment des complexes avec des ions calcium présents en grande quantité dans les granules [208].

La sécrétion est la libération des mucines par exocytose, par fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique apicale. Ce phénomène est contrôlé par la stimulation vagale et les agents cholinergiques. La prostaglandine E<sub>2</sub> augmente également la sécrétion de mucus [208] : une augmentation transitoire de la concentration de calcium intracellulaire en réponse à une stimulation provoquerait l'exocytose.

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

C'est parce que les vésicules matures sont remplies de façon aussi dense que les cellules pourront sécréter rapidement de grandes quantités de mucus par exocytose.

## 6- Histochimie des mucines

L'étude de l'histochimie des mucines est importante pour la compréhension du profil mucipare normal caractéristique des glycanes de la muqueuse. Dans certaines pathologies des changements quantitatifs et qualitatifs affectant ce profil ont été observés [104]. Les mucines sont ainsi détectées dans les cellules caliciformes, cellules spécialisées de l'épithélium, et dans les cellules sous-muqueuses des glandes des tractus respiratoire, digestif et génital.

### *a- Principe*

Plusieurs méthodes sont utilisées pour identifier les différents types histochimiques de mucines. Le principe général est la formation d'une réaction colorée au niveau des cellules épithéliales mucosécrétantes [25, 130].

### *b- Principaux types histochimiques de mucines*

Cette classification est basée sur la nature des chaînes oligosaccharidiques latérales. On distingue :

- les *mucines neutres*, comportant des radicaux hexose, constituées principalement des fucomucines.

- les *mucines acides*, le caractère acide est lié au degré de sialylation et de sulfatation des chaînes oligosaccharidiques, on distingue ainsi deux groupes :

- les mucines acides, riches en résidus d'acide sialique ou sialomucines dont certaines sont sensibles (N-acétylées) et d'autres résistantes (O-acétylées) à la digestion par la neuraminidase.

- les mucines très acides, riches en résidus sulfate ou sulfomucines.

### *c - Méthodes histochimiques*

Elles sont réalisées à partir de biopsies ou de pièces opératoires fixées.

- les *mucines neutres* sont mises en évidence par la réaction à l'acide periodique-Schiff (PAS).

- les *mucines acides* sont révélées par le bleu alcian (BA). La distinction entre les sialomucines et les sulfomucines est réalisée en faisant varier le pH du bleu alcian.

On utilise aussi des réactions histochimiques combinées qui permettent d'identifier sur une même coupe les différentes catégories de mucines.

### **7- Les mucines animales**

Plusieurs mucines animales ont été caractérisées et sont présentées dans le **tableau 3**.

On observe une homologie importante entre une mucine humaine et son homologue chez l'animal au niveau des séquences N- et C- terminales, alors que l'homologie est faible au niveau des séquences répétées d'une espèce à une autre.

L'homologue MUC 1 chez la souris montre une homologie importante dans les domaines membranaires et cytoplasmiques (87%) suggérant le rôle important de ces deux domaines, alors que les séquences répétitives ne montrent que 34% d'homologie [206, 230]. De la même façon, MUC 2 humain et *Muc 2* de rat sont fortement homologues dans leurs régions non répétitives (80% pour la partie N-terminale et 89% pour la partie C-terminale) et très peu dans leurs séquences répétitives [93, 96, 160, 237].

Les gènes de mucines animales homologues à MUC 3, MUC 4, MUC 5B, MUC 6 et MUC 7 n'ont pas encore été identifiés. Cependant, un second gène de mucine intestinale chez le rat a été découvert et pourrait être relié au gène MUC 3 humain [121].

Espèce animale	ADNc	Taille de la répétition	Séquence consensus	Homologue humain	Ref.
souris	<i>Muc-1</i>	20-21 AA		MUC 1	206, 230
rat	MLP ] <i>rMuc2</i> ]	11-12 AA		MUC 2	238 236
rat	RMUC176 ] M2 ]	6 AA	TTTPVD		93 121
souris	<i>Muc5ac</i> (MGM)	16 AA	QTSSPNTGKTSTISTT	MUC 5AC	201
rat	RAM 7S	7-12 AA			
rat	RSGM	13 AA	PTTDSTTPAPTTK		5
chien	CTM	non répétitif riche en T,P, S,G,A			226 194
porc	PSM	81 AA	GAGPGTTASSVGVETARPSV AGSGTTGTVSGASGSTGSSSSG SPGATGASIGQPETSRRISVAGSS GAPAVSSGASQAAGTS		214 70
	PGM-2A 9B	16 AA	SVQPSSSSSAPTTSTT		218
bœuf	BSM	non répétitif			21
bœuf	pGBM7-1	127 AA	ALRLVNGSDRCQGRVEVLYGG SWGTVCCDDSWDTNDANVVCR QLGCGWAISAPGDARFGQGGPI VLDDVGCSGYETYLWSCSHSP W NTHNCGHSEDAVICASQT QSTVVPDLWYPTTDYGTESGL		157
xénope	FIM-A.1	9 et 4 AA	VPTTPETTT et ETTT		111
xénope	FIM-B.1	11 AA	GESTPAPSETT		177
xénope	FIM-C.1	8 AA	KATTTTPTTT		102

TABLEAU 3: Caractéristiques des apomucines animales

### *En résumé:*

Les mucines **épithéliales** forment une famille de O-glycoprotéines complexes et hétérogènes. La biologie moléculaire a apporté des éléments nouveaux pour la définition des mucines. Ces molécules présentent les caractéristiques suivantes :

- \* leur *masse moléculaire est importante* : de quelques centaines de mille à plus de un million de daltons, néanmoins existent de petites mucines par exemple MUC 7 ;
- \* elles se composent d'un *squelette protéique* (apomucine) sur lequel se greffent de nombreuses *chaînes oligosaccharidiques*, surtout des O-glycannes ;
- \* les chaînes oligosaccharidiques très nombreuses et très variées, représentent de *50 jusqu'à 80 % de la masse moléculaire*;
- \* la liaison sucre-peptide est de *type O-glycosidique*. Elle s'établit entre un acide aminé hydroxylé (sérine ou thréonine) et la N-acétylgalactosamine;
- \* il existe néanmoins *quelques liaisons N-glycosidiques* dont le rôle lors de la biosynthèse semble important;
- \* l'axe polypeptidique est constitué de nombreux *domaines répétés en tandems*, riches en acides aminés hydroxylés (sérine et thréonine) mais aussi en proline, glycine et alanine;
- \* les mucines codées par les gènes localisés en 11p15 présentent dans leurs domaines N- et C- terminaux des *homologies de séquences*, ainsi qu'avec d'autres protéines (facteur de von Willebrand, Zonadhesine). Ces domaines ont la caractéristique d'être *riches en résidus de cystéine* (environ 10 %). Ces mucines correspondraient aux mucines sécrétées de grande taille synthétisées par les organes épithéliaux.
- \* elles peuvent être sécrétées ou membranaires ("mucin-like").

A côté de ces mucines épithéliales, il existe une seconde classe de molécules appelées aussi "mucines" dans la littérature : des glycoprotéines ancrées dans la membrane des leucocytes et des cellules endothéliales (CD 34, CD 43, CD 45, GlyCAM-1, Mad-CAM-1, PSGL-1, TACTILE) qui partagent avec les mucines épithéliales un certain nombre de propriétés biochimiques (O-glycoprotéines et axe peptidique parfois organisés en domaines répétitifs et comportant des domaines fonctionnels distincts autres que les domaines riches en cystéine du vWF). Elles interviennent dans les processus d'adhésion [202, 223].

## C- LES GENES DE MUCINES

### 1- Connaissances actuelles des différents gènes de mucines

La localisation chromosomique des gènes correspondant aux ADNc décrits a été réalisée par hybridation *in situ* sur chromosomes métaphasiques. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 4**.

L'étude des gènes de mucines n'en est encore qu'à ses débuts. Seul les gènes MUC 1 et MUC 7 sont actuellement bien connus. L'analyse de MUC 5B est bien avancée dans notre groupe, celle de MUC 4 et MUC 5AC a été entreprise plus récemment.

#### MUC1

La séquence entière du gène MUC 1 est connue (**figure 8**).

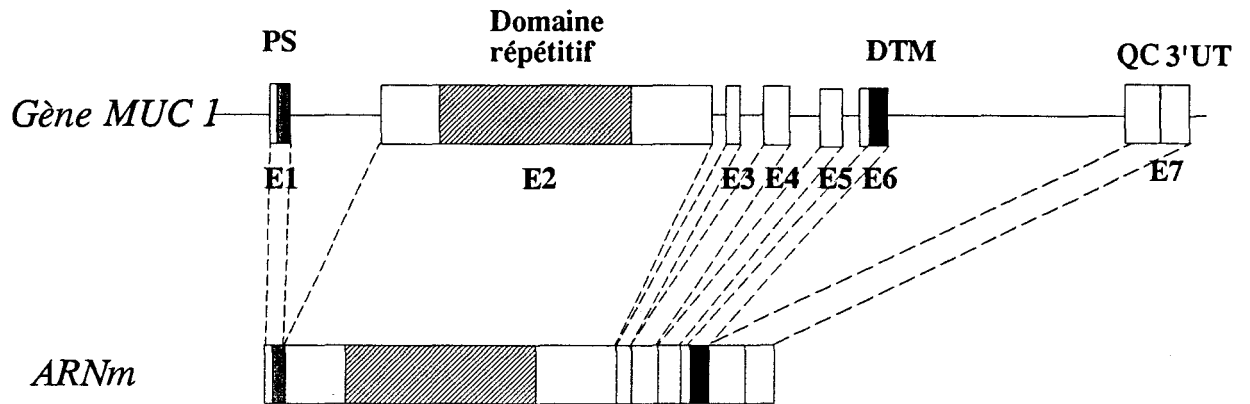
Il est localisé sur le chromosome 1 en q21-24[210]. Sa taille est de 4 à 7 kb. Il comporte six introns. Le domaine répétitif a la caractéristique d'être porté par un seul exon, qui est aussi le plus grand.

Deux ARNm issus d'un épissage alternatif, grâce à deux sites accepteurs présents dans l'exon 2, ont été décrits. Ils diffèrent par 27 nucléotides qui créent alors une modification dans la séquence du peptide signal [140, 234]. La fonction de ces ARNm n'est pas connue. Un autre épissage alternatif donnant naissance à deux transcrits a été montré [231]. Ces deux formes coderaient pour les formes membranaires et sécrétées de la protéine MUC 1, puisqu'en plus de la forme transmembranaire, une forme sécrétée a été décrite [26, 34].

Cependant, certaines controverses existent autour de l'existence d'un ARNm codant pour cette forme soluble [84, 135, 140]. Il semblerait que cette forme puisse exister sans un mécanisme d'épissage alternatif, qui ferait intervenir un clivage protéolytique de la forme membranaire, ce qui suggère que cette forme soit relarguée de la membrane par l'action d'une protéase [26]. Un clivage dans le *trans*-golgi qui éliminerait les parties transmembranaire et cytoplasmique a été démontré [141, 142].

Gènes	Longueur de la région répétée	Localisation chromosomique	Ref.
MUC 1	60 pb	1q21-24	210
<b>MUC 2</b>	<b>69 pb</b>	<b>11p15</b>	89
MUC 3	51 pb	7q22	76
MUC 4	48 pb	3q29	90
<b>MUC 5AC</b>	<b>24 pb</b>	<b>11p15</b>	220
<b>MUC 5B</b>	<b>87 pb</b>	<b>11p15</b>	200
<b>MUC 6</b>	<b>507pb</b>	<b>11p15</b>	216
MUC 7	69pb	4q13-21	24

**TABLEAU 4 :** Localisation chromosomique des différents gènes de mucines humaines.  
 Les gènes localisés en 11p15 sont représentés en caractère gras.



*PS* : peptide signal

*DTM* : domaine transmembranaire

*QC* : queue cytoplasmique (69 AA)

*3' UT* : région 3' non traduite

□ exon (E1 à E7)

— intron

500 pb

**FIGURE 8** : Représentation schématique de l'organisation du gène *MUC 1* et de son ARNm (forme membranaire) [86].



Plus récemment, deux autres variants de la protéine MUC 1 ont été décrits, issus d'un épissage alternatif. La molécule MUC 1/Y dérivée de la forme membranaire et dépourvue de l'exon contenant la partie répétitive codant pour le domaine O-glycosylé [243]. La molécule MUC 1/Z est dérivée de la forme sécrétée et est également dépourvue du domaine O-glycosylable [235]

L'étude du promoteur est en cours, en particulier pour mieux comprendre la régulation de MUC 1 dans les carcinomes. Plusieurs séquences impliquées dans le contrôle de son expression ont été découvertes : une TATA box en -24/-19 [136], une séquence E-MUC 1 localisée en -84/-72 pb déterminerait l'expression tissu-spécifique de MUC 1 [128], une séquence localisée en -505/-485pb se lierait à une protéine de 45 kDa [2]. Deux GC box (site de liaison de la protéine Sp1) ont été localisées en -576/-568 et -99/-91, ces deux sites Sp1 jouent un rôle dans l'activation de la transcription du gène MUC 1 [129]. Cependant, la GC box en -99/-91 a une séquence différente de la séquence habituellement rencontrée (avec une adénine en 5' et est capable de se lier à la protéine Sp1 (activatrice de la transcription) ainsi qu'à la protéine SpA qui a un rôle négatif sur la transcription. De plus, un facteur soluble (70 kDa) du tissu intestinal normal humain est capable de stimuler la production de MUC 1 dans des cellules de cancer du côlon humain [114]. La région impliquée, nommée RME (responsive mucin element) est localisée en -531/-520 pb [203].

## MUC 2

Le gène MUC 2 est moins bien connu [215]. Il est localisé sur le chromosome 11 en p15.5.

La partie centrale du gène est constituée d'un seul exon de 8,7kb comprenant les séquences répétitives et correspondant ainsi à la région O-glycosylable.

La région 3' du gène MUC 2, en aval de la région répétitive, comprend au moins sept introns.

Une analyse de la région 5' du gène est en cours où il a été mis en évidence une TATA box ainsi que des sites potentiels de reconnaissance par des facteurs de transcription [32].

## MUC 5B

Le gène MUC 5B est très volumineux, sa taille est d'environ 40 kb. Il est constitué d'un énorme domaine central de 10713 nucléotides codant pour un peptide de 3570 acides aminés qui, comme pour MUC 1 et MUC 2, est composé des séquences répétées en tandem, formant ainsi la région O-glycosylable de la mucine. Cette région est constituée d'une séquence répétée de 29 acides aminés (87 nucléotides) interrompue par des séquences riches en cystéine et des séquences non typiques [65].

L'étude de la régulation de l'expression du gène MUC 5B a été entreprise dans notre laboratoire. Une séquence potentielle de liaison de la protéine Sp1 a été localisée en 3' de l'exon central répétitif. Des études de retard sur gel ont montré que cette séquence se lie spécifiquement à un facteur nucléaire extrait des cellules HT-29 MTX. Ce facteur, qui n'est pas la protéine Sp1, est une protéine de 42 kDa nommée NF1-MUC5B [166].

## MUC 5AC

Le gène MUC 5AC est moins bien connu, son étude est en cours au laboratoire. Sa taille est d'environ 20 kb donc plus petit que MUC 5B [139, 174]. De même, le domaine répétitif semble être plus petit, il est compris dans un fragment Pst I de 8 kb en Southern-blot [165].

## MUC 4

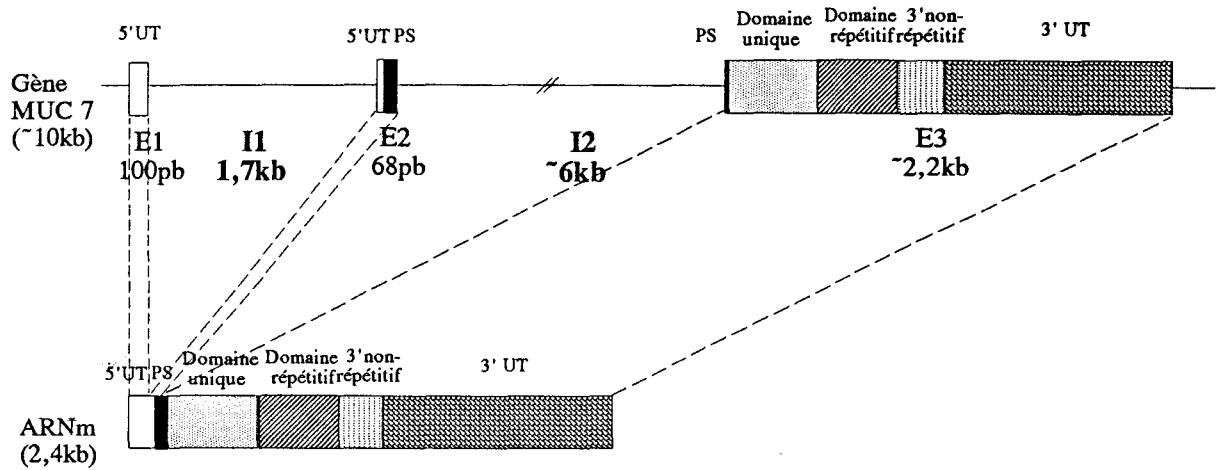
Le gène MUC 4, également étudié au laboratoire, est le plus grand gène de mucines connu à ce jour, il s'étend sur environ 60kb [174]. La marche sur le chromosome a permis d'isoler trois nouvelles séquences répétitives. Leur étude est en cours au laboratoire.

## MUC 7

La structure du gène MUC 7 est entièrement connue [24]. Sa taille est d'environ 10 kb. Il est constitué de trois exons séparés par deux introns (**figure 9**). Les deux premiers exons sont petits (100pb et 68pb), ils codent pour la région 5' non traduite et le peptide signal. Le troisième exon est plus grand, environ 2,2kb, il comporte toute la séquence codante de la protéine ainsi que la partie 3' non traduite. Les deux introns ont une taille d'environ 1,7 et 6kb.

Une boîte TATA est située en -24/-19 ainsi qu'une séquence consensus CAAT en -83/-79. Plusieurs autres séquences régulatrices ont été trouvées : un élément AP-1, un élément de réponse aux glucocorticoïdes et à l'AMPc. Le rôle de ces séquences dans la régulation du gène MUC 7 reste à déterminer.

En ce qui concerne les gènes MUC 3 et MUC 6, aucun élément sur leur organisation génomique n'a été publié. Il semblerait cependant que MUC 3 ait une structure très différente de l'autre gène de mucine intestinale MUC 2 [97]. Quant à MUC 6, son organisation se rapprocherait des autres gènes localisés en 11p15.5 [217].



PS : peptide signal

5' UT : région 5' non traduite

3' UT : région 3' non traduite

□ exon (E1 à E3)

— intron (I1 et I2)

500 pb

**FIGURE 9** : Représentation schématique de l'organisation du gène MUC 7 et de son ARNm [24].

## 2- Les gènes de mucines en 11p15.5

Sur les 8 gènes de mucines découverts, 4 sont localisés sur le chromosome 11 en p15.5 : MUC 2 , MUC 5AC, MUC 5B et MUC 6. Il existe donc un cluster de gènes MUC dans cette région du chromosome. Les homologies de séquences déduites des ADNc partiels pouvaient laisser supposer qu'ils faisaient partie d'un seul et même gène. Mais l'étude de l'expression tissulaire et cellulaire ainsi qu'une analyse par mégacartographie réalisée dans notre laboratoire sur 725 kilobases par la technique de d'électrophorèse en champs pulsés a montré qu'il s'agissait bien de 4 gènes différents qui, de plus, ont pu ainsi être localisés les uns par rapport aux autres [167]. Ces quatre gènes se trouvent entre le gène H-RAS et le gène de l'IGF2, sur un fragment commun de 2200 kb et dans l'ordre : H-RAS / MUC 6 / MUC 2 / MUC 5AC / MUC 5B / IGF2, MUC 6 étant le gène le plus télomérique, à environ 500 kb de H-RAS.

L'organisation commune de ces ADNc (**figure 7**) : grand domaine central constitué des séquences répétitives O-glycosylables, l'homologie importante de leurs extrémités N- et C-terminales et la conservation rigoureuse de la position des résidus de cystéine d'un ADNc à un autre (montré pour MUC 2, MUC 5AC et MUC 5B) suppose l'existence d'un gène ancestral et un mécanisme d'évolution communs [94]. Un petit gène ancestral ne contenant pas de régions répétées aurait subi une duplication donnant naissance à une première répétition (**figure 10**).

Si cette duplication maintient le cadre de lecture, ce nouveau gène sera conservé. Puis des crossing-overs inégaux mais homologues peuvent se produire et augmenter le nombre de domaines répétés donnant naissance à différents allèles. De plus, cette évolution rapide est récente dans le processus d'évolution, puisque les gènes de mucines sont spécifiques d'espèce, c'est à dire qu'une sonde répétitive d'origine humaine ne reconnaît pas les mucines d'origine animale.

La conservation des résidus de cystéine suggère le rôle important des ponts disulfures pour la fonction biologique des mucines, c'est à dire la formation du gel de mucus.

L'existence d'au moins 12 îlots CpG dans cette région suggère l'existence d'autres gènes (ou pseudogènes) à découvrir. En effet, il est probable que d'autres gènes existent puisque dans certaines muqueuses (comme le col utérin), aucun ADNc « typique » n'a été isolé.

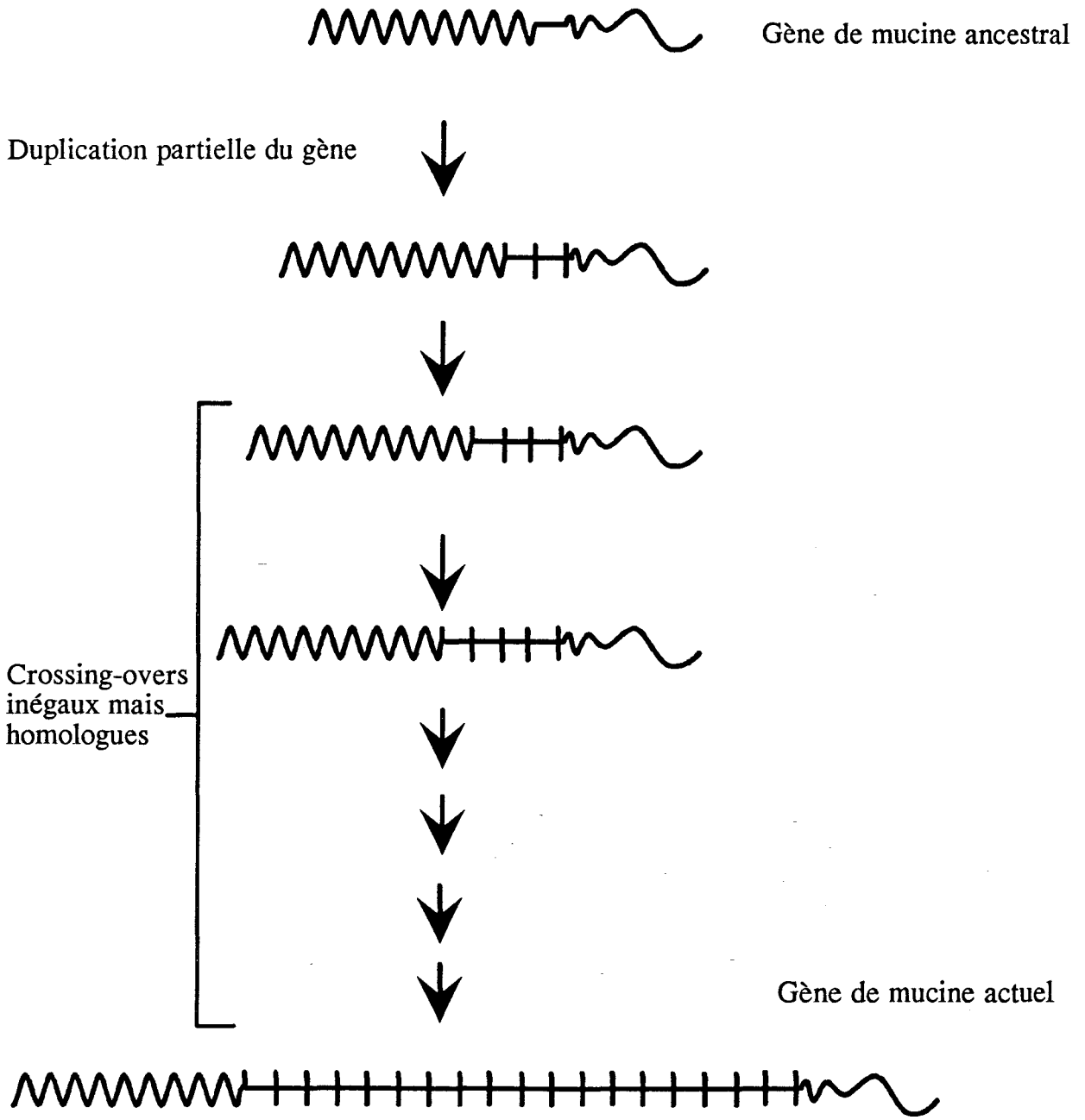


FIGURE 10 : Schéma hypothétique d'évolution des gènes de mucines proposé par Gum [94].

### 3- Caractéristiques des gènes de mucines

L'organisation de deux gènes est connue depuis peu : MUC 1 (1990), MUC 7 (1996). Pour MUC 2 et MUC 5B, seuls quelques éléments sont connus. Quant aux autres gènes, aucune étude n'a encore été publiée. Néanmoins, les premiers résultats sur l'étude des gènes de mucines suggèrent un certain nombre de caractéristiques communes à tous les gènes :

#### *a- Taille des gènes*

En l'état actuel des connaissances sur les cartes de restriction des gènes, on peut dégager les notions suivantes : la majorité des gènes de mucines sont très grands, leurs tailles approximatives sont : MUC 5AC : 20kb, MUC 5B : 40kb et MUC 4 : 60kb. Ils sont constitués d'un grand domaine répétitif : 8,7 kb pour MUC 2, 8kb pour MUC 5AC , 10,7 kb pour MUC 5B et 19kb (taille maximum) pour MUC 4. Ce domaine constitué des séquences répétées en tandems (de 24 nucléotides pour MUC 5AC à 507 nucléotides pour MUC 6), riches en sérine et thréonine, constitue la région O-glycosylable de la mucine. Néanmoins certains gènes sont plus petits : MUC 1 : 4 à 7 kb et MUC 7 : 10kb.

#### *b- Polymorphisme*

Une étude génétique de polymorphisme effectuée sur MUC 1, MUC 2 a révélé un polymorphisme interindividuel. Ce polymorphisme est dû à des variations du nombre de répétitions en tandems, autrement dit à une taille variable du domaine répétitif d'un allèle à un autre. On parle de polymorphisme de type V.N.T.R. pour Variable Number of Tandem-Repeats. Pour MUC 1, il a été montré une variation de 20 à 125 domaines répétés [84, 209], d'où une variation de la taille du gène de 4 à 7 kb. Pour le gène MUC 2, la taille de son domaine répétitif varie de 51 à 115 répétitions, d'où une variation de la région O-glycosylable de 3,5 à 8,7 kb, les allèles constitués de 100 à 115 répétitions sont cependant les plus communs [215].

Ce phénomène entraîne donc une variation de taille du domaine glycosylé, qui pourrait influencer les propriétés physico-chimiques du mucus, en particulier au cours de pathologies. De même pour MUC 7, une étude préliminaire a montré un très faible polymorphisme : la très

grande majorité des individus ont un gène avec six domaines répétés, quelques individus seulement en ont cinq [24].

*c- Expression en Northern-blot*

Le gène MUC 1 produit 2 transcrits issus de l'expression des 2 allèles dont les tailles varient d'un individu à un autre. Ce polymorphisme interindividuel est en relation avec le polymorphisme V.N.T.R. qui existe au niveau du gène [209].

Le gène MUC 7 produit un ARNm de 2,4 kb [23].

Les gènes de mucines supposées sécrétées et donc impliquées dans la formation du gel de mucus (MUC 2 à MUC 6) apparaissent quant à eux très complexes dans leur mode d'expression. Ils possèdent la caractéristique unique de produire en Northern blot un continuum d'aspect homogène s'étendant environ de 20 kb à moins de 1 kb, sans aucune bande discrète visible, suggérant une extrême hétérogénéité des transcrits. Ce profil est observé quelle que soit la muqueuse étudiée, quelle que soit l'intensité de l'expression (autoradiographie de quelques heures à plusieurs jours) et quelle que soit la sonde "MUC" hybridée (MUC 2 à MUC 6 : 6 gènes différents dont les sondes correspondant aux séquences répétitives ne s'hybrident pas entre elles). De plus, d'autres sondes, comme l'actine ou l'ARN ribosomal 28S, hybridées sur ces mêmes Northern blots donnent une bande unique considérée comme le témoignage de l'intégrité des ARN et de l'absence d'une dégradation massive lors de la préparation. Enfin, ce même profil hétérogène a été obtenu par plusieurs laboratoires utilisant des techniques de préparation d'ARN différentes.

Plusieurs hypothèses ont été avancées dans la littérature par les différents auteurs étudiant l'expression des gènes de mucines :

- ce continuum pourrait être du à une extrême fragilité des ARN liée soit à une très grande taille ( $\geq 20$ kb), soit à leur structure répétitive qui pourrait influencer de façon négative leur stabilité;



- un même gène donnerait naissance à de nombreux transcrits par un mécanisme d'épissage alternatif très complexe. Il pourrait être associé à l'existence de plusieurs démarrages et/ou arrêt de la transcription ainsi qu'à de multiples sites donneur et accepteur d'épissage;

- l'extrême hétérogénéité de ces ARN pourrait aussi être expliquée par un mécanisme cellulaire physiologique : un turnover extrêmement rapide des ARN en rapport avec une sécrétion massive et rapide de mucines.

Ce mode d'expression, si il n'est pas artéfactuel, a probablement des conséquences sur la qualité des mucines et par conséquent sur les propriétés biologiques du mucus. La muqueuse disposerait ainsi d'ARNm de toutes tailles pour pouvoir à tout instant synthétiser des mucines les mieux adaptées à sa physiologie à un instant donné.

*C'est pourquoi, lors de notre travail de thèse, nous nous sommes intéressée à l'étude de l'hétérogénéité des ARN et au mode d'expression des gènes de mucines sécrétées.*

#### **4- Expression des gènes de mucines**

##### *a- expression tissulaire par la technique de Northern blot*

L'étude de l'expression tissulaire par la technique de Northern blot a permis de montrer une notion importante : il n'y a pas expression exclusive d'un seul gène de mucine dans un type de muqueuse donnée, mais un profil complexe d'expression sur le plan qualitatif et quantitatif qui est spécifique à chaque muqueuse. Les gènes MUC s'expriment préférentiellement dans certaines muqueuses (**tableau 5**). En résumant, on obtient:

- MUC 1 est exprimé à la surface apicale des cellules de la plupart des tissus épithéliaux;
- MUC 2 est dominant dans le côlon;
- MUC 3 est détecté majoritairement au niveau de l'intestin grêle;

<b>Gène</b>	<b>Tissus d'expression majoritaire</b>	<b>Ref.</b>
MUC 1	sein, pancréas	86, 135
MUC 2	intestin grêle, côlon	87, 91, 92
MUC 3	intestin grêle, côlon, vésicule biliaire	92, 221
MUC 4	bronche, côlon, intestin grêle, endocol	14, 172
MUC 5AC	bronche, estomac (antre et fundus)	12, 98
MUC 5B	bronche, glande sous-maxillaire, vésicule biliaire	68, 221
MUC 6	estomac (antre), vésicule biliaire	216, 221
MUC 7	glandes salivaires exclusivement	23

**TABLEAU 5 :** *Tissus d'expression majoritaire des gènes de mucines.*

- MUC 4 semble beaucoup plus ubiquitaire, à l'exception des annexes du tube digestif (pancréas et vésicule biliaire) ;
- MUC 5AC montre une expression importante au niveau respiratoire et gastrique;
- MUC 5B s'exprime spécifiquement et intensément dans la bronche et les glandes salivaires ;
- MUC 6 est présent au niveau de l'antré pylorique et de la vésicule biliaire.

#### *b- expression cellulaire par la technique d'hybridation in situ*

A cette spécificité tissulaire s'ajoute une spécificité cellulaire. Le **tableau 6** résume les résultats obtenus dans notre laboratoire. Comme exemple, dans l'intestin, MUC 2 s'exprime dans les cellules caliciformes, alors que MUC 3 dans l'intestin, s'exprime dans les cellules caliciformes et les enterocytes. Un autre exemple dans l'estomac où MUC 5AC s'exprime uniquement dans l'épithélium de surface de l'antré et du fundus, alors que MUC 6 est présent uniquement dans les glandes de l'antré.

#### *c- expression des gènes de mucines au cours du développement*

L'étude de l'expression du gène MUC 1 chez la souris au cours du développement embryonnaire et fœtal a montré le rôle de ce gène dans le développement précoce des organes épithéliaux [28]. Le taux d'expression de Muc 1 est ensuite bien corrélé avec l'état de différenciation des organes : estomac, pancréas, poumon, trachée, rein, glandes salivaires et mammaires. Par contre, Muc 1 ne serait que peu impliquée dans l'organogénèse de l'intestin, tout au moins chez la souris.

Les souris "knock out" pour le gène Muc 1 ont un développement embryonnaire et fœtal comparable aux souris témoins et atteignent l'état adulte sans modification phénotypique [206b]

Ceci constitue donc un argument pour montrer le rôle majeur joué par ce gène au cours du développement des organes épithéliaux.

MUQUEUSES	GENES						
	MUC 2	MUC 3	MUC 4	MUC 5A	MUC 5B	MUC 6	MUC 7
Glandes salivaires	Gl -	Gl -	Gl -	Gl -	Gl +/++	Gl -	Gl +++
Bronche	E ++ Gl -	E - Gl -	E ++ Gl -	E +++ Gl -	E - Gl ++	E - Gl -	E - Gl -
Fundus	E - Gl -	E -/+ Gl -	E -/+ Gl -	E ++++ Gl -	E - Gl -	E - Ct + Gl -	E - Gl -
Antre	E - Gl -/+	E ++ Gl +	E -/+ Gl -	E ++++ Gl -	E - Gl -	E - Gl +/++++	E - Gl -
Duodénum	E ++++ C ++++ Gl +	E +++ C -/+	E - C - Gl -	E - C - Gl -	E - C - Gl -	E - C - Gl +/++++	E - C - Gl -
Jéjunum	E ++++ C ++++	E +++ C -/+	E - C -	E - C -	E - C -	E - C -	E - C -
Iléon	E ++++ C ++++	E +++ C -/+	E -/+ C -/+	E - C -	E - C -	E - C -	E - C -
Côlon	E ++++ C ++++	E ++ C -	E ++ C ++	E - C -	E - C -	E - C -	E - C -
Vésicule biliaire	E + I +	E +++ I +++	E - I -	E + I +	E + I ++	E -/+ I +++	E - I -
Prostate	Gl -	Gl -	Gl ++	Gl -	Gl -	Gl -	Gl -
Endocol	E + Gl +	E - Gl -	E ++ Gl ++	E ++ Gl ++	E + Gl +	E + Gl +	E - Gl -

TABLEAU 6 : Profil d'expression des gènes de mucines humaines chez l'adulte normal par hybridation *in situ* [13, 14, 221]

E : épithélium de surface  
 Gl : épithélium des glandes  
 C : cryptes  
 I : invaginations de l'épithélium  
 Ct : collet

Marquage : +++++ intensité très forte  
 +++ intensité forte  
 ++ intensité moyenne  
 + intensité faible  
 - absent

L'étude de l'expression du gène MUC 2 en fonction du développement du tube digestif humain a révélé des éléments intéressants [43].

Entre 12 et 23 SA (semaines d'aménorrhée), un marquage intense des cellules indifférenciées regroupées dans le compartiment prolifératif de la base des cryptes, est observé. Puis, ce marquage intéresse également les cellules caliciformes immatures du bord des cryptes, et puis enfin, les cellules caliciformes de plus en plus nombreuses avec l'âge, présentes à la surface des villosités.

Ce résultat témoigne du rôle joué par Muc 2 dans la différenciation du côlon et de l'intestin grêle.

## D- MUCINES ET PATHOLOGIES

Certaines pathologies (en particulier les cancers d'origine épithéliale) ont été décrites où il a été mis en évidence un dérèglement de la biosynthèse des mucines. L'étude de ces anomalies a permis de mettre en évidence :

- tout d'abord, des modifications de la *composition* des chaînes glycaniques où l'équilibre des mucines neutres, acides et très acides est perturbé. Cette découverte a suscité la recherche de marqueurs tumoraux (Ac anti-épitopes-sucres). Des épitopes associés aux tumeurs ont été décrits.

- des modifications d'*expression* des gènes de mucines par les techniques de Northern blot, hybridation *in situ* et/ou immunohistochimie (augmentation, diminution de l'expression, expression aberrante). Cette étude est prometteuse pour la découverte de nouveaux marqueurs tumoraux : on peut envisager de détecter ces modifications à l'aide de sondes nucléotidiques ou d'anticorps anti-peptides.

## 1- Modifications de la composition des chaînes glycaniques des mucines au cours de la carcinogénèse

### *a - Modifications des chaînes glycaniques*

Les méthodes immunohistochimiques permettent la détection de caractéristiques antigéniques. Il est alors possible d'étudier les modifications qualitatives et/ou quantitatives des antigènes de mucines dans les tissus normaux et dans les tissus pathologiques.

De nombreuses modifications des chaînes glycaniques associées aux mucines sont retrouvées dans les tissus tumoraux et sur les mucines circulantes de patients atteints d'adénocarcinomes [108].

Plusieurs types de modifications peuvent être détectées :

- augmentation de certains antigènes dans le tissu tumoral (Lewis<sup>x</sup> dans les tumeurs gastrointestinales);
- réapparition d'antigènes normalement exprimés uniquement au stade foetal (Ag oncofoetaux, exemple : sialyl-Lewis<sup>a</sup> dans le côlon);
- expression d'antigènes incompatibles avec le groupe sanguin du patient (A, B, H, Lewis<sup>b</sup>);
- disparition d'antigènes exprimés dans les tissus normaux par glycosylation incomplète, permettant alors la détection du squelette peptidique ou le cœur de la structure glycanique qui sont normalement masqués (exemple : T, Tn, sialyl-Tn);
- néosynthèse de nouveaux antigènes par augmentation de la sialylation de différents antigènes, ce qui entraîne un arrêt de la glycosylation et donnent des antigènes modifiés (exemples : sialyl-Lewis<sup>x</sup>, sialyl-Lewis<sup>a</sup>, sialyl-T, sialyl-Tn).

*b- différentes modifications antigéniques de mucines accompagnent les processus de transformation maligne et de métastase*

\* La mucine dont la fonction est la plus étudiée au cours des cancers épithéliaux est celle codée par le gène MUC 1. Contrairement aux autres mucines, elle est essentiellement membranaire et possède donc des propriétés particulières. Dans la muqueuse colique normale, la mucine codée par le gène MUC 1 ne comporte pas d'épitope sialyl-Lewis<sup>x</sup> et sialyl-Lewis<sup>a</sup>. Dans les cancers du côlon, plus de 90% de cette mucine porte ces épitopes [101]. Il a été montré que cet épitope est un ligand pour des sélectines (P- et E-sélectines), molécules intervenant dans les processus d'adhésion. Les cellules tumorales sialyl-Lewis<sup>x</sup> et sialyl-Lewis<sup>a</sup> positives libérés dans le sang peuvent interagir avec la paroi vasculaire (E-sélectine) ou les plaquettes (P- sélectines) facilitant le processus de dissémination au cours des métastases.

\* Certains antigènes résultent de la glycosylation incomplète des mucines, c'est le cas de l'antigène sialyl-Tn. Cette structure oligosaccharidique correspond à la base de la chaîne, le branchement des autres oses n'étant pas réalisés, cet antigène n'est pas détecté dans les tissus normaux. Il est présent dans environ 50% des adénomes coliques et dans plus de 90% des cancers du côlon. On retrouve également cet antigène dans les autres types d'adénocarcinomes. Dans les cancers du sein, sa présence est corrélée à un haut grade histologique, à l'importance de l'aneuploïdie et du pourcentage de cellules tumorales en phase S [47].

De plus , il a été montré [159] que les cellules exprimant cet antigène sont résistantes aux cellules NK (Natural Killer) et aux cellules T cytotoxiques [222] et ainsi métastasent plus facilement.

*c- perspectives d'applications cliniques*

L'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques permettent de détecter la présence de ces nouveaux épitopes liés à l'évolution de la carcinogénèse. La détection de ces antigènes chez des patients atteints de cancer peut constituer un outil pour le diagnostic par immunoscintigraphie, évaluer la réponse à une thérapie, prédire une éventuelle récurrence. Par exemple, les antigènes sialyl-Lewis<sup>x</sup> et sialyl-Tn sont associés à une augmentation de la dysplasie au cours de la séquence adénome-carcinome colorectal, ces antigènes peuvent donc

constituer un marqueur de la transformation maligne [115]. L'expression des antigènes sialyl-Lewis<sup>x</sup> quant à eux, ont été associés à une survie moindre de patients souffrant de carcinomes gastriques ou colorectaux [154, 239]. De plus, les anticorps dirigés contre ces antigènes pourront être utilisés en immunothérapie comme transporteur de radioisotopes ou de drogues [66]. Enfin, l'antigénicité d'un épitope porté par la glycoprotéine MUC 1, reconnu par les lymphocytes T cytotoxiques [119] chez des patientes atteintes de cancer du sein ouvre la voie à des essais de vaccination. L'étude de ces antigènes tumoraux pourrait donc aboutir à un impact thérapeutique direct.

## **2 - Modification de l'expression des gènes de mucines**

### *a - cancers épithéliaux et expression du gène MUC 1*

Dans les épithéliums normaux (glandes salivaires, bronche, côlon, pancréas, sein, utérus, prostate), la protéine MUC 1 est exprimée au niveau de la membrane apicale. Dans les adénocarcinomes, on observe une augmentation de l'expression de MUC 1 [109] et toute la surface cellulaire est alors recouverte par la mucine. Or la partie extracellulaire de MUC 1 est très longue, sa surexpression crée une inhibition des interactions cellule - cellule et/ou cellule - matrice suggérant son rôle au cours des métastases

### *b - cancer du sein*

Dans le tissu sain, MUC 1 est fortement exprimé au niveau ARN et protéique [34, 35, 83, 109, 182]. La perte de la reconnaissance de certains anticorps détectant le domaine répétitif de MUC 1 avec le tissu sain semble être due au masquage de l'épitope peptidique par glycosylation [34, 82]. L'expression des autres gènes de mucines est très faible voire inexistante dans le tissu sain [35, 109, 116]. Dans le tissu tumoral et dans les lignées cellulaires cancéreuses, MUC 1 est le gène le plus exprimé [34], un marquage avec des anticorps anti-MUC 2 [159], MUC 3 [109], MUC 5B et MUC 5AC [182] a également été observé.



*c - tumeurs coliques*

*\* cancer du côlon*

Quelques études concernant un nombre limité d'échantillons peu décrits au plan anatomo-pathologiques ont faits l'objet de quelques études :

Une étude a été réalisée par Northern blot [159]. L'expression de MUC 1 est la même dans les tissus sains et pathologiques. Les gènes MUC 2 et MUC 3 sont plus ou moins exprimés dans les tumeurs que dans les tissus normaux, et ceci en rapport avec le degré de différenciation des tumeurs (dans 7 tumeurs sur les 9 étudiées). Pour le gène MUC 4, ce même type d'observation a été fait. Les gènes MUC 5AC et MUC 5B ne s'expriment que rarement dans les cancers colorectaux. Quant au gène MUC 6, aucune étude n'a été faite. Des études supplémentaires sont nécessaires pour établir si il existe un lien entre la modification d'expression d'un gène de mucine et le stade d'évolution de la tumeur. Il faut cependant noter qu'une augmentation de l'expression de MUC 2 et MUC 3 a été décrite dans quelques cas de cancers mucineux [109]. L'étude par anticorps a montré des divergences avec l'étude par Northern blot : MUC 2 s'exprime dans la plupart des cancers [109], bien que dans quelques cas, l'expression de MUC 2 disparaît confirmant les résultats observés par Northern blot. MUC 3 s'exprime dans la plupart des cancers mais un peu plus faiblement que MUC 2. Dans le tissu tumoral, MUC 2 et MUC 3 montrent un profil diffus dans le cytoplasme alors que dans le tissu sain, MUC 2 est périnucléaire et MUC 3 est apical [109]. La discordance entre les résultats obtenus par Northern blot et par immunohistochimie n'a pas encore été complètement élucidée. L'hypothèse avancée serait qu'une glycosylation incomplète entraînerait une exposition de sucres normalement masqués augmentant ainsi l'immuno-réactivité des anticorps indépendamment de la quantité de protéines effectivement traduites. Une autre étude a montré une expression forte de MUC 5B dans la plupart des tumeurs étudiées [182], alors que MUC 5AC n'a été trouvé que dans 2 tumeurs sur 18.

*\* les tumeurs villeuses rectosigmoïdiennes :*

Les tumeurs villeuses rectosigmoïdiennes sont caractérisées par une sécrétion importante de mucus. D'un point de vue médical, elles ont un pouvoir de transformation et de récurrence élevés. Une étude réalisée dans notre laboratoire par hybridation *in situ* a mis en évidence une surexpression du gène MUC 2 ainsi qu'une expression aberrante du gène MUC 5AC (le gène MUC 5AC ne s'exprime pas dans la muqueuse colique saine) [33].

De plus, il a été démontré un degré d'expression dépendant du grade de dysplasie : l'expression de MUC 5AC est plus forte dans la tumeur de bas grade, diminue dans la tumeur de haut grade et disparaît dans l'adénocarcinome. Ainsi, l'expression du gène MUC 5AC pourrait constituer en pathologie digestive un marqueur précoce de transformation des tumeurs villositaires. Il a été montré également dans 20% des cas, une expression du gène MUC 5AC à distance de la tumeur dans des zones endoscopiquement et histologiquement saines. Ce pourcentage correspond au pourcentage de récurrence décrit dans la littérature. Des études supplémentaires sont donc en cours pour savoir si cette expression aberrante du gène MUC 5AC pourrait constituer un marqueur précoce de récurrence tumorale.

#### *d - cancer du pancréas*

Cette étude a été réalisée par hybridation *in situ*.

La majorité des tissus normaux expriment MUC 1 et faiblement MUC 5B et MUC 3 [17]. Dans la majorité des cancers du pancréas, MUC 1, MUC3, MUC 4, MUC 5B et MUC 5AC sont fortement exprimés. Ainsi, on observe une expression de gènes normalement absents du pancréas normal : MUC 4 et MUC 5AC. Ces deux gènes pourraient donc constituer des marqueurs tumoraux. Dans huit lignées cellulaires étudiées par Northern blot, des taux variables d'ARNm de MUC 1 ont été observés [16]. Les ARNm de MUC 2 et MUC 3 sont présents à des taux faibles voire indétectables. Une forte expression de MUC 4 et MUC 5AC est observée dans 2/8 et 5/8 lignées cellulaires respectivement. Aucun signal n'a été détecté avec MUC 5B. Ces résultats ont été confirmés par anticorps. [16], puis par hybridation *in situ* [16, 17].

#### *e - cancer de l'estomac*

Cette étude a été réalisée par Northern blot et immunohistochimie [110].

L'estomac normal exprime MUC 1, MUC 5AC et MUC 6, alors que MUC 2, MUC 3 et MUC 4 ne s'expriment pas.

Dans la métaplasie intestinale, on observe une expression importante de MUC 2 et MUC3, gènes typiquement exprimés dans l'intestin.

Dans les cancers de l'estomac, on observe une diminution de l'expression de MUC 5AC et de MUC 6 et une augmentation de MUC 3 et MUC 4. Le processus de transformation de l'épithélium gastrique est donc associé à une diminution d'expression de gènes présents dans l'estomac normal (MUC 5AC et MUC 6) et une expression de gènes normalement présents dans le côlon (MUC 2, MUC 3 et MUC4).

#### *f - cancer du poumon*

Cette étude a été réalisée par immunohistochimie et Northern blot [155]. Le poumon normal exprime MUC 1 et MUC 4, alors que MUC 2 et MUC 3 sont absents. Dans les adénocarcinomes du poumon, en particulier les cancers bien différenciés, il y a augmentation de l'expression de MUC 1, MUC 3 et MUC 4. Par contre, les cancers épidermoïdes et les cancers à grandes cellules, seul MUC 4 est augmenté. L'augmentation de l'expression du gène MUC 4 dans plusieurs types de cancers (sauf les cancers à petites cellules) montre l'intérêt de ce gène en tant que marqueur dans les cancers du poumon.

Dans des travaux en cours de réalisation au laboratoire sur les carcinomes broncho-pulmonaires, il apparaît des dérégulations complexes impliquant les gènes MUC 2, MUC 3, MUC 4, MUC 5AC et MUC 5B.

#### *g - vésicule biliaire : lithiase et cancer*

Les mucines protègent la vésicule biliaire contre les sels biliaires qui constituent de véritables détergents présents à des concentrations élevées dans la bile. En plus de cette fonction de protection, les mucines pourraient jouer un rôle important dans le développement de lithiases grâce à un rôle de concentration de substances hydrophobes (cholestérol, acides gras) au niveau de leurs domaines nus, c'est pourquoi l'étude de l'expression des gènes de mucines dans la vésicule présente un intérêt particulier.

Une étude comparative a montré une augmentation très significative de l'expression de MUC 3 et MUC 5B chez des patients présentant des lithiases alors que MUC 1, MUC 2, MUC 4, MUC 5AC et MUC 6 ne sont pas modifiés par rapport aux sujets normaux [158]. Des thérapies visant à prévenir l'hypersécrétion des mucines codées par MUC 3 et MUC 5B éviterait la formation de lithiases chez les patients à risque.

Une étude réalisée dans notre laboratoire par Northern blot et hybridation *in situ*, a mis en évidence une expression aberrante du gène MUC 4 dans l'adénome de la vésicule biliaire. MUC 4 ne s'exprime pas dans l'épithélium biliaire sain. Ceci suggère que l'expression du gène MUC 4 pourrait constituer un marqueur au cours de la transformation de l'épithélium biliaire [221]. Cette étude confirme les premiers résultats obtenus sur des cellules vésiculaires en culture [38].

*D'autres études seront nécessaires pour déterminer si une dérégulation de l'expression des gènes de mucines altère la glycosylation de certaines mucines et a un rôle dans la tumorigénèse.*

# **STRATÉGIE**

---

## STRATÉGIE

---

Au cours de cette présentation générale des glycoprotéines de type mucine et des gènes correspondants, nous nous sommes attachés à souligner la diversité de cette famille de molécules et la complexité d'expression des gènes de mucines : complexité d'expression à l'échelle tissulaire et cellulaire perçue grâce à l'outil d'hybridation *in situ*, et complexité d'expression à l'échelle moléculaire perçue grâce à l'outil de Northern blot.

Durant la période 1989 -1996, de très nombreux articles (nous en avons recensés plus de 30) relatent l'existence du phénomène de continuum des transcrits de mucines. La compréhension de cette propriété insolite des gènes de mucines a fait l'objet de notre travail de thèse.

En effet, les intérêts de l'élucidation de cette propriété sont importants :

- combien de transcrits sont exprimés par chacun de ces gènes MUC?
- existe-t-il, comme dans le cas de MUC 1, une diversité de formes moléculaires caractéristiques de chaque gène et en relation avec des fonctions biologiques différentes?
- existe-t-il des transcrits typiquement exprimés par les cellules tumorales?
- est-il possible de trouver des éléments structuraux spécifiques aux transcrits des cellules tumorales et donc de proposer une nouvelle génération de marqueurs tumoraux?
- les transcrits exprimés par les cellules différenciées des tissus adultes sont-ils les mêmes que ceux exprimés par les cellules peu différenciées fœtales?

- les polymorphismes de restriction ou de type V.N.T.R. perçus à l'échelle génomique ont-ils une incidence fonctionnelle, c'est à dire, sont-ils perceptibles à l'échelle des ARNm : séquence variable des transcrits selon les sujets ou taille variable des transcrits selon les sujets?
  
- les transcrits de mucines localisées en 11p15 exprimés dans les tissus adultes et les tissus fœtaux ou tumoraux, sont-ils soumis à une régulation modulée par empreinte parentale? C'est à dire, les transcrits sont-ils exprimés par les gènes d'origine maternelle ou paternelle?
  
- existe-t-il une susceptibilité individuelle au développement de maladies multifactorielles de type diabète, obésité, maladies inflammatoires du tube digestif associée à certains polymorphismes affectant les gènes MUC à expression grêle ou colique dominante?
  
- de la même façon, existe-t-il une susceptibilité au développement de l'asthme, de la bronchite chronique en relation avec certains polymorphismes affectant cette fois-ci les gènes MUC à expression respiratoire majeure?
  
- la même interrogation peut encore porter sur la susceptibilité au développement des tumeurs épithéliales au sens large : cancers bronchiques ou de l'œsophage des fumeurs, cancers digestifs, cancers génitaux...

*Il apparaissait donc au début de ce travail de thèse indispensable d'apporter une réponse à la question du nombre et de la taille des ARNm exprimés par chacun des gènes de mucines.*

# I SITUATION DU SUJET

## 1- Profils d'expression observés en Northern blot : constat d'un signal inusuel

Les Northern blots révélés par les sondes MUC 2, MUC 3, MUC 4, MUC 5AC, MUC 5B et MUC 6 offrent tous le même aspect : un continuum très homogène, sans bandes discrètes détectables s'étendant d'une zone correspondant à 20 kb théoriques jusqu'à moins de 1 kb théorique.

Ce continuum, lorsque les sondes sont marquées au phosphore 32, est foncé lorsque l'expression est intense, pâle lorsque l'expression est faible. Des variations des temps d'exposition autoradiographique (quelques heures à quelques jours, voire quelques semaines, selon les sondes ou les tissus étudiés), n'affectent pas l'homogénéité du continuum.

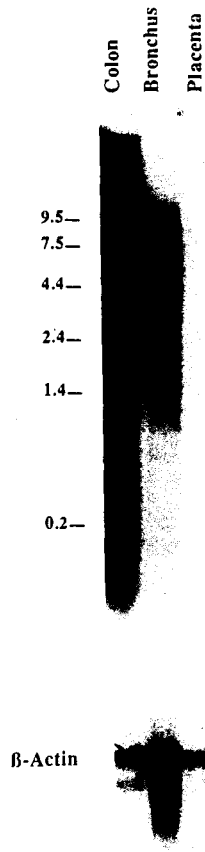
Des qualités de stringence variable mises en œuvre au niveau de l'hybridation ou du lavage des Northern blots ne modifient pas non plus l'homogénéité du signal.

Ces continuums ont d'abord été observés par les divers auteurs qui ont isolé les différents ADNc : MUC 2 [91], MUC 3 [92], MUC 4 [172], MUC 5AC [55], MUC 5B [12, 68 ] et MUC 6 [216] (**figure 11-12-13-14**).

Ces continuums ont ensuite été confirmés par d'autres auteurs qui ont étudié d'autres parties de ces même ADNc [116, 127, 139, 151], qui ont analysé l'expression de ces gènes dans certaines pathologies [16, 30, 87, 109, 110, 138, 155, 159, 241] ou encore par ceux qui ont étudié l'expression des mucines animales [21, 71, 116, 157, 160, 194, 201, 218, 226] (**figure 11-13**).

Ce même profil hétérogène est également observé sur des Northern blots ou des préparations d'ARN commerciaux poly(A<sup>+</sup>) (**figure 15**).



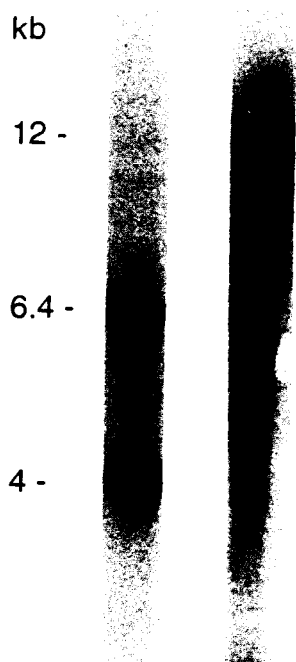


**Figure 2.** RNA blot hybridized with intestinal mucin cDNA SMUC 41. Human colon ( $\approx 0.5 \mu\text{g poly(A)}^+$  RNA), human bronchus ( $\approx 5 \mu\text{g poly(A)}^+$  RNA), human placenta ( $\approx 0.3 \mu\text{g poly(A)}^+$  RNA). RNA size markers in kB (BRL). Blot was hybridized with SMUC 41, washed under high-stringency conditions ( $0.2\times \text{SSC}$ , 1% SDS,  $63^\circ\text{C}$ ), and autoradiographic exposure was performed for 16 h using an intensifying screen (Cronex, DuPont Co., Wilmington, DE). The same blot was rehybridized with a  $\beta$ -actin probe. Exposure was for 16 h.

## MUC 2

*J. Clin. Invest.*, 1991 [116]

## MUC1 MUC2



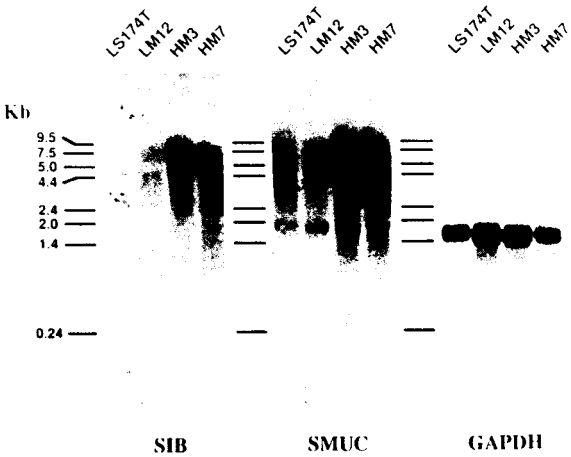
## MUC 1

## MUC 2

*Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 1994 [138]

**Fig. 2.** Northern blot hybridization of poly(A<sup>+</sup>) RNAs from cultures of HT29 cells using cDNA probes specific for the MUC1 (a) and MUC2 genes (b). Note the polydisperse message for MUC2.

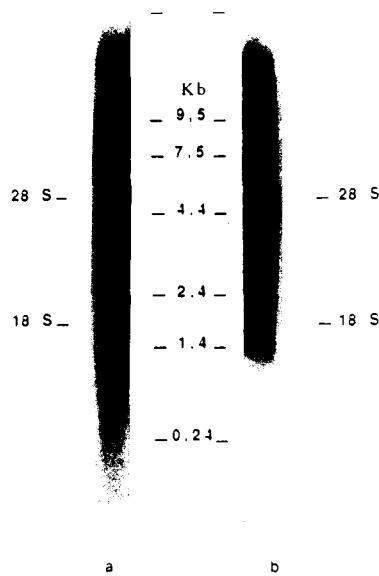
**FIGURE 11 :** Analyse par Northern blot de l'expression des gènes de mucines MUC 2 à MUC 6 : hétérogénéité du signal sous forme de continuums



**Figure 4.** RNA blot analysis of human intestinal mucin messages found in LS174T cells and quantitative mucin variants. Left, 3 µg samples of poly(A)<sup>+</sup> RNA from LS174T cells, and low (LM12) and high (HM3, HM7) mucin variants of this line (19) were subjected to agarose gel electrophoresis and blot analysis using SIB 139 as probe. The molecular size standards were obtained from Bethesda Research Laboratories with the exception of the 2.0 kb and 5.0 kb standards which were rRNA subunits. The autoradiograms shown on the middle and right were obtained following probe removal (13) using as probe first SMUC 41 (13) and then a GAPDH cDNA (20).

**MUC 3**

*Biochem. Biophys. Res. Commun., 1991*[9:



**Fig. 2.** Northern blot analysis.  
a) Human tracheo-bronchial mucosa.  
b) Human colonic mucosa.

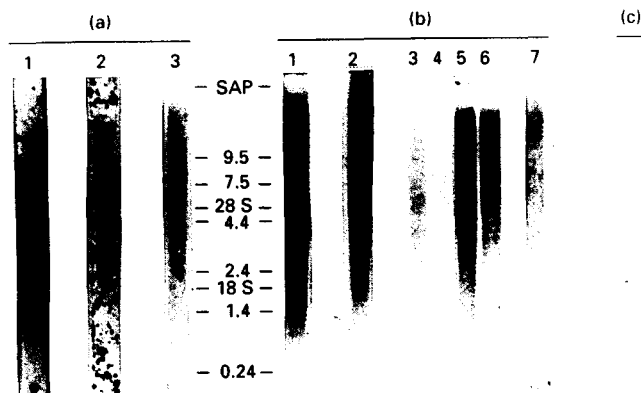
**MUC 4**

*Biochem. Biophys. Res. Commun., 1991* [17

**FIGURE 12 :** *Analyse par Northern blot de l'expression des gènes de mucines MUC 2 à MUC 6 : hétérogénéité du signal sous forme de continuums*

## MUC 5B

Biochem. J., 1993 [68]



**Figure 6 RNA blot analysis**

Poly(A)<sup>+</sup> RNA samples (2  $\mu$ g) from human mucosae were analysed as described in the Experimental section. In (a), bronchial mucosa was probed with NAU 24 (lane 1), NAU 28 (lane 2) and 89 bp *EcoRI*-*Pst*I fragment from JER 57 (lane 3). The autoradiographic exposure time was 15 h. In (b), tracheal mucosa (lane 1), bronchial mucosa (lane 2), gastric mucosae (fundus in lane 3 and antrum in lane 4), colonic mucosae (ascending colon in lane 5, descending colon in lane 6 and transverse colon in lane 7) were probed with JER 57. Hybridization signals were obtained after autoradiographic exposure time(s) of 3 h for respiratory mucosae samples and 24 h for digestive-mucosae samples. In (c), bronchial mucosa was probed with  $\beta$ -actin. Sizes are given in kb, and the positions of rRNAs are given (28 S and 18 S). SAP, sample application point

## MUC 5AC (TH 47 et TH 58)

Biorheology, 1990 [55]

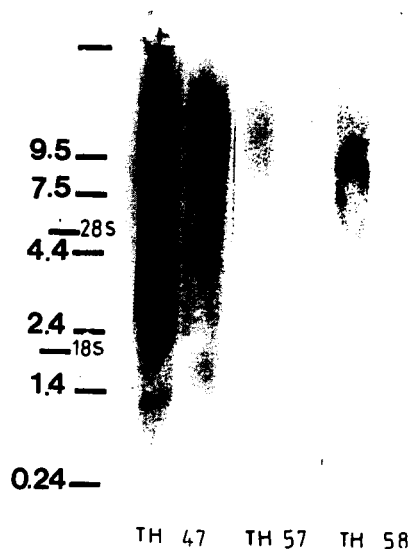


FIG. 2

Northern blot analysis of human tracheal mucosa. For each probe TH 47 (2nd type), TH 57 (3rd type) and TH 58 (1st type), two different concentrations of RNA were tested.

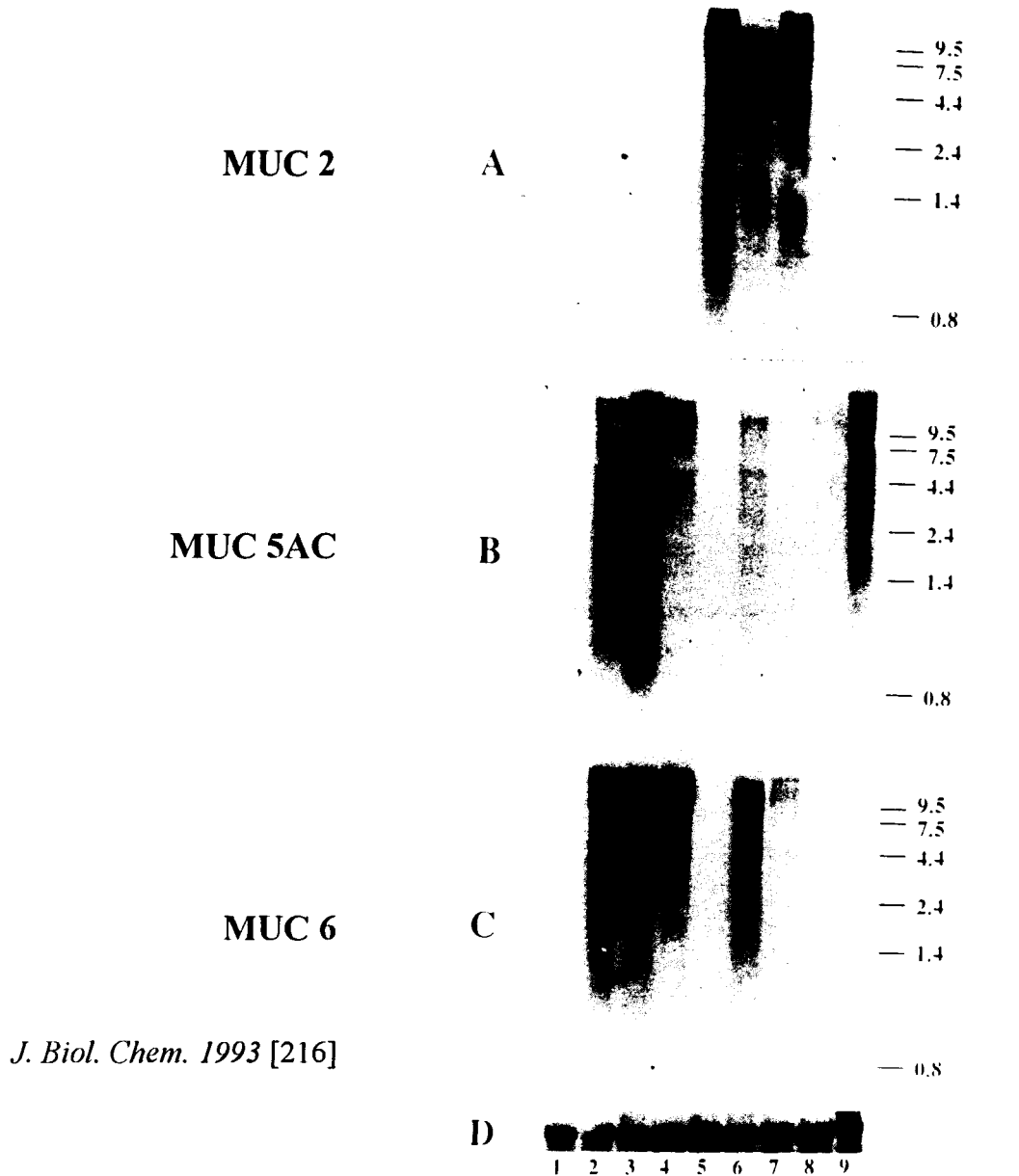
## MUC 5AC

J. Biol. Chem., 1995 [139]



**FIG. 9. Northern blot analysis of tissues.** Total RNA was extracted from normal antrum (lanes 1 and 2), fundus (lanes 3 and 4), colon (lane 5), duodenum (lane 6), and gallbladder (lane 7). The same result was obtained with the L31 or MUC5AC cDNAs. The arrows correspond to the position of 28 and 18 S RNAs.

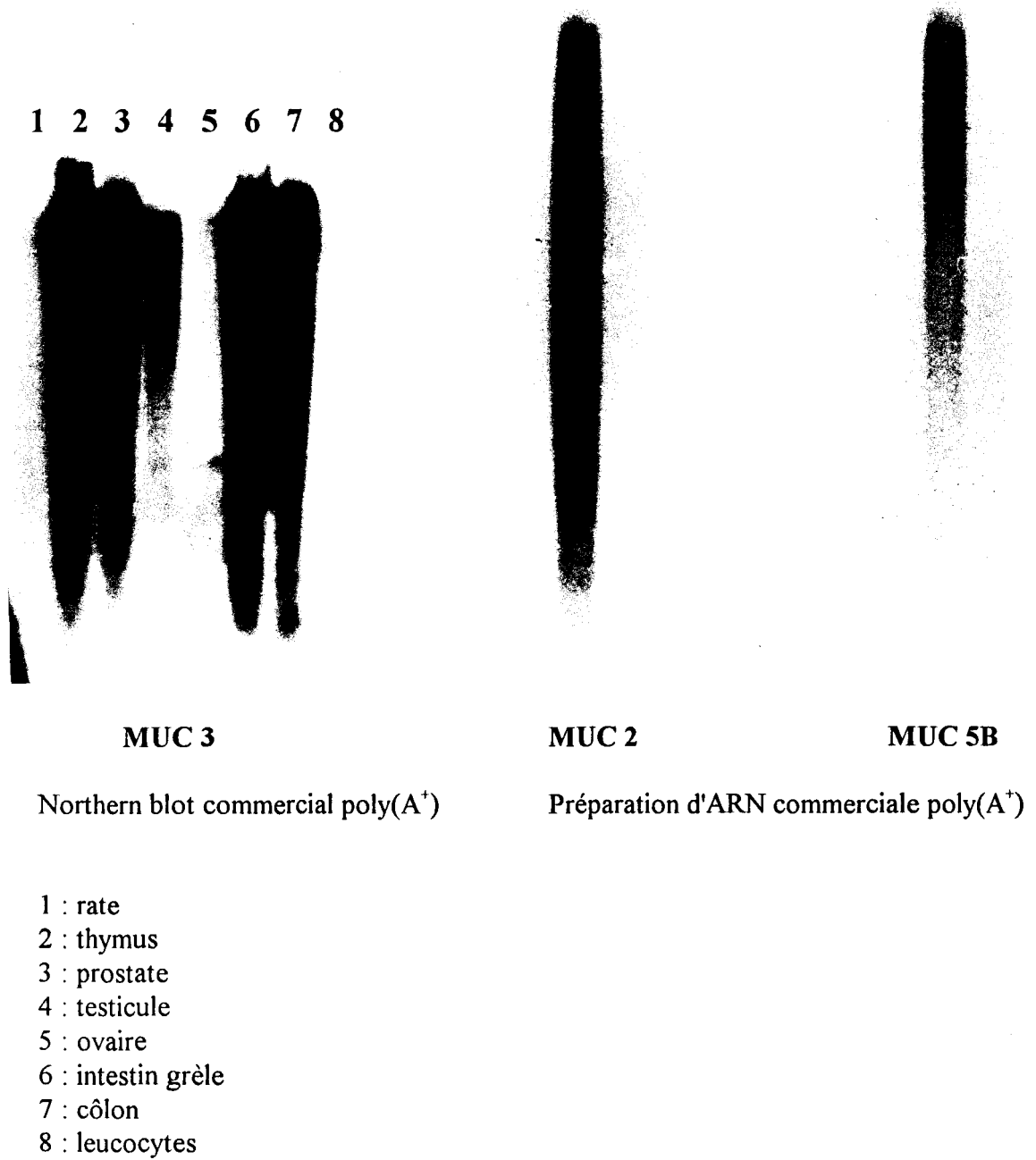
**FIGURE 13 : Analyse par Northern blot de l'expression des gènes de mucines MUC 2 à MUC 6 : hétérogénéité du signal sous forme de continuums**



*J. Biol. Chem.* 1993 [216]

FIG. 6. A, Northern blot of human DNA hybridized with the MUC2 repeat probe. Lanes: 1, esophagus; 2 and 3, stomach; 4, gallbladder; 5, jejunum; 6, terminal ileum; 7, colon; 8, lung; 9, trachea. B, same blot hybridized with MUC5 repeat probe. C, same blot using the MUC6 repeat probe. Note the differences in the expression patterns. D, control using a 28 S ribosomal oligonucleotide probe hybridized to the same blot. Note that the signal in each lane is fairly uniform. Ethidium bromide staining of the gel gave similar results (data not shown). Size markers in kilobases are given on the right of A-C.

**FIGURE 14 :** Analyse par Northern blot de l'expression des gènes de mucines MUC 2 à MUC 6 : hétérogénéité du signal sous forme de continuums



**FIGURE 15 :** *Analyse par Northern blot de l'expression des gènes de mucines à partir de blots ou d'ARN commerciaux poly(A<sup>+</sup>) (Clontech laboratories).*

Ces nombreux auteurs utilisaient des techniques variables :

- d'extraction et de purification des ARN totaux :

\*la technique décrite par Chirgwin et Coll.[46].[12, 46, 55, 68, 87, 127, 172] est la technique la plus utilisée;

\*d'autres auteurs [116, 139, 151, 109] ont aussi utilisé la technique décrite par Chomczynski et Coll. [48]

\* Ogata et Coll.[159] ont utilisé la technique décrite par Auffray et Coll.[3], basée sur l'utilisation du chlorure de lithium.

- de contrôle d'intégrité des ARN :

\*  $\beta$  actine [16, 116, 139];

\* GAPDH [30, 92];

\* ARNr 18S et 28S visualisés au bromure d'éthidium [109, 110, 155];

\* MUC 1 [159, 241];

\* ARNr 18s [9];

\* metalloendopeptidase (E.C.3.4.24.11) d'une taille de 5,2 kb [87].

## 2- Hypothèses soulevées dans la littérature

Ces nombreux auteurs ont avancé plusieurs hypothèses pour tenter d'expliquer cette propriété insolite des gènes MUC :

- ce continuum pourrait être du à une extrême fragilité des ARN liée soit à une très grande taille (~20kb), soit à une structure répétitive qui pourrait influencer de façon négative leur stabilité [94, 110, 127, 138, 155, 186];

- un même gène pourrait donner naissance à de nombreux transcrits par un mécanisme d'épissage alternatif très complexe. Il pourrait être associé à l'existence de plusieurs

démarrages et/ou arrêt de la transcription ainsi qu'à de multiples sites donneur et accepteur d'épissage [138, 186];

- l'extrême hétérogénéité de ces ARN pourrait aussi être expliquée par un mécanisme cellulaire physiologique : un turnover extrêmement rapide des ARN en rapport avec une sécrétion massive et rapide de mucines [94, 109, 138, 155, 186, 208];

- de multiples ARN seraient transcrits à partir de plusieurs gènes apparentés dont le nombre de séquences répétées varient d'un gène à un autre [186].

L'existence de ce continuum sur les images de Northern blots a également alimenté un débat au cours des rencontres et congrès sur le thème des mucines (2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> Workshop, Cambridge, 1992, 1994; Manchester, 1995). Et finalement, ce critère distinctif des gènes MUC était proposé pour identifier plus aisément un nouvel ADNc auquel le statut de mucine était proposé (pAM1 en tant que MUC8?).

### 3- Nos hypothèses

Trois groupes d'hypothèses nous paraissent devoir être proposés pour aborder l'étude de ce problème :

- 1- signal hétérogène artificiel en rapport avec des propriétés physicochimiques spécifiques aux ARNm des mucines;
- 2- hétérogénéité réelle d'expression des gènes "MUC" en rapport avec des propriétés biologiques spécifiques et originales;
- 3- une hypothèse intermédiaire associant une hétérogénéité réelle d'expression des gènes MUC magnifiée par des difficultés technologiques d'étude des transcrits, en relation avec des propriétés physicochimiques spécifiques.

Une étude critique des données de la littérature relatives aux ARNm ou aux produits glycoprotéiques exprimés par les gènes MUC nous permettait d'apporter des arguments de nature à étayer l'un ou l'autre de ces groupes d'hypothèses :

*a- hypothèse d'une hétérogénéité réelle*

\* la sélection des apomucines respiratoires humaines par immunoprécipitation des produits peptidiques issus de la traduction *in vitro* des ARNm bronchiques, révèle par électrophorèse PAGE-SDS, un continuum peptidique de 500 à 100 kDa [164]. Cette observation accrédite tout à fait l'hypothèse d'une extrême hétérogénéité des ARNm, puisque le calcul de la taille minimale des ARN correspondants s'étalerait de 3 à 14kb.

\* de même, l'observation suivante concernant encore les mucines respiratoires humaines : les mucines bronchiques purifiées apparaissent en microscopie électronique sous la forme de longs filaments très hétérogènes en longueur. La distribution des tailles mesurées est très large et continue de 400 à 1650 nm, ce qui correspond à des masses moléculaires estimées de 100 à 400 kDa [146].

\* l'hétérogénéité des mucines purifiées a également été observée en microscopie électronique à propos d'autres sources tissulaires de mucines (mucines cervicales, gastriques et bronchiques humaines ) [197];

\* un autre exemple est fourni par les mucines tégumentaires de grenouille FIM-B1 et FIM-C1 dont la structure a été publiée respectivement par Probst et Coll. [177] et Hauser et Coll. [102] en 1992. Les deux molécules comportent plusieurs domaines répétitifs en cassettes, c'est à dire que chaque domaine est codé par plusieurs exons. L'hétérogénéité moléculaire de ces mucines est issue d'un épissage alternatif complexe aboutissant à diverses associations possibles;



\* enfin, après incorporation de N-acétylgalactosamine marquée, des peptides naissants de mucines ont été isolés à partir des polysomes de cellules gastriques humaines. Après électrophorèse, le marquage montre une hétérogénéité des précurseurs, de taille moléculaire faible : 5 à 70 kDa [242].

*b- hypothèse d'une hétérogénéité artéfactuelle*

Un certain nombre de résultats, à l'opposé des précédents relatent la caractérisation dans divers tissus mucipares d'un précurseur polypeptidique unique ou d'un nombre restreint de fractions d'apomucines, ce qui évidemment accrédi­terait plutôt l'hypothèse d'une hétérogénéité artéfactuelle des messagers. Il s'agit :

\* des travaux d'Eckhardt et coll., qui en 1987, caractérisent une apomucine de glande sous-maxillaire porcine d'une masse moléculaire de 96,5 kD [70];

\* les expériences de Byrd et coll., qui en 1989, détectent deux précurseurs polypeptidiques dans les cellules coliques respectivement de 70kDa et environ 400kDa [36];

\* la même année, Gum et coll. identifient une apomucine humaine unique exprimée dans les produits de traduction *in vitro* d'ARN polyA<sup>+</sup>, extraits d'intestin grêle et de côlon normaux, ainsi que de cellules tumorales coliques et d'une masse moléculaire de 162 kDa.

\* un précurseur polypeptidique de mucine gastrique de rat est caractérisé lors d'expériences de "pulse-chase" par Dekker et coll. en 1989 [61], estimé à une masse moléculaire de 300 kDa. Selon les échantillons analysés et les conditions électrophorétiques précises, ce précurseur apparaît dédoublé à des masses moléculaires très proches de 300kDa.

#### 4- les continuums décrits dans la littérature à propos d'autres protéines

##### *a- les continuums liés à un phénomène biologique*

\* l'apopolysialoglycoprotéine d'œuf de truite arc-en-ciel (PSGP), décrite par Sorimachi en 1988 [205]. Cette glycoprotéine est codée par de multiples ARNm, visibles en Northern blot sous la forme d'un continuum de 0,8 à 6 kb (**figure 16**). Ces ARNm sont issus de la transcription de plusieurs gènes apparentés, différant entre-eux par un nombre variable de domaines répétés de 39 nucléotides (13 acides aminés). Cette observation sera reprise pour tenter d'expliquer la diversité des apomucines [186].

\* l'IGF-I chez le rat décrit par Foyt et Coll. en 1991 [77]. Les ARNm de l'IGF-I de rat présentent en Northern blot un continuum de 0,8 à 7,5 kb (**figure 16**). Ces ARNm sont issus d'un gène unique composé de six exons et cinq introns, et qui s'étend sur plus de 80 kb. Ce gène, pour produire ce grand nombre d'ARNm, est transcrit d'une façon complexe associant un épissage alternatif à sept sites de démarrage de la transcription et à sept sites différents de polyadénylation. De plus, ces auteurs ont montré que tous ces ARNm sont traduits *in vivo*.

##### *b- les continuums reliés à un artéfact*

Les ARNm codant pour trois grandes protéines de mammifère présentent la caractéristique de montrer en Northern blot des profils complexes : deux de ces protéines sont contenues dans les cellules du muscle squelettique strié : la titine et la dystrophine. La troisième, l'apolipoprotéine B (ApoB), est présente dans le plasma associée aux chylomicrons, VLDL (very low density proteins) et aux LDL (low density proteins).

Dans les trois cas, il s'agit d'un ARNm de grande taille : 23 kb pour la titine [78, 211] et 14 kb pour la dystrophine et l'ApoB [175, 42], associé à un continuum (**figure 17**).

Cette observation accrédite l'hypothèse d'une sensibilité particulière des messagers de grande taille aux conditions usuelles d'extraction et de purification. Les techniques utilisées étaient "classiques" : la technique décrite par Chomczynski [48](titine), celle décrite par Chirgwin [46](dystrophine) et celle décrite par Auffray [3](ApoB).

### Hétérogénéité des transcrits de l'aposaloglycoprotéine [205]

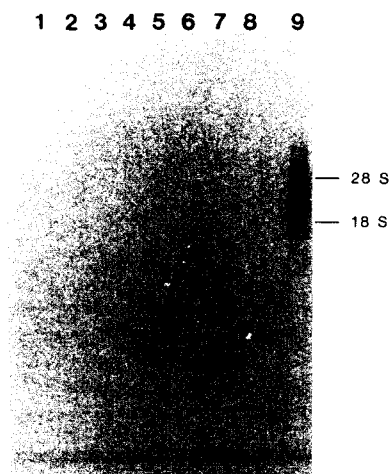


FIG. 3. Distribution of mRNA for apoPSGP in various rainbow trout organs. Forty ng of total RNA from each of various organs of rainbow trout were electrophoresed, blotted onto a nitrocellulose membrane, and hybridized with an R-probe containing 20 tandem repeats of 39 nucleotides in the R-domain (see Fig. 2B). Lanes: 1, liver; 2, testis; 3, liver; 4, heart; 5, spleen; 6, kidney; 7, brain; 8, mature ovary; 9, immature ovary (6 months before ovulation) (1-2, male; 3-9, female). Positions of the (28rS → 28S) and 18 S ribosomal RNA markers are shown.

### Hétérogénéité des transcrits de l'IGF-I [77]

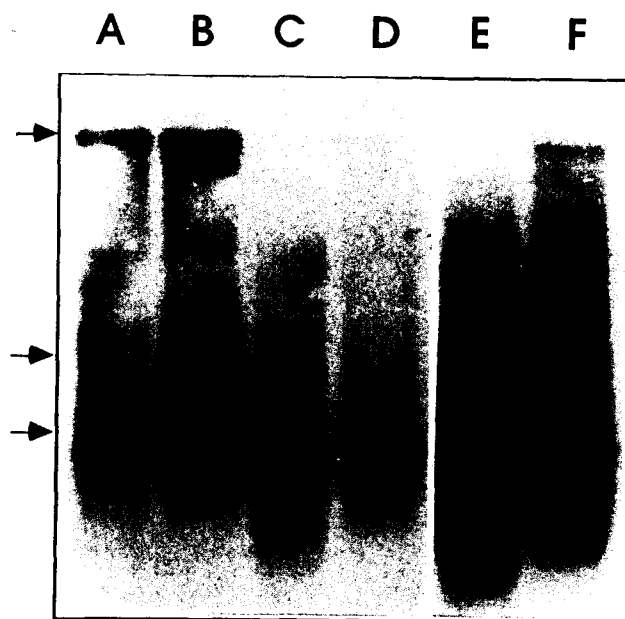


FIG. 5. Northern blot analysis of total, poly(A)<sup>+</sup>, cytoplasmic, and polysomal RNA fractions. The arrows on the left represent the position of the three IGF-I mRNA size classes. Lanes contain 10 μg of total RNA (A), 2.5 μg of poly(A)<sup>+</sup> RNA (B), 10 μg of cytoplasmic RNA (C and E), or 5 μg of polysomal RNA (D and F). Exposure times were 18 h (lanes A-D) or 4 days (lanes E and F).

FIGURE 16 : Exemples de signaux d'expression hétérogènes liés à une origine biologique.

### Profil hétérogène des transcrits de la titine [211]

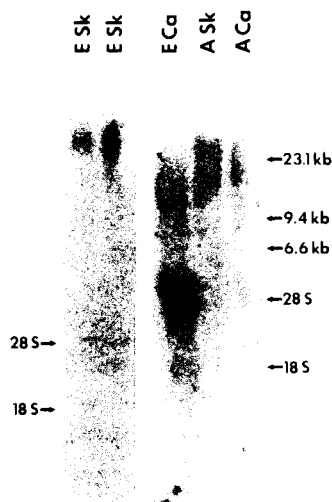


FIG. 5. Northern blots of chicken muscle RNA hybridized with titin cDNA probe. Total cellular RNA was isolated from skeletal and cardiac muscles by the guanidinium isothiocyanate/CsCl method (37), fractionated on 0.8% agarose gels, blotted, and hybridized with  $^{32}\text{P}$ -labeled TZ-6. *E Sk* and *E Ca*, 16-day embryonic chick skeletal and cardiac muscles, respectively; *A Sk* and *A Ca*, adult chicken skeletal and cardiac muscles, respectively. Migration positions of the ribosomal RNAs are indicated for both blots, and the positions of size markers are included for the blot on the right. The migration distance for the two gels differs because they were run at different times.

Les auteurs signalent qu'une espèce unique d'ARNm est nettement visible sur le Northern blot au dessus du petit continuum (mal perçu sur le document photo).

### Profil hétérogène des transcrits de l'Apo B [42]

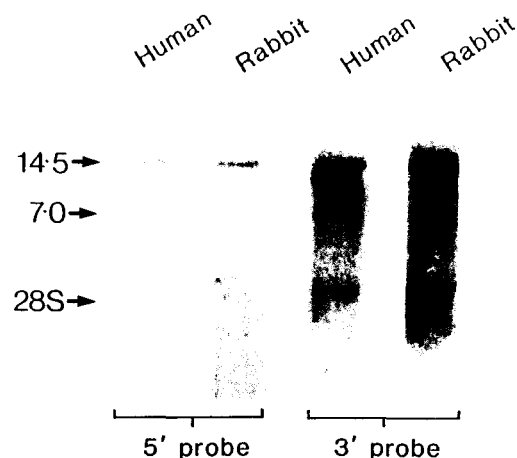


Figure 4. Northern Blot Analysis of Human and Rabbit Total Intestin RNA

Lanes 1 (human) and 2 (rabbit) were hybridized with a probe consist of the 5' 520 bp of apo-B100 cDNA. Lanes 3 (human) and 4 (rabb) were hybridized with a 2 kb fragment comprising the 3' end of the ap B100 cDNA. The 14.5 kb and 7 kb intestinal apo-B mRNAs and the position of 28S ribosomal RNA are arrowed.

### Profil hétérogène des transcrit de la dystrophine [175]

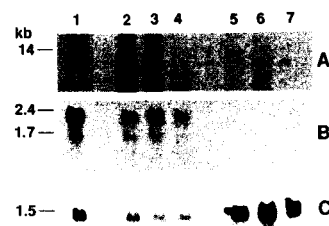


Fig. 1. Northern blot analysis of mouse RNAs. Samples (20  $\mu\text{g}$ ) of RNA from various tissues were isolated (9), separated by electrophoresis through 1% agarose/formaldehyde gels, transferred to GeneScreenPlus membranes (DuPont), and hybridized with cDNA probes essentially as described (12, 20). Autoradiograms from three successive hybridizations of the same blot with the indicated probes are shown. (A) Hybridization with Dmd cDNA XD-1 (9), (B) hybridization with mouse muscle  $\gamma$ -Phk cDNA Phk-2 (11), and (C) hybridization with mouse HPRT cDNA HPT5 (12). Lane 1, ICR skeletal muscle; lane 2, *mdx* skeletal muscle; lane 3, 467 skeletal muscle; lane 4, 551 skeletal muscle; lane 5, ICR brain; lane 6, *mdx* brain; and lane 7, ICR liver. Lane 1 in (A) and all lanes in (B) are from 24-hour exposures to film; the remaining lanes in (A) and those in (C) are from 72-hour exposures to film. Longer exposure of the blots in (B) reveals similar low levels of  $\gamma$ -Phk mRNA in ICR and *mdx* brain.

FIGURE 17 : Exemples de signaux d'expression hétérogènes liés à une cause artificielle.

En conclusion de ce chapitre, les éléments bibliographiques et les éléments de connaissance disponibles au laboratoire ne nous permettaient pas au démarrage de ce travail de privilégier une origine biologique ou une origine artéfactuelle à l'existence de l'hétérogénéité observée des ARNm de mucines. Néanmoins, l'abord de l'origine biologique nous paraissait techniquement plus facile à envisager en première intention.

## II STRATEGIE ADOPTÉE

Nous avons développé successivement quatre aspects méthodologiques :

**1- Recherche d'une relation entre hétérogénéité cellulaire et hétérogénéité du signal d'expression des apomucines** : comparaison de l'expression dans les tissus et les lignées cellulaires.

**2- Etude de la demi-vie des ARNm** exprimés par la lignée colique HT29-MTX cultivée en présence d'inhibiteurs de la transcription (actinomycine D) et de la traduction (cycloheximide).

Cette étude a pour objet de discriminer des ARNm biologiquement actifs et des ARNm catabolisés dans le modèle cellulaire.

**3- Etude des ARNm de mucines des fractions cellulaires polysomales, nucléaires et cytoplasmiques**

Cette étude s'attache par une autre approche à caractériser les ARNm actifs dans la traduction et à les différencier des précurseurs immatures ou des ARNm en cours de dégradation.

A l'issue de ces deux séries d'hypothèses en faveur d'une origine biologique de l'hétérogénéité des ARNm de mucines, nos résultats nous ont amenés à rechercher l'hypothèse de causes artéfactuelles. Deux aspects principaux ont été abordés :

**4- Recherche d'anomalie de comportements électrophorétiques liés à la structure répétitive et à la taille présumée grande des messagers :** utilisation de la technique d'électrophorèse en champ pulsé (méthodologie CHEF) appliquée à l'ARN.

**5- Réexamens des méthodes usuelles d'analyse des ARNm :** extraction, purification, électrophorèse, sélection des ARN poly(A<sup>+</sup>) , mesure de leur taille moléculaire, dans le but d'optimiser cette technique à des ARNm exceptionnellement grands.

## RÉSULTATS

---

## RÉSULTATS

---

### I RECHERCHE D'UNE RELATION ENTRE HETEROGENEITE CELLULAIRE ET HETEROGENEITE DU SIGNAL D'EXPRESSION DES APOMUCINES : COMPARAISON DE L'EXPRESSION DANS LES TISSUS ET DANS LES LIGNEES CELLULAIRES.

#### 1- MATERIEL BIOLOGIQUE

Il nous a été donné l'occasion d'hybrider un certain nombre de Northern blots avec des sondes ADNc d'apomucines, que ce soit dans notre pratique quotidienne au laboratoire ou dans le cadre de collaborations avec d'autres laboratoires français ou étrangers. Ceci implique donc que nous avons pu de ce fait, comparer les signaux d'hybridation donnés par des ARN préparés à partir de tissus ou de cellules mucipares variées, selon des protocoles variés eux aussi et en provenance de laboratoires différents.

Au laboratoire, il s'agissait de tissus ou de cellules en culture. Les tissus mucipares étaient des pièces chirurgicales de tumeurs digestives (estomac-côlon), des pièces chirurgicales d'intestin grêle ou de côlon provenant de malades atteints de la maladie de Crohn. Nous avons pu également bénéficier de matériels biologiques provenant de dons d'organes (trachée, bronche).

Il nous a été permis d'étudier le statut mucipare de pancréas témoin "normal" et de le comparer à celui des tumeurs pancréatiques. Le matériel immobilisé sur membrane provenait de Barcelone (F.X. Réal, I.M.I.N.).

A côté des tissus, nous avons pu également bénéficier de l'étude de l'expression des ARNm d'apomucines préparés à partir de cultures de lignées de cancers coliques ou pancréatiques :

- cellules HT29-MTX : Northern blots en provenance de Villejuif (A. Zweibaum, T. Lesuffleur, U. 178 INSERM), ou préparés au laboratoire (avec l'aide de G. Huet pour la culture);



- cellules HT29-5FU : Northern blots réalisés à Villejuif (A. Zweibaum, T. Lesuffleur, U. 178 INSERM);
- cellules HT29-S-B6 : Northern blots réalisés à Paris (E. Forgue-Lafitte, U. 55 INSERM).
- lignées pancréatiques : SK-PC-1, SK-PC-3, CAPAN 1, RWP-2, MIAPACA-2, MZPC-4, CFPAC-1, IMIN-PC-1, IMIN-PC-2. Ces préparations ont été réalisées à Barcelone (F.X. Réal, I.M.I.N.).

Il s'agissait également de cellules humaines non cancéreuses en culture primaire : de glandes bronchiques (J.M. Périni U. 377 INSERM, Lille), de cellules vésiculaires de sujets sains ou de sujets atteints de mucoviscidose (B. Clément, U. 456 INSERM, Rennes; C. Housset U. 402 INSERM, Paris).

Et enfin, de cellules humaines immortalisées : lignée MM39 établie à partir de glandes bronchiques (C. Figarella, laboratoire de biochimie de la Faculté de Médecine de Marseille).

Dans toutes ces études, l'objectif poursuivi était la recherche des variations d'expression des gènes d'apomucines en relation avec la tumorigénèse, par exemple, comparer zone saine/zone tumorale d'un tissu mucipare, comparer tissus "sains"/lignées cellulaires provenant d'un même organe. Il pouvait s'agir également de faire varier les conditions de culture de façon à étudier des caractères phénotypiques liés souvent à la différenciation cellulaire (rôle de facteurs de croissance, de drogues, de substances variées), ou enfin, d'étudier le statut mucipare en relation avec la mutation du gène CF.

Dans toutes ces situations, l'étude consistait finalement pour nous en une comparaison de signaux d'hybridation entre diverses préparations d'ARN : tissus/tissus, tissus/cellules ou cellules/cellules.

Les résultats, dont certains sont publiés [38, 139b, 182], n'ont pu être interprétés qu'en terme de positivité plus ou moins grande, ou de négativité, en raison d'une complexité liée à l'hétérogénéité du signal.

## B- RESULTATS

Toutes les préparations réalisées à partir de tissus (quelles que soient les méthodes utilisées; Matériel et Méthodes p150, 153, 154) ont donné de très longs continuums. Nous avons été tentés d'expliquer cette observation en faisant valoir l'hétérogénéité cellulaire des tissus mucipares : l'hétérogénéité des transcrits pouvaient être liée à la participation de plusieurs types cellulaires. Ceci avait été montré par la technique d'hybridation *in situ*.

Les préparations réalisées à partir de cellules ont montré des signaux plus variables :

- continuum homogène, long ou court;
- continuum homogène, précédé en haut du gel d'une bande discrète, fine et bien définie;
- continuum homogène, entrecoupé de quelques bandes discrètes de tailles très variables;
- bandes discrètes multiples dont certaines des grandes tailles, et d'autres de petites tailles.

## C- DISCUSSION

Nous avons alors été tentés d'imaginer que des cellules en culture expriment un répertoire de transcrits d'apomucines plus réduit qu'un tissu d'une part et que d'autre part des cellules du même type *in vivo*. Ainsi, une certaine "simplification" du signal pouvait exister dans le cas des cellules en culture.

Néanmoins, cette hypothèse s'est heurtée au manque de reproductibilité des signaux d'une expérience à l'autre. Cela ne remet pas en cause le résultat dans son aspect quantitatif mais dans son aspect qualitatif, c'est à dire l'aspect et l'étendue du signal.

Ceci a été particulièrement net à propos de l'étude de l'expression des gènes de mucines dans les cellules HT 29-MTX cultivées au laboratoire. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'un certain nombre de facteurs susceptibles d'influencer l'expression qualitative des apomucines étaient peut-être peu maîtrisables et standardisables dans la culture : qualité variable d'un lot à un autre de facteurs de croissance apportés par le sérum de veau foetal par exemple. Les

cultures réalisées sans sérum avec adjonction sélective de facteurs de croissance n'ont pas permis d'éclairer davantage le débat.

Nos conclusions ont donc été que s'il s'agissait d'un problème technologique artificiel, il n'était certes pas banal, dans la mesure où tous les laboratoires investis dans l'étude de l'expression des apomucines y étaient confrontés.

## **II ETUDE DE LA DEMI-VIE DES ARNm DE MUCINES DANS LES CELLULES HT 29-MTX.**

### **A- GENERALITES**

#### **1- Rôle du turnover des ARN dans le contrôle de l'expression des gènes**

La régulation de la synthèse des protéines est cruciale pour le fonctionnement des cellules. Par exemple, lorsque certains facteurs de croissance sont trop abondants, les cellules prolifèrent anormalement et deviennent cancéreuses.

La synthèse d'une protéine est proportionnelle à la quantité d'ARNm, pour contrôler cette synthèse, la cellule possède donc des moyens de modifier la quantité d'ARNm c'est à dire des moyens pour contrôler l'expression des gènes [151, 163]:

- 1- en contrôlant le taux de transcription du gène, c'est à dire la vitesse de synthèse des ARNm
- 2- en contrôlant la demi-vie des ARNm, c'est à dire la vitesse de dégradation de ces ARNm.

*La stabilité des ARNm joue donc un rôle important dans le contrôle de la régulation de l'expression d'un gène.*

La dégradation des ARN joue un rôle primordial au cours de différents processus illustrés par quelques exemples :

*a- au cours de l'embryogénèse et la différenciation cellulaire*

*\* embryogénèse :*

Un exemple est le stockage des ARNm maternels dans l'ovocyte qui serviront à la synthèse des protéines lors de l'embryogénèse. L'abondance des ARNm est maintenue par modulation de la transcription et du taux de dégradation [163].

*\*différenciation cellulaire*

Un exemple est la différenciation des cellules indifférenciées de la moelle osseuse en globules rouges : 95% des protéines intracellulaires du globule rouge est de l'hémoglobine pour le transport de l'oxygène. Au cours de leur différenciation, les globules rouges synthétisent en abondance de l'hémoglobine et simultanément réduisent la synthèse des autres protéines en déstabilisant les ARNm correspondants [163].

D'une manière générale, les cellules qui se différencient, interrompent la synthèse et réduisent l'activité des ARNm inutiles encore présents en les déstabilisant puis les détruisants.

*b- en réponse à des facteurs externes*

*\*Hormones:*

Un exemple classique est la stabilisation des ARNm par les hormones. Les hormones stéroïdes peuvent stimuler directement la fréquence de transcription d'un gène, or, souvent, cette induction au niveau transcriptionnel se double d'un effet post-transcriptionnel de stabilisation des ARNm de ce gène.

Les oestrogènes activent la transcription du gène de la vitellogénine et allongent considérablement la demi-vie des ARNm qui passe de 16 heures à 480 heures [31].

Les glucocorticoïdes et l'hormone thyroïdienne T3 augmentent la demi-vie de l'ARNm de l'hormone de croissance. Cette stabilisation s'accompagne d'un allongement de la queue poly (A) d'environ 100 résidus [163].

L'hormone de croissance stabilise l'ARNm de la prolactine.

*\*Réponse inflammatoire :*

La demi-vie des cytokines est beaucoup plus courte que la moyenne : 30 minutes à 2 heures. Leur stabilité augmente en réponse aux variations externes [72].

*\*Virus :*

De nombreux virus modifient considérablement la dégradation des ARNm. Ils se répliquent en détournant à leur profit la machinerie cellulaire et accélèrent la dégradation de la plupart des ARNm cellulaires, et ainsi, avec les ribosomes libres, ils synthétisent leurs propres ARNm [184].

*c- autorégulation de la dégradation*

Certaines protéines semblent effectuer une autorégulation, en modifiant la concentration de leurs propres ARNm.

*\* Histones*

Les histones augmentent la dégradation de leurs ARNm au stade du cycle de réplication cellulaire où la cellule n'a pas besoin d'histones [150].

Lorsque l'ADN est synthétisé au cours de la phase S, les gènes d'histones sont activés et les ARNm sont stables, de nombreuses histones sont formées mais la concentration en histones libres dans le cytoplasme reste constante car les protéines sont aussitôt associées à l'ADN.

A la fin de la phase S, lorsque la synthèse d'ADN se termine, le noyau "absorbe" moins d'histones : les histones en excès se fixeraient spécifiquement à leur propre ARNm entraînant ainsi leur dégradation.

*\* Tubulines*

Les tubulines sont des protéines qui s'agrègent en microtubules assurant la séparation des chromosomes au cours de la mitose. L'autorégulation de la tubuline s'effectuerait dès la synthèse de la protéine. Leur abondance est régulée de façon inversement proportionnelle à la concentration en monomères libres de tubulines dans le cytoplasme [240].

*\* Récepteur de la transferrine*

La transferrine est une protéine qui fixe le fer et permet la capture du fer par les cellules. L'abondance de l'ARNm du récepteur de la transferrine est inversement proportionnelle à la concentration intracellulaire en fer [153].

*d- cas particuliers des oncogènes, lymphokines et cytokines*

Les ARNm codant des protéines qui contrôlent le cycle cellulaire sont très instables, ils ont une demi-vie de 15 à 30 mn. L'instabilité constitutive de ces ARNm est liée à la présence d'une séquence de 30 à 80 nucléotides riches en A et U dans la région 3' non traduite. Cette instabilité est probablement essentielle à leur propre fonction puisque les protéines produites sont utiles pendant un temps limité au cours de la croissance [39, 191].

## **2- Les séquences de l'ARNm qui déterminent la demi-vie**

*Toutes les régions de l'ARNm peuvent affecter le turnover [163] :*

*a- la région 5' non traduite*

Un exemple est l'oncogène c-myc, 3 observations ont montré que la partie 5' détermine en partie la stabilité des ARNm :

- . l'exon 1 (non codant) est délété dans le rétrovirus possédant myc;
- . l'activation de c-myc en oncogène implique souvent une translocation qui supprime l'exon 1;

. certains de ces ARNm tronqués ont une stabilité supérieure.

La modification de la partie 5' et la stabilisation résultante de l'ARNm semblent conduire à une production trop importante de protéines c-myc par les cellules des ganglions lymphatiques; ces cellules se répliquent anormalement et deviennent cancéreuses. Ces différentes observations ont conduit à montrer l'existence d'un élément déstabilisant (de taille supérieure à 500 bases) contenu dans la région 5' non traduite.

#### *b- la région codante*

La séquence de la région codante influence la demi-vie des ARNm, le plus souvent parce qu'influençant la traduction. La présence de mutations non sens modifient significativement la stabilité des ARNm. Cette déstabilisation est probablement liée à la terminaison prématurée de la traduction. De plus, l'importance de cette déstabilisation varie en fonction de la position de la mutation : une mutation localisée près de l'extrémité C-terminale déstabilise beaucoup moins l'ARN qu'une mutation dans la partie N-terminale, une mutation localisée près du site normal d'arrêt de la traduction donne un ARNm presque aussi stable que l'ARNm non muté. Par exemple, une mutation non sens dans le gène de la globine  $\beta$  de patients atteints de  $\beta$ -thalassémie diminue la stabilité de l'ARNm d'un facteur 40.

Les caractéristiques de la région codante modifient la stabilité des ARNm, mais on ignore encore par quel mécanisme.

#### *c- la région 3' non traduite*

On a comparé les demi-vies d'ARNm apparentés : la globine  $\beta$  et la globine  $\delta$  qui sont synthétisées dans les mêmes cellules. L'ARNm de la globine  $\delta$  est dégradé quatre fois plus vite que l'ARNm de la globine  $\beta$ , or ces deux ARN ont des régions 5' non traduites et codantes très proches (92% d'homologie), la principale différence se trouve dans leur région 3' (50% d'homologie).

Des expériences utilisant des cellules transfectées avec des gènes chimères ont montré que la région 3'UTR peut influencer le turnover. En introduisant dans des cellules des gènes hybrides, la vitesse de dégradation des ARNm hybrides dépend de l'origine du segment 3'

présent : quand le segment 3' provient d'un ARNm stable, l'ARNm hybride est stable, quand le segment 3' provient d'un ARNm instable, l'ARNm est instable.

En fait, on a découvert que la stabilité de certains ARNm dépend de la proportion de deux nucléotides dans le segment 3', l'adénine et l'uracile : plus la proportion de ces nucléotides est élevée, plus l'ARNm est dégradé rapidement.

Une séquence spécifique riche en A et U a été trouvée dans de nombreux ARNm instables, en particulier ceux qui codent pour les proto-oncogènes. On pense que ces séquences sont le site de fixation de facteurs agissant en *trans* qui modulent le turn-over.

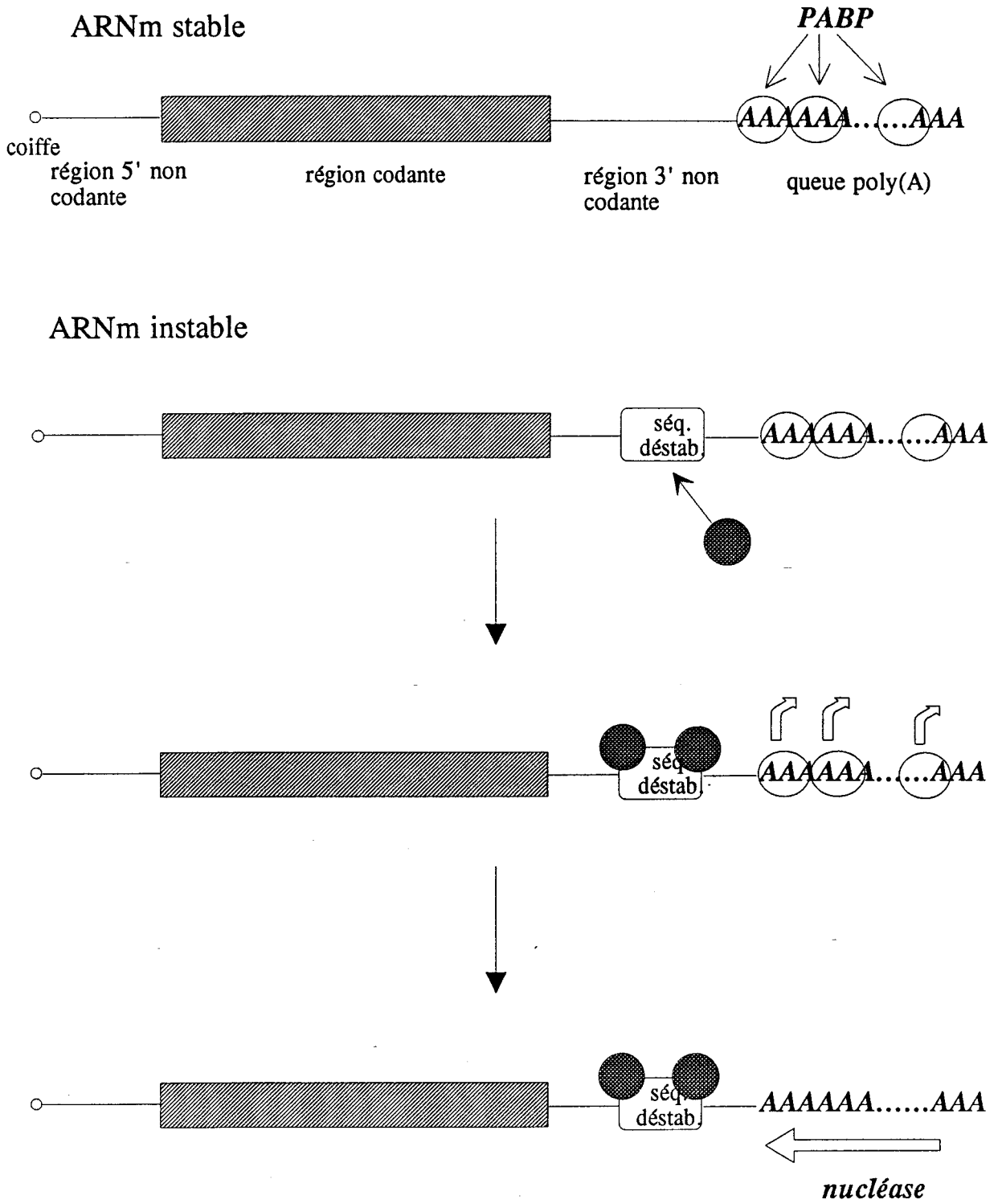
#### *d- la queue poly(A)*

Les ARNm sont principalement dégradés par leurs extrémités, c'est à dire par des exonucléases. Du côté 5', la présence de la coiffe limite beaucoup la dégradation. Les exonucléases (3'-5') vont commencer la dégradation en grignotant la queue poly(A). Cette dégradation peut être freinée par la formation d'un complexe poly(A) / protéines particulières dites PABP ( Poly(A) Binding Protein), chaque PABP se lie à 27 nucléotides. En étudiant le processus de dégradation de plusieurs ARNm, on observe que leur stabilité chute brusquement lorsque le nombre de A devient inférieur à une trentaine, dans ce cas, il y n'a plus de protéine PABP fixée et la dégradation par les exonucléases peut progresser beaucoup plus vite.

On a aussi observé que la stabilisation de certains ARNm est associée à l'allongement de la queue poly(A). Ainsi, la stabilisation de l'ARNm de l'hormone de croissance par les glucocorticoïdes s'accompagne d'un allongement de son poly(A) d'une centaine de résidus (voir ref 259 du ln).

Les protéines PABP stabiliseraient l'ARNm en protégeant la queue poly(A) contre les ribonucléases. Il serait important de savoir pourquoi les protéines PABP ne protègent pas tous les ARN polyadénylés de la même façon. On suppose que les trois autres segments de l'ARN (région 5' non traduite, partie codante, région 3' non traduite) modifient la fixation de la protéine sur la queue poly(A), ils modifient donc aussi la protection de l'ARNm contre les ribonucléases (**figure 18**).





**FIGURE 18 :** Lien hypothétique entre les séquences déstabilisatrices des régions 3' non codantes et les protéines stabilisatrices PABP de la queue poly(A) [20].

## B- METHODOLOGIE

Dans le but de démontrer le rôle possible d'un turnover extrêmement rapide des ARNm de mucines dans l'obtention du continuum, nous avons étudié la demi-vie de ces ARNm dans les cellules HT 29-MTX.

Dans cette lignée mucipare, provenant d'un cancer du côlon, les gènes d'apomucines exprimés sont MUC 1, MUC 2, MUC 3, MUC 5AC et MUC 5B. Les ARN de MUC 4 et MUC 6 sont absents [139b].

De plus, dans cette étude, il avait été montré que les ARNm des différentes apomucines apparaissent à partir du 7<sup>ème</sup> jours de culture, le maximum d'expression étant observé entre le 14<sup>ème</sup> et le 17<sup>ème</sup> jour de culture.

Les étapes de cette étude ont été fixées en référence à des protocoles déjà décrits [57, 162] :

\*après 16 jours de culture, un pool de cellules est récupéré, il constituera notre témoin;

\*de l'actinomycine D (Act D) est ajoutée au milieu. Au bout de 3 et 9 heures (dans l'expérience 1) et au bout de 3, 6, 9, 16 et 24 heures d'incubation (dans l'expérience 2), les cellules sont récupérées, l'ARN total du pool témoin et du pool Act D est extrait et analysé par Northern et Dot blots.

(les détails méthodologiques sont indiqués dans le chapitre matériel et méthodes).

L'actinomycine D se lie à l'ADN, bloque le mouvement de l'ARN polymérase et donc inhibe la synthèse de l'ARN.

Nous avons reproduit en parallèle cette expérience, en ajoutant une étape de pré-incubation de 2 heures en présence de cycloheximide, avant l'addition d'actinomycine D. La cycloheximide bloque la réaction de translocation des ribosomes et donc empêche la traduction.

Nous attendions de cette étude de pouvoir ainsi visualiser au cours du temps le processus de dégradation des ARNm de mucines, c'est à dire de voir apparaître des produits intermédiaires du catabolisme des ARNm.

En inhibant simultanément la transcription et la traduction, nous voulions mettre en évidence une éventuelle intervention de protéines stabilisatrices ou au contraire déstabilisatrices des ARNm.

Nous envisagions alors deux hypothèses :

- un turnover rapide est responsable du continuum. Dans ce cas, le blocage de la transcription nous permet de visualiser au cours du temps, le processus de dégradation des ARN. En comparant les profils d'expression des temps les plus longs à ceux des temps les plus courts, le continuum se réduirait alors rapidement dans les petites tailles, alors que parallèlement le signal correspondant aux grandes tailles disparaîtrait.

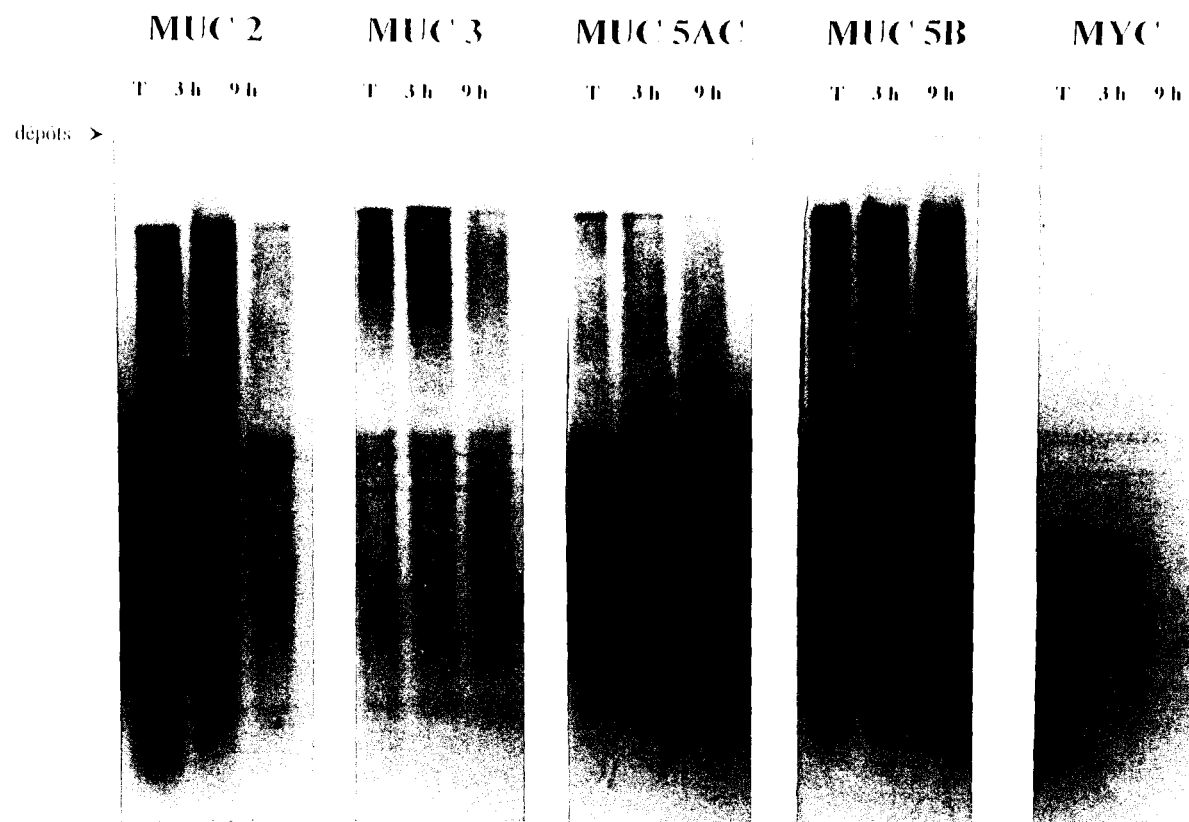
- l'obtention du continuum est indépendante d'un turnover rapide. Dans ce cas, on observerait, au cours du temps, une diminution homogène de l'intensité du continuum sans modification de sa qualité.

## C- RESULTATS

Une première expérience réalisée avec 2 temps de contact avec de l'actinomycine D (3 et 9 heures) a montré à la fois à T0, T3h et T9h, le même signal qualitatif associant un transcrite de haute taille et un continuum, et ceci avec l'ensemble des sondes étudiées : MUC 2, MUC 3, MUC 5AC et MUC 5B.

La taille moléculaire du transcrite majeur et l'étendue du continuum est identique dans les 3 expériences et conforme à celle déjà publiée [139b].

Une diminution homogène d'intensité du signal est observée à T9h (**figure 19**).



**FIGURE 19 :** *Culture des cellules HT 29-MTX en présence d'actinomycine D (3 et 9 heures) : évolution du profil d'expression des ARNm de mucines en fonction du temps.*

Cette expérience nous permet de répondre à la question du turnover des ARNm d'apomucines. Il apparaissait peu probable que cette hypothèse permette d'expliquer l'hétérogénéité apparente des ARNm d'apomucines.

Pour vérifier ce résultat, il nous fallait le confirmer sur d'autres expériences et allonger le temps de contact avec l'actinomycine D pour calculer la demi-vie.

Une deuxième expérience a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales mais étudiant cette fois-ci, 5 temps de contact de la culture avec de l'actinomycine D (3h, 6h, 9h, 16h et 24h).

Les Northern blots obtenus (**figure 20**) nous ont permis d'observer de la même façon une diminution d'intensité du signal progressive avec le temps, sans changement de répartition du signal entre masses moléculaires élevées et faibles.

Néanmoins, dans cette expérience, le transcrit majeur était beaucoup plus faible dans tous les échantillons.

Ce résultat confirme le précédent et objective une demi-vie élevée des ARNm en terme de comparaison des signaux.

Cependant, le manque de reproductibilité dans la présence du transcrit majeur nous interrogeait et nous empêchait d'effectuer sur les Northern blots une analyse quantitative.

L'analyse quantitative a été réalisée par la technique de dot blot, en utilisant un PhosphorImager 445SI (Molecular Dynamics), chaque préparation ayant été analysée 3 fois. L'intensité des signaux d'hybridation détectée par l'appareil a été rapportée à celle donnée par l'ARNr 28S qui est représentative de la quantité réelle d'ARN transférée pour chaque dépôt sur la membrane.

L'ARNm de référence quantitative ne pouvait être la  $\beta$ -actine dont la demi-vie est trop brève par rapport à celle des apomucines.

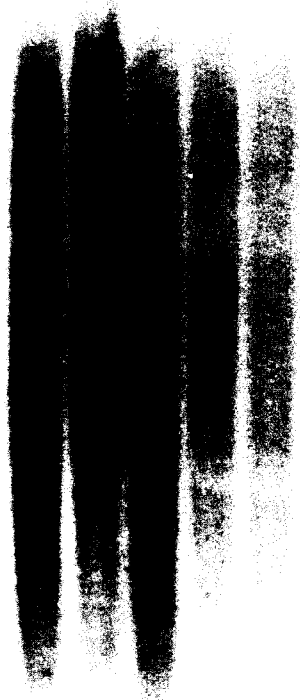
Le calcul de la demi-vie utilise le rapport signal du témoin (culture sans actinomycine D) sur le signal de l'ARN ribosomal 28 S comme 100% de référence.

La courbe de demi-vie établie pour chacune des apomucines étudiée est présentée sur la **figure 21**.

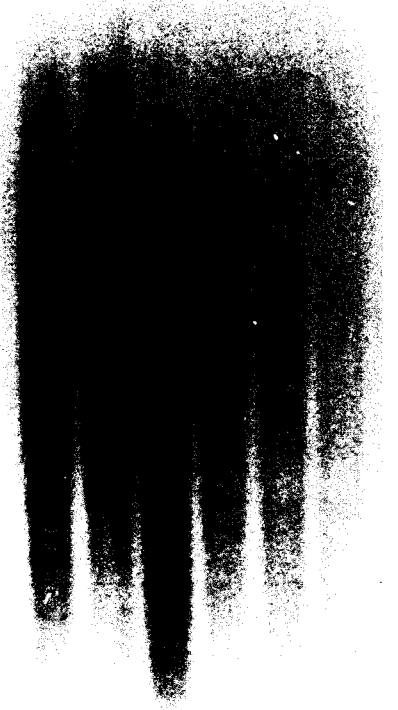
T 3h 6h 9h 16h 24h

T 3h 6h 9h 16h 24h

MUC 2



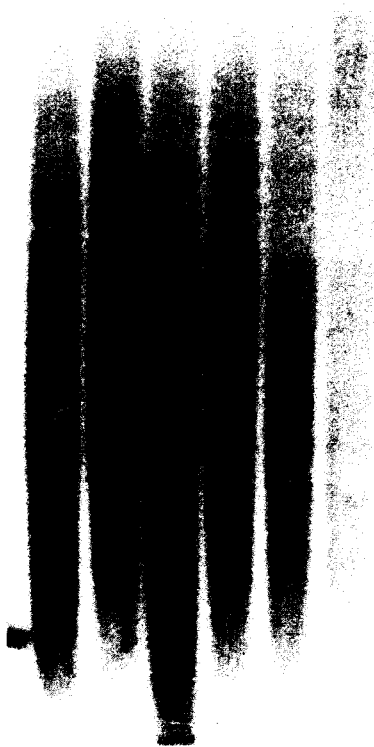
MUC 3



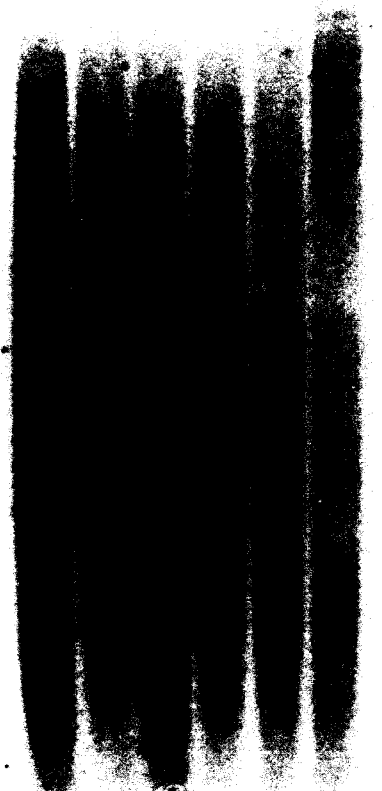
T 3h 6h 9h 16h 24h

T 3h 6h 9h 16h 24h

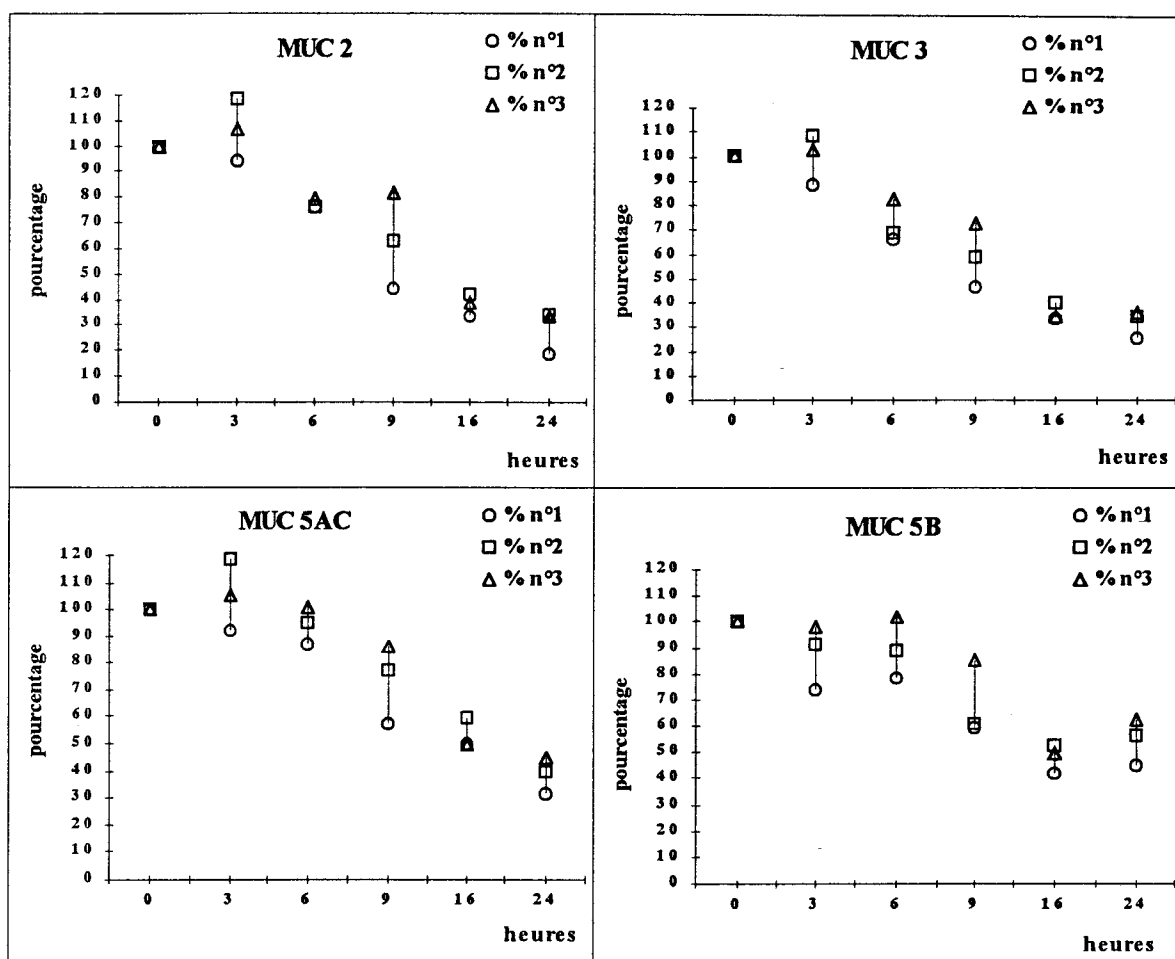
MUC 5AC



MUC 5B



**FIGURE 20 :** Culture des cellules HT 29-MTX en présence d'actinomycine D (3, 6, 9, 16 et 24 heures) : évolution du profil d'expression des ARNm de mucines en fonction du temps



**FIGURE 21 :** *Etude de la stabilité des ARNm des gènes MUC 2, MUC 3, MUC 5AC et MUC 5B exprimés par la lignée HT 29-MTX en présence d'actinomycine D : calcul de la demi-vie.*

Si l'on se réfère à la moyenne des 3 valeurs obtenues pour chacun des temps étudiés, le point 50%, c'est à dire la valeur de la demi-vie est lue à 13 heures pour MUC 2, 13 heures pour MUC 3, 16 heures pour MUC 5AC et 16 heures pour MUC 5B.

L'efficacité de la préparation d'actinomycine D utilisée a été vérifiée grâce à l'étude du signal donné par la sonde c-myc, cet oncogène étant exprimé dans la lignée HT 29-MTX. Le signal n'a été perçu que dans la préparation cellulaire témoin, ceci est en accord avec sa demi-vie courte d'environ 30 mn [57].

L'étude de la demi-vie des apomucines réalisée en associant dans le milieu de culture l'actinomycine D et la cycloheximide a montré des résultats identiques à ceux obtenus précédemment (**figure 22**).

Ceci nous permet de penser que l'influence de la présence stabilisatrice ou déstabilisatrice de protéines n'est pas un élément essentiel capable de générer le phénomène de continuum.

Une autre analyse a pu être effectuée, l'étude de l'expression du gène MUC 1. La demi-vie calculée en dot-blot est de 15 heures (**figure 23B**).

L'étude de la demi-vie de MUC 1 a pu être également complétée par l'analyse de Northern blot (**figure 23A**). En effet, l'apomucine MUC 1 est exprimée dans la lignée HT 29-MTX sous la forme de 2 ARNm de taille moléculaire 4 kb et 6,5 kb.

L'analyse du rapport d'intensité des 2 transcrits aux différents temps a montré une constance parfaite indiquant donc que ces 2 transcrits ont la même demi-vie.



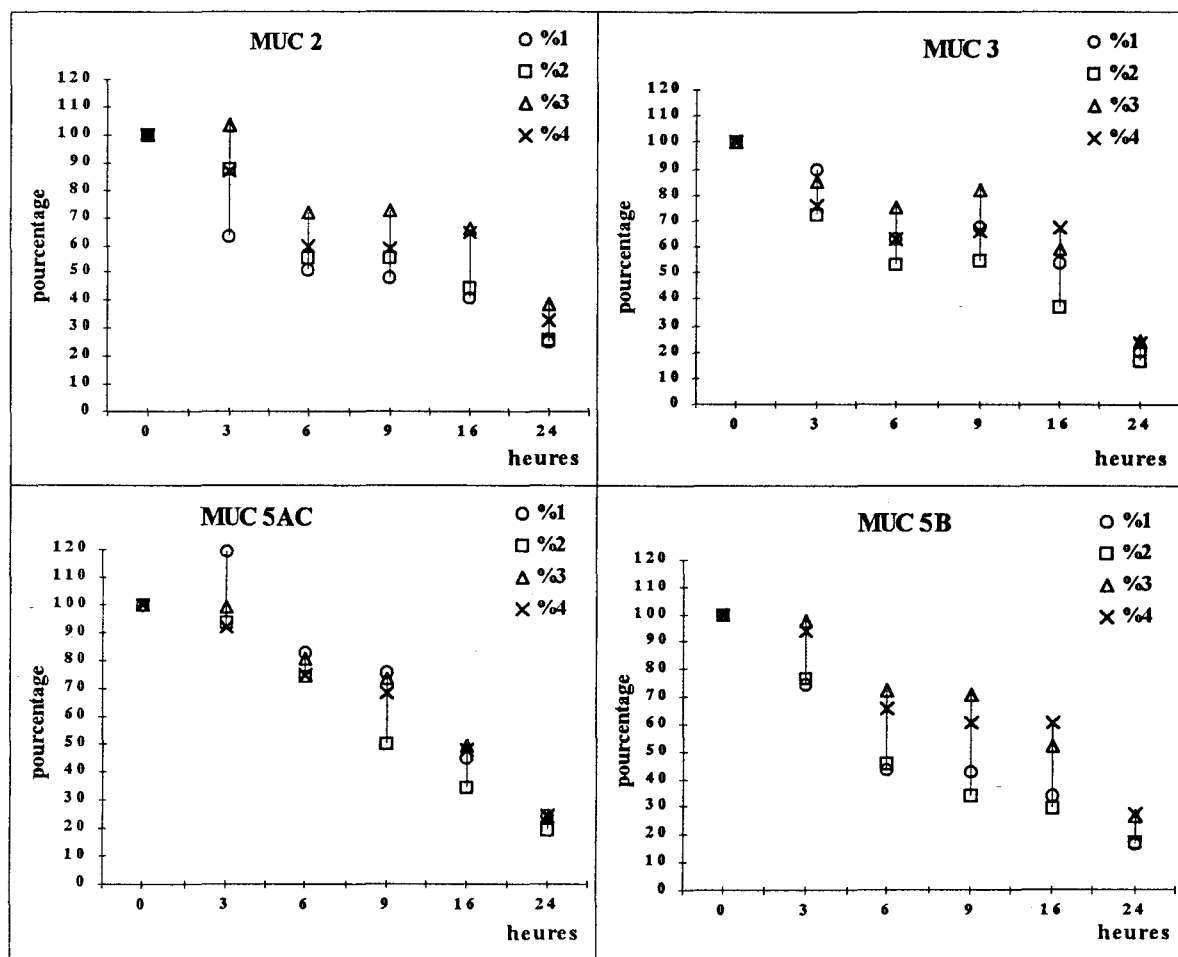
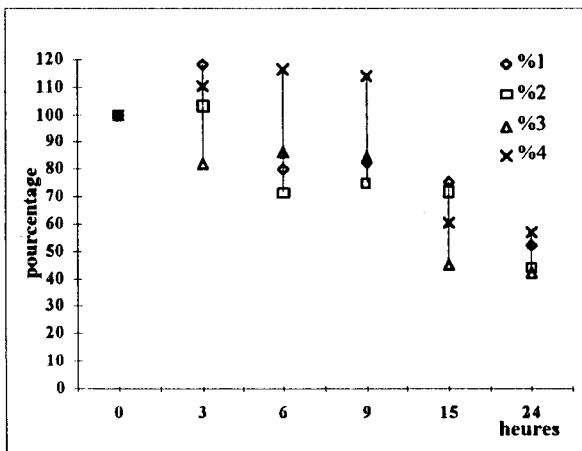


FIGURE 22 : Etude de la stabilité des ARNm des gènes MUC 2, MUC 3, MUC 5AC et MUC 5B exprimés par la lignée HT 29-MTX en présence d'actinomycine D et de cycloheximide : calcul de la demi-vie.

T 3h 6h 9h 16h 24h



**FIGURE 23 A :** Culture de cellules HT 29-MTX en présence d'actinomycine D (3, 6, 9, 16 et 24 heures) : évolution du profil d'expression des ARNm du gène MUC 1 en fonction du temps.



**FIGURE 23 B :** Etude de la stabilité des ARNm du gène MUC 1 exprimés par la lignée HT 29-MTX en présence d'actinomycine D : calcul de la demi-vie.

## D- DISCUSSION

L'étude du turnover des ARNm d'apomucines a montré une grande stabilité de ces ARNm avec une demi-vie très proche pour toutes les apomucines étudiées, que ce soit MUC 2, MUC 3, MUC 5AC ou MUC 5B (demi-vie d'environ 13 ou 16 heures) ou MUC 1 (demi-vie d'environ 15 heures).

Cette valeur obtenue est tout à fait en accord avec la demi-vie moyenne des ARNm comprise généralement entre 10 et 20 heures [163].

Dans la littérature, les ARNm réputés instables sont ceux codant les lymphokines, les cytokines et les proto-oncogènes et dont la demi-vie est inférieure à 1 heure [51, 163].

Nous avons aussi étudié la stabilité des ARNm de MUC 1 de façon à comparer le statut de cette apomucine possédant 2 transcrits bien définis à celui des autres apomucines. Cette expérience nous permettait également une comparaison avec la littérature. En effet, une seule étude relatant la mesure de la demi-vie de MUC 1 a été réalisée, utilisant les cellules MCF-7 comme modèle [1].

Dans ces cellules, l'expression de MUC 1 est visualisée sous la forme de 2 transcrits de taille 4,5 et 7 kb.

Ce travail conclut à des demi-vies différentes des 2 transcrits, 11 heures pour le transcrit de 7 kb et 26 heures pour le transcrit de 4,5 kb. Ce résultat est surprenant puisque les 2 transcrits visibles en Northern blots correspondent aux variations alléliques de type V.N.T.R. Par ailleurs, il nous semble que le transcrit de 7 kb puisse être sous-estimé en raison de sa grande taille, ce qui peut se traduire par une demi-vie diminuée.

On ne peut néanmoins pas exclure que la demi-vie de MUC 1 puisse varier d'une cellule tumorale mammaire (MCF-7) à une cellule tumorale colique (HT 29-MTX).

Nous concluons donc de ce travail que l'hétérogénéité de signal des ARNm de mucines n'est pas en relation avec une instabilité particulière à ces transcrits.

Nous observons également une demi-vie très proche pour tous les ARNm des apomucines étudiées, qu'elles correspondent à des mucines membranaires ou sécrétées et quelle que soit leur structure ou la localisation chromosomique des gènes.

### **III PREPARATION DE L'ARN NUCLEAIRE, POLYSOMAL ET CYTOPLASMIQUE**

#### **A- GÉNÉRALITÉS**

Au cours de ce travail, nous avons cherché à savoir si le continuum d'ARNm exprimés par les apomucines correspondait à un mélange d'ARN immatures de grande taille, d'ARN biologiquement actifs dans la traduction et d'ARN en cours de dégradation, de plus petite taille.

Nous avons donc préparé un fractionnement cellulaire de muqueuse colique humaine nous permettant d'analyser séparément l'ARN nucléaire, l'ARN polysomal et l'ARN cytoplasmique.

#### **B- MÉTHODOLOGIE**

Cette mise au point technique s'est avérée très délicate. Dans la littérature, chaque protocole nécessite d'être adapté précisément au tissu étudié. De plus, le nombre d'étapes entre l'homogénéisation du tissu et la réalisation du Northern blot est important, de nombreuses précautions doivent être prises pour préserver la qualité de l'ARN. C'est pourquoi, toutes les expériences ont été optimisées de façon à raccourcir au maximum les temps analytiques et

éviter d'interrompre la chaîne du froid (toutes les manipulations ont été réalisées en chambre froide).

Après confrontation de nombreux protocoles, nous en avons sélectionné deux [242, 131], le premier parce qu'il décrivait la préparation de polysomes à partir de muqueuse gastrique de rat, tissu proche du nôtre; l'autre parce qu'il décrivait précisément l'obtention des 3 fractions nucléaire, polysomal et cytoplasmique, alors que le plus souvent dans la littérature, seule la fraction polysomale est étudiée.

Au cours des premiers essais, nous avons été confrontés à des dégradations massives de l'ARN contenu dans les 3 fractions. Une grande partie de ce travail a consisté à rechercher les inhibiteurs de RNases les mieux adaptés à notre étude. Nous avons testé successivement et à des concentrations variables, la bentonite, l'héparine (de différentes marques), le  $\beta$ -mercaptoéthanol et la RNasine (naturelle et recombinante). Des associations diverses ont été expérimentées, le meilleur résultat a été obtenu en associant du  $\beta$ -mercaptoéthanol (à faible concentration) et de la RNasine recombinante (1 U/ $\mu$ l).

Le protocole finalement mis au point comporte les grandes étapes suivantes :

- homogénéisation du tissu à l'aide d'un Potter-Elvehjem qui entraîne l'éclatement des cellules, cependant la structure nucléaire est maintenue;
- centrifugation qui permet de récupérer les noyaux : le culot de noyaux (et de gros débris cellulaires) est récupéré pour l'extraction de l'ARN nucléaire;
- récupération du surnageant et dépôt sur un coussin de sucrose. Après ultracentrifugation, le culot contient l'ARN polysomal et le surnageant l'ARN cytoplasmique. Enfin, l'ARN est extrait de ces 2 fractions.

L'intégrité de l'ARN des 3 fractions est contrôlée en Northern blot à l'aide de la sonde  $\beta$ -actine.

Une vingtaine d'expérimentations modifiant peu à peu les paramètres ont été réalisées d'abord sur de la muqueuse trachéale de porc, et enfin, lorsque le témoin d'intégrité des ARNm a été satisfaisant, sur de la muqueuse colique.

Nous avons pu proposer un protocole précis optimisé pour ce matériel biologique décrit précisément dans la partie "Matériel et Méthodes".

## C- RESULTATS

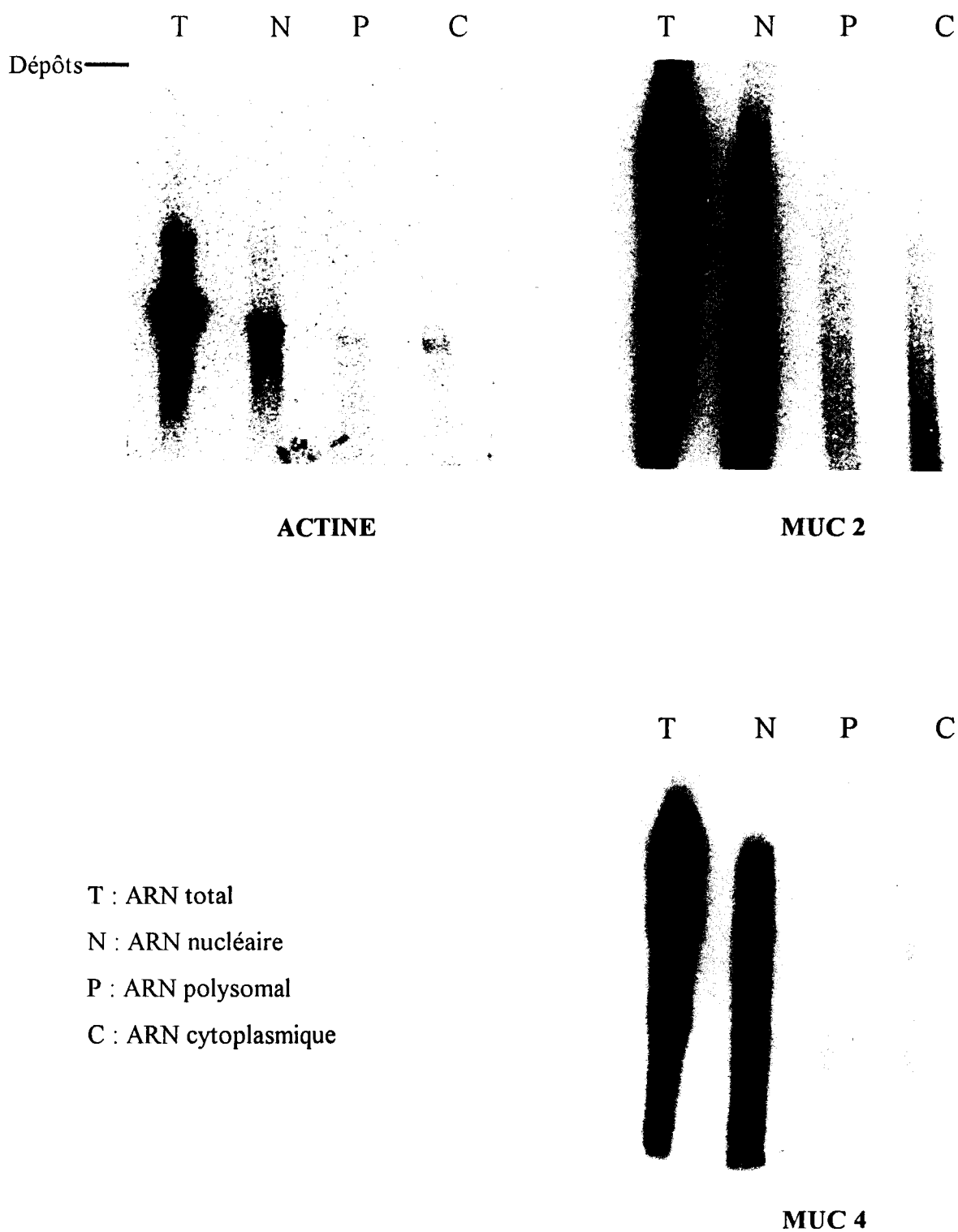
Dans toutes les expériences réalisées, même lorsque la qualité du signal  $\beta$ -actine a été considérée comme très satisfaisante au regard de ce qui pouvait être présenté dans la littérature (**figure 24**), le signal hétérogène précédemment observé à propos des apomucines humaines étudiées en Northern blot a été retrouvé à l'identique dans toutes les préparations, c'est à dire dans les fractions "ARN nucléaire", "ARN polysomal" et "ARN cytoplasmique". L'étendue du signal était comparable à celle observée dans le témoin "ARN total" pour chaque préparation.

Il apparaissait donc impossible de discriminer dans le continuum de transcrits d'apomucines, les transcrits biologiquement actifs dans la traduction, eux-mêmes apparaissant aussi hétérogènes que ceux des autres fractions.

Nous avons comparé nos résultats avec ceux obtenus par Foyt et Coll. [77], à propos d'un modèle intéressant, celui des transcrits multiples de l'IGF-I. En effet, ces transcrits multiples issus d'épissages alternatifs complexes conjugués à des sites multiples de départ de transcription et de polyadénylation, donnent en Northern blot l'image d'un continuum compris entre 0,8 et 7,5 kb (**figure 16**). Dans ce travail, une comparaison en Northern blot de la fraction d'ARN total aux fractions d'ARN polysomal et cytoplasmique a été réalisée également. Cette étude montre une différence de répartition quantitative des différents transcrits entre les fractions. L'espèce de plus grande taille moléculaire est peu visible dans la fraction polysomale, les espèces ayant une région 3' non codante courte sont très représentées dans la fraction polysomale, alors que ceux ayant une région 3' non codante longue sont peu présents.

## D- DISCUSSION

Les informations apportées par cette série d'expériences sur les ARNm d'apomucines sont tout à fait en accord avec celles découlant de l'étude de la demi-vie.



**FIGURE 24** : *Analyse par Northern blot des ARN d'apomucines correspondant au fractionnement cellulaire de muqueuse colique humaine.*

Les ARNm d'apomucines apparaissent stables et en tout cas, il est impossible de discriminer par la taille, les transcrits "efficaces" dans la traduction de la fraction polysomale, d'autres transcrits, immatures stockés en réserve dans le noyau ou de transcrits dégradés susceptibles d'être retrouvés dans la fraction cytoplasmique. L'hétérogénéité observée en Northern blot semble donc totalement indépendante du turnover.

Etant donnée la difficulté technologique à réaliser dans des conditions d'intégrité parfaite le fractionnement cellulaire des ARNm, on ne peut exclure que le continuum observé pour les apomucines ne reflète pas, pour une part, une possible dégradation, même si le signal actine apparaît correct. Néanmoins, lorsque l'on compare le profil du continuum dans la fraction ARN total à celui des différentes fractions cellulaires, on observe pour un signal de même intensité, la même étendue, ce qui nous laisse penser que les fractions cellulaires n'ont pas subi de dégradation massive.

Dans notre cas, la parfaite homogénéité des résultats dans les différentes fractions permet de penser qu'aucune raison fonctionnelle, visible en étudiant la stabilité ou la taille des messagers, n'est associée à cette notion d'hétérogénéité.

*Nous avons donc recherché ensuite des causes artéfactuelles à l'hétérogénéité apparente des ARNm d'apomucines.*



## **IV RECHERCHE D'ANOMALIES DE MIGRATION AU COURS DE L'ELECTROPHORESE : ADAPTATION DE LA TECHNIQUE D'ELECTROPHORESE EN CHAMPS PULSES AUX ARN.**

Envisageant maintenant des causes artéfactuelles à l'hétérogénéité observée après électrophorèse des transcrits d'apomucines, deux propriétés spécifiques aux mucines nous ont interpellée :

- l'existence de longs domaines répétitifs susceptibles de perturber le comportement électrophorétique des ARN;
- une taille moléculaire supposée élevée des ARN des apomucines MUC 2 à MUC 6 , en rapport avec la biosynthèse de macromolécules.

Ces deux hypothèses nous ont intéressés dans la mesure où nous avons pu remarquer que des profils d'expression différents pouvaient être obtenus à partir d'une même préparation d'ARN, simplement en faisant varier le voltage et le temps d'électrophorèse. Ceci se traduisait par l'individualisation plus ou moins nette de bandes discrètes dans le profil et une étendue variable du continuum, et ceci, quel que soit le système électrophorétique retenu, utilisant le glyoxal ou la formamide comme agent dénaturant (Matériel et Méthodes p154, 155).

Nous avons donc penser étudier la séparation des ARN de mucines dans un tout autre système électrophorétique, si possible performant pour analyser de grandes tailles moléculaires. Ceci nous a amené à utiliser la technique d'électrophorèse en champs pulsés, jusque là réservée à l'analyse de grands fragments d'ADN.

### **A- GÉNÉRALITÉS**

Les techniques classiques d'électrophorèse sont fondées sur l'effet tamisant du support solide utilisé (gel d'agarose), les molécules d'ADN ou ARN sont d'autant plus freinées dans leur migration qu'elles sont plus grandes. La distance de migration de la molécule est donc proportionnelle à sa taille. Avec une concentration d'agarose d'environ 1%, la porosité du gel est inférieure à un micron, alors que la longueur d'une molécule d'ADN de 50 kb complètement

étirée est d'environ 18 microns. Au moment où le champ électrique est établi, les gros fragments d'ADN (d'une taille supérieure à 20 kb ) sont capables de subir une certaine déformation leur permettant de pénétrer par "reptation" dans les pores du gel. Celle ci ne permet qu'une progression très lente et surtout non proportionnelle à la taille du fragment. Les tailles des fragments qu'il est possible de séparer en électrophorèse classique sont donc comprises entre 0,5 et 20kb.

L'électrophorèse en champs pulsés (PFGE) a été développée par Schwartz et Cantor [193] en 1984 afin de séparer les grands fragments d'ADN (supérieures à 50kb) que l'électrophorèse classique ne permet pas de résoudre.

Le principe de l'électrophorèse en champs pulsés consiste non pas à changer la nature du support (agarose) mais à changer la nature du champ électrique : alors que dans l'électrophorèse classique, le champ électrique unidirectionnel est continu, dans l'électrophorèse en champs pulsés, deux champs électriques orientés dans deux directions différentes sont appliqués de façon alternative. A chaque changement d'orientation du champ électrique, la molécule d'ADN doit se réorienter parallèlement au nouveau champ électrique. La vitesse de réorientation de la molécule est directement proportionnelle à sa taille. Lorsque le champ électrique est rétabli dans son sens initial, la molécule doit se réorienter à nouveau. L'addition de ces temps de réorientation provoquent un retardement de la migration de la molécule, ce retardement est proportionnel à sa taille. La vitesse de migration étant la même pour toutes les molécules de grandes tailles, leur distance de migration dépendra de leur vitesse de réorientation et donc de leur taille.

La durée d'application du champ électrique dans une direction donnée (la durée du pulse) a donc deux composantes : l'une de réorientation, au cours de laquelle on peut considérer que la molécule ne migre pas, et l'autre de migration proprement dite. Le choix du temps de pulse est donc important pour séparer les molécules d'ADN désirées. On règle ce temps de pulse en fonction de la taille de la molécule à séparer, ce temps sera d'autant plus long que la taille des molécules à séparer est grande.

## B- MÉTHODOLOGIE

Cette technique a été décrite exclusivement pour l'ADN, c'est pourquoi cette partie de travail de thèse a nécessité une adaptation, surtout dans son étape pré-analytique de préparation de l'échantillon.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le groupe de J.P. Kerkaert de l'unité INSERM n° 124.

Parmi les différents types d'électrophorèse en champs pulsés, nous avons utilisé la technique CHEF (Contour-clamped Homogeneous Electric Field). Le champ électrique est homogène, six groupes de quatre électrodes sont disposées hexagonalement créant ainsi des angles de réorientation de 120°. Une séparation proportionnelle à la taille est obtenue sur la quasi-totalité de la migration.

La source d'ADN dans le cas du PFGE est constituée des cellules elles-mêmes (leucocytes circulants du sang ou cellules en culture), de façon à éviter les coupures mécaniques de l'ADN par les manipulations.

Dans notre cas précis, nous voulions travailler de façon analogue en utilisant comme source d'ARN les cellules HT 29-MTX, en imaginant un protocole de purification de l'ARN à partir des cellules incluses dans le bloc d'agarose et qui associait protéinase K, Dnase-RNase free et inhibiteurs de RNases.

Nous ne sommes pas parvenus à obtenir une purification suffisante de l'ARN lui permettant de sortir des cellules sous l'action du champ électrique (rétention de l'ARN à des tailles élevées signifiant la contamination par de l'ADN).

Nous avons donc analysé par cette technique, des préparations d'ARN réalisées selon la méthode de référence [Matériel et Méthodes p150], à partir de cellules HT 29-MTX en culture.

Nous avons optimisé les conditions électrophorétiques pour des tailles attendues d'ARNm comprises entre 5 et 30 kb.

## C-RÉSULTATS

Nous avons obtenu deux types de résultats selon qu'il s'agissait de l'analyse de tissus ou de cellules.

Dans le cas de tissus, le même continuum précédemment observé dans les conditions électrophorétiques conventionnelles a été retrouvé quelle que soit la sonde de mucine étudiée (**figure 25A**). Par contre, dans le cas des cellules HT 29-MTX, les préparations donnant un profil en continuum associé à une bande très faible sur gel conventionnel permettaient en analyse en PFGE d'obtenir une meilleure résolution d'un transcrit unique avec les sondes MUC 2, MUC 3, MUC5 AC et MUC 5B d'environ 13 kb (**figure 25B**).

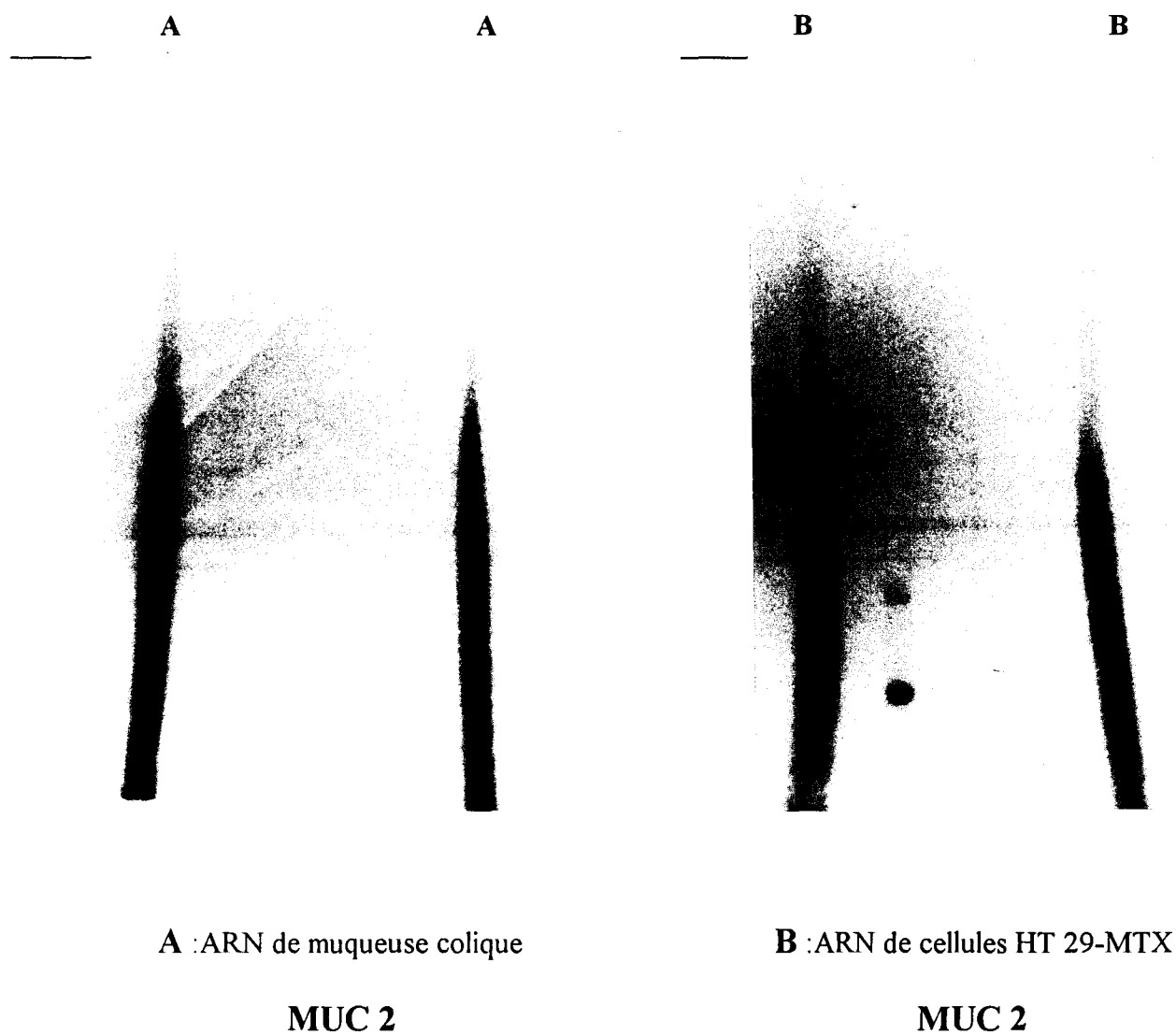
## D- DISCUSSION

Le système d'électrophorèse PFGE adapté aux grandes tailles nous a permis d'obtenir une meilleure résolution d'un transcrit unique de MUC 2, MUC 3, MUC 5AC et MUC 5B, dans les cellules HT 29-MTX. Ceci nous permettait tout à fait de considérer que le continuum était du à une cassure mécanique de ce transcrit de grande taille dans les cellules HT 29-MTX.

Dans le cas des tissus, il nous a semblé que la technique globale d'extraction et de purification des ARN devait être revue avant de conclure.

## V HYPOTHÈSE D'UNE EXTRÊME FRAGILITÉ DES ARN D'APOMUCINES MUC 2 à MUC 6

Nous envisageons alors l'hypothèse d'une dégradation des ARN de mucines MUC 2 à MUC 6, au cours de l'extraction et la purification des ARN totaux à partir de tissus. Cette dégradation concernerait alors uniquement les grands ARN puisque le témoin d'intégrité, la sonde  $\beta$ -actine, montre systématiquement une bande nette.



**FIGURE 25 :** *Analyse de l'expression des gènes de mucines par la technique d'électrophorèse en champs pulsés.*

## A- METHODOLOGIE

Nous avons successivement analysé chaque étape du protocole et nous l'avons modifié pour l'optimiser.

Nous avons tenté de mettre au point une technique "douce" de préparation des ARN.

Cette mise au point technique a consisté, à partir de la technique utilisée habituellement, à éliminer toutes les étapes susceptibles d'entraîner une dégradation mécanique de grands ARN:

- l'étape de broyage avec un homogénéiseur de tissus est supprimée. Les cellules ou le tissu sont broyés au pilon sous azote liquide dans un mortier, jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Puis du tampon GT est ajouté et est mélangé à la poudre toujours sous azote liquide. Lorsque le mélange est bien homogène, l'échantillon est transvasé dans un tube stérile et est dégelé très progressivement (avant d'être déposé directement sur le coussin de CsCl).

- les passages de l'homogénat à travers l'aiguille d'une seringue utilisés dans le but de diminuer sa viscosité sont éliminés. Ces passages à travers des aiguilles de diamètres décroissants ont pour but de casser l'ADN afin d'éviter qu'il ne traverse le coussin de chlorure de césium et vienne contaminer l'ARN. Puisque cette étape casse l'ADN, de grands ARN pourraient également être dégradés;

- toutes les étapes de mélange au "vortex" sont aussi supprimées afin d'écartier toute cassure de grandes molécules.

- les pipetages sont réalisés avec des pipettes conventionnelles à usage unique et à large ouverture, et très délicatement (éviter les pipettes Pasteur et les pipettes automatiques).

## **B- RESULTATS**

Ce protocole a été adapté à l'étude de tissus, puisque dans ce cas, seuls des continuums avaient été obtenus, et ceci de façon reproductible.

L'électrophorèse, le transfert et l'hybridation sont réalisés comme précédemment (Matériel et Méthodes p154, 156).

Le résultat obtenu est présenté dans la **figure 26**.

Pour la première fois, à partir de tissus, et de façon reproductible, une bande très nette est obtenue avec toutes les sondes, qui conjoncture que la dégradation des ARN au cours de leur préparation est la cause majeure du signal hétérogène.

De plus, on remarque que l'intensité du continuum est beaucoup plus faible, ce qui montre également que la dégradation a été moins importante.

La bande et le continuum sont donc liés : lorsque la bande est nette, le continuum est de faible intensité. Lorsque la bande est absente, le continuum est de forte intensité (pour des quantités d'ARN et des temps d'exposition autoradiographique équivalents).

Pour améliorer encore la qualité du signal, nous avons testé d'autres modifications de paramètres :

### **1-Essais de lavages stringents**

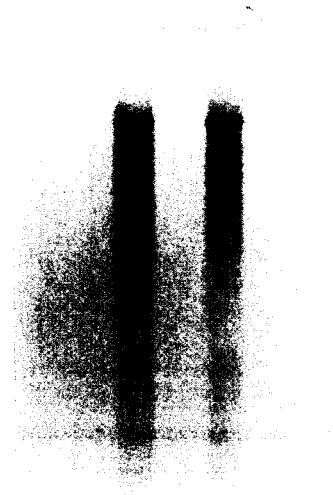
Nous avons ensuite cherché à vérifier si à ce stade, la qualité du signal pouvait encore être améliorée par la stringence des lavages post-hybridation.

Plusieurs lavages de plus en plus stringents, c'est à dire en augmentant la température, ont été réalisés.

La température de lavage utilisée habituellement pour éliminer l'excès de sonde est 65°C.

Des lavages à 70 °C et à 75°C montrent que le profil obtenu est toujours le même : on observe alors une diminution proportionnelle de l'intensité du continuum et de la bande (**figure 27**).

dépôts ———



**MUC 2**

*Lavage à 65°C*

**FIGURE 26 :** *Northern blot réalisé à partir d'ARN préparé dans les conditions "optimisées" (muqueuse colique humaine).*



dépôts —



**MUC 2**

*Lavage à 75°C*

**FIGURE 27 :** *Northern blot réalisé à partir d'ARN préparé dans les conditions "optimisées" (muqueuse colique humaine).*

## 2- Electrophorèse avec des quantités décroissantes d'ARN

Nous avons cherché à atténuer les anomalies de comportement électrophorétiques précédemment signalées à propos du chapitre PFGE, c'est à dire des variations peu maîtrisées d'une électrophorèse à l'autre, peut-être imputable à des interactions moléculaires? à la structure répétitive? à des difficultés de dénaturation?

Pour cela, nous avons testé des concentrations décroissantes d'ARN par puits. Nous nous demandions alors si en diminuant la quantité d'ARN déposée, il était possible de favoriser l'individualisation de la bande par rapport au continuum.

Le résultat obtenu est présenté dans la **figure 28**.

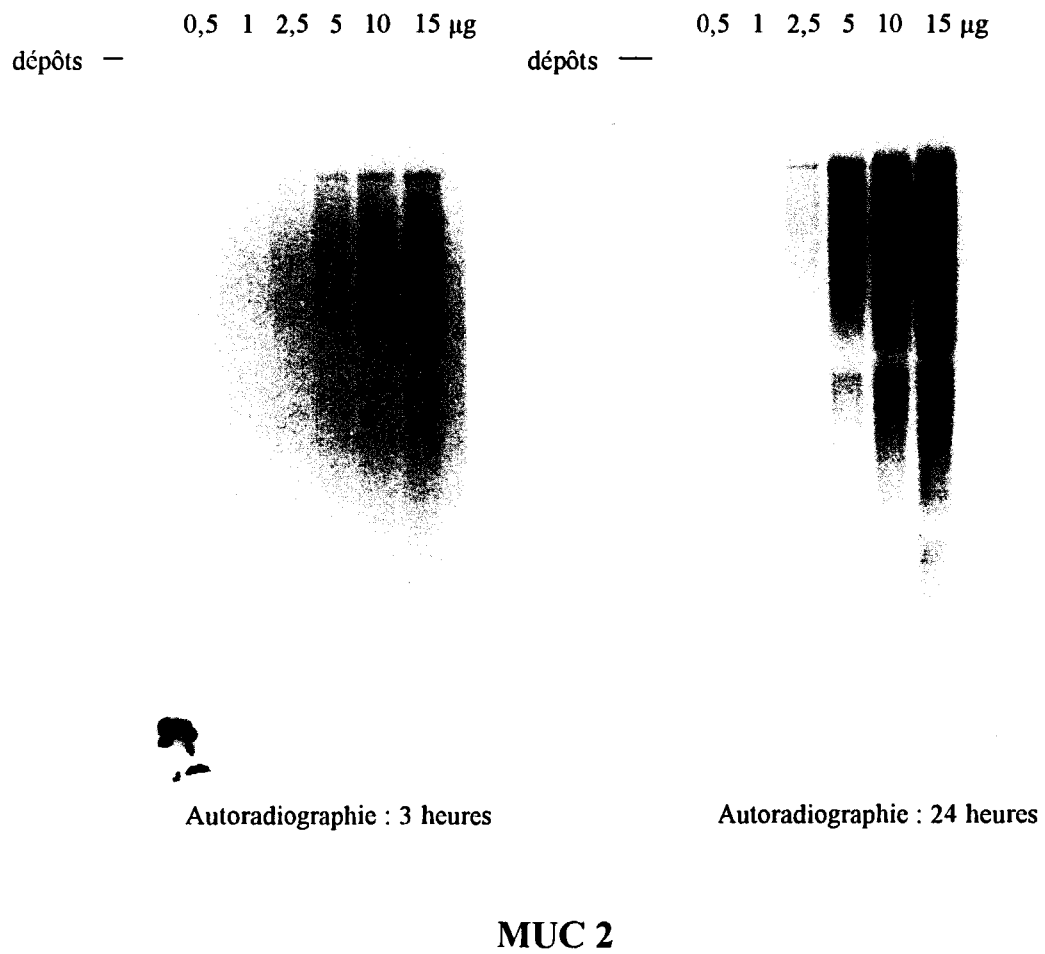
On observe une diminution proportionnelle de l'intensité de la bande par rapport au continuum. L'obtention du continuum n'est donc pas due à des quantités trop importantes de matériel dans les puits qui entraînerait alors une anomalie de migration par défaut de dénaturation.

## 3- Variations des paramètres de l'électrophorèse

L'optimisation du signal est obtenue avec les conditions suivantes : agarose 0,9% et une migration à 30 volts pendant 16 heures.

## 4- Le transfert

La taille des ARNm de mucines semblait donc inhabituelle (supérieure à 13 kb). Nous avons donc envisagé d'optimiser également les conditions de transfert de l'ARN sur la membrane de nylon : le rendement de transfert pouvait être plus faible pour de grands ARN que pour des ARN de taille habituelle, ainsi l'intensité du continuum serait en réalité surestimée par rapport à celle de la bande, puisque l'ARN de grande taille serait mal transféré.



**FIGURE 28 :** Northern blot réalisé à partir de différentes concentrations d'ARN (muqueuse colique).

D'après Sambrook [189], pour étudier des ARNm de taille supérieure à 2,5 kb, le gel d'électrophorèse peut être pré-traité, avant le transfert sur membrane, dans de la soude 0,05N pendant 20 minutes. Ce traitement a la propriété d'introduire des coupures partielles dans l'ARN et ainsi de faciliter son transfert à travers le gel.

Nous avons donc introduit cette étape d'hydrolyse partielle telle qu'elle est décrite: le même échantillon d'ARN, préparé dans les nouvelles conditions dites "douces" a été transféré avec ou sans le traitement préalable à la soude. Les résultats sont présentés dans la **figure 29**.

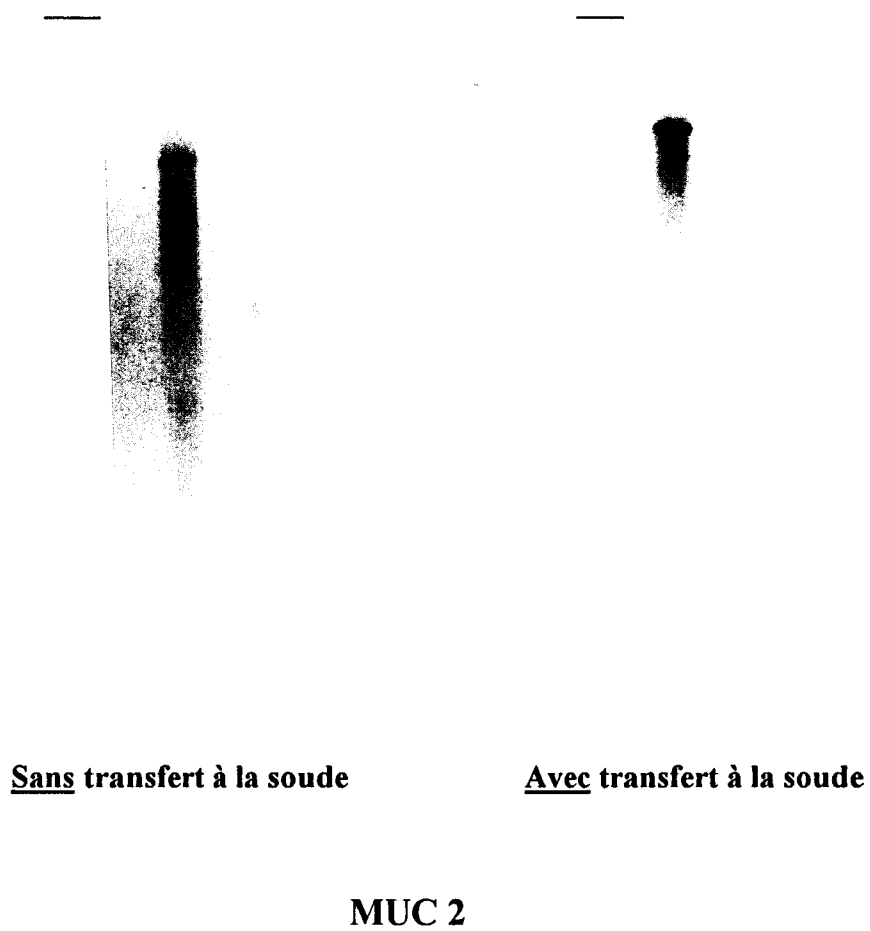
Dans l'échantillon pré-traité à la soude, l'intensité de la bande est nettement plus importante que dans l'échantillon non traité à la soude.

Ces modifications techniques nous permettent donc de montrer que les ARNm de mucines sont très grands. L'intensité du continuum devient alors très faible voire négligeable, mais semble difficile à éliminer entièrement. S'agit-il d'une sensibilité spécifique aux ARN d'apomucines, due peut-être à leur structure répétitive ou est-elle commune à tous les ARN de taille équivalente?

## **5- Confirmation de nos résultats**

Nous avons cherché dans la littérature si d'autres ARNm d'une taille supérieure à 13 kb avaient déjà été décrits. Cette recherche nous a montré que des ARN de cette taille sont très rares. Le transcrit du gène de l'apolipoprotéine B (ApoB) fait partie de cette petite "famille".

Pour vérifier ce travail, nous avons donc utilisé la sonde correspondant à l'ApoB (American Type Culture Collection N°57699) la taille de l'ARNm est parfaitement connue : l'ADNc a été entièrement séquencé par plusieurs auteurs [45, 49, 137], sa taille est de 14,1 kb. L'ARNm de l'Apo B est donc considéré comme un grand ARN et constitue donc pour notre travail de thèse un témoin de confirmation de nos résultats. De plus, le gène de l'apolipoprotéine B s'exprime dans l'intestin grêle, tissu qui synthétise également les mucines MUC 2, MUC 3 et MUC 4.



**FIGURE 29 :** *Northern blot réalisés avec ou sans transfert à la soude.  
(muqueuse colique).*

A partir d'un échantillon d'intestin grêle (tissu qui exprime certains gènes de mucines ainsi que l'ApoB), 2 préparations distinctes d'ARN ont été réalisées :

- une préparation d'ARN " classique ";
- une préparation d'ARN dite " douce " et transfert à la soude.

Les 2 Northern blots correspondant aux 2 préparations ont été hybridés avec 2 sondes : la sonde de mucine MUC 3 qui est le gène le plus exprimé dans l'intestin grêle et la sonde de l'ApoB.

Les résultats sont présentés dans la **figure 30**.

Le Northern blot dont l'ARN a été préparé classiquement, montre comme prévu un continuum avec la sonde de mucine MUC 3. De même, la sonde ApoB hybridée sur ce même Northern blot montre elle aussi un continuum homogène identique à celui obtenu avec la sonde de mucine.

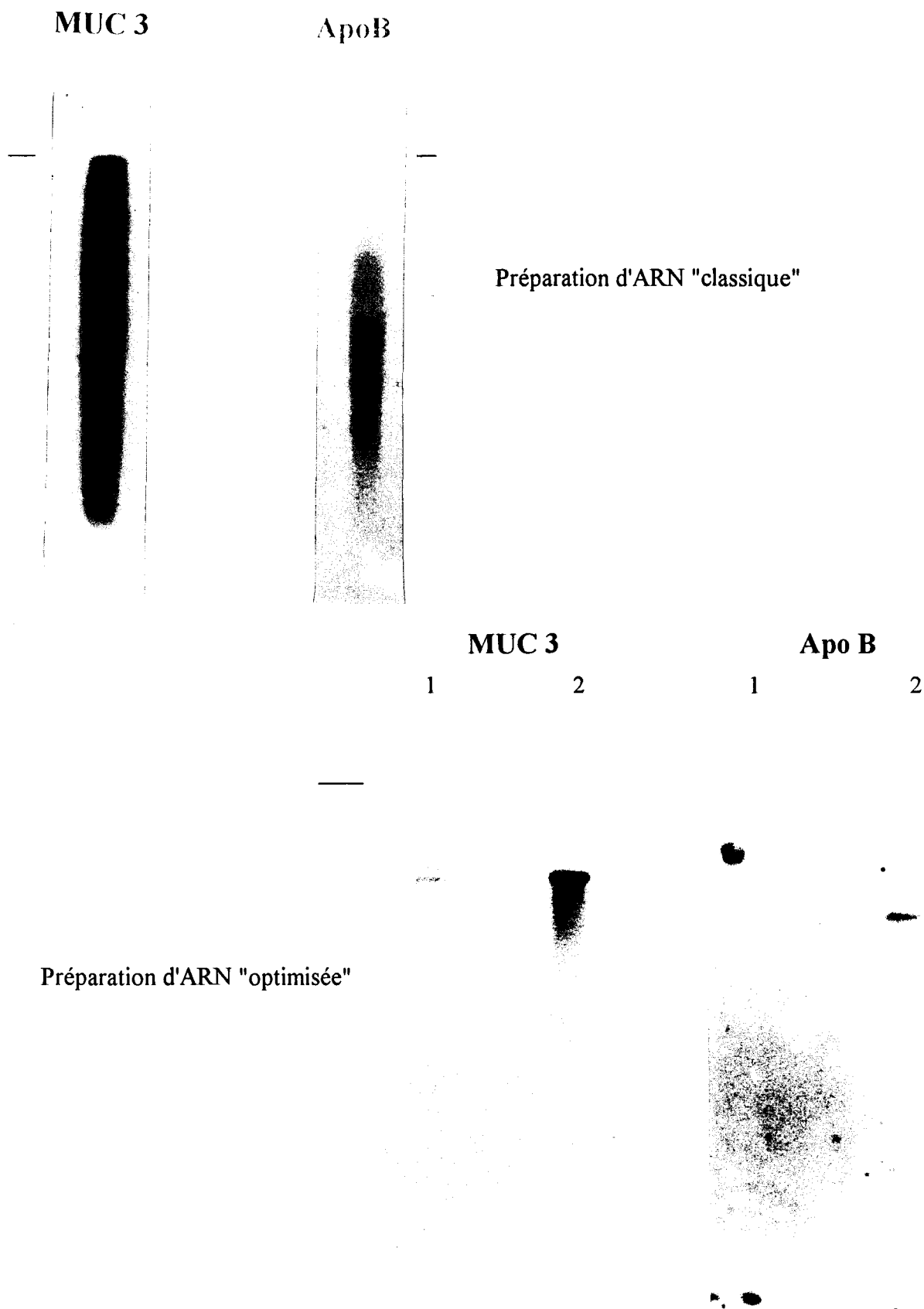
Le Northern blot dont l'ARN a été préparé dans les conditions mises au point lors de notre travail de thèse montre une bande nette avec la sonde de mucine MUC 3.

L'hybridation de ce même Northern avec la sonde ApoB montre également une bande nette.

L'hybridation de la sonde ApoB apporte donc la confirmation de nos résultats : le continuum est du à une dégradation massive et spécifique de grands ARN et non spécifique des ARN d'apomucines.

Ce résultat est en accord avec la présence, mais inconstante, de transcrits relatés antérieurement dans des lignées cellulaires en particulier dans les lignées cellulaires HT 29-MTX [139b], et plus récemment, en 1996, dans d'autres lignées de carcinomes coliques : COLO 205, LS174T, SW1116 et LoVo [15].

→ *Les transcrits des gènes de mucines sont tous très grands, ils ne sont pas hétérogènes, le continuum observé est du à une dégradation massive et spécifique des ARN de grandes tailles au cours de leur préparation.*



**FIGURE 30 :** *Comparaison des profils d'expression en Northern blot obtenus avec les sondes MUC 3 et Apo B en fonction de la qualité de la préparation utilisée.*

## VI SÉLECTION DES ARN POLY (A<sup>+</sup>)

Considérant que les ARNm de MUC 2 à MUC 6 sont de grande taille, il nous a paru nécessaire de reconsidérer l'étape de sélection des ARN poly(A<sup>+</sup>) qui est recommandée en préalable à l'étude des messagers en Northern blot. Cette étape réalise une affinité entre la queue poly(A) dont sont généralement pourvus les ARNm et une matrice supportant des bras poly dT. Elle permet d'éliminer les ARN ribosomaux, source d'artéfacts dans l'analyse des transcrits dont la taille correspond à celle de l'ARNr 28S et celle de l'ARNr 18S.

\* Lorsque la purification des ARN poly(A<sup>+</sup>) est effectuée à partir d'une préparation d'ARN totale dite "classique", le même profil hétérogène est obtenu en Northern blot lors de l'analyse de la fraction poly(A<sup>+</sup>) (**figure 31**), quelle que soit la méthode de sélection des poly(A<sup>+</sup>) utilisée (affinité sur colonne d'oligo dT cellulose ou affinité sur billes magnétiques).

On remarque néanmoins, en comparant le signal obtenu avec la sonde  $\beta$ -actine, que la sélection des ARN poly(A<sup>+</sup>) d'apomucines s'effectue avec un rendement très diminué par rapport à des ARNm de petite taille comme par exemple la  $\beta$ -actine.

\* Lorsque la purification des ARN poly(A<sup>+</sup>) est réalisée à partir d'une préparation optimisée d'ARN totaux, on voit apparaître des transcrits d'apomucines visibles à la même distance de migration que sur la préparation d'ARN correspondante (**figure 31**). Néanmoins, 1) le rendement de sélection est également très médiocre (signal  $\beta$ -actine), 2) il est irrégulier, sur certaines préparations, il est impossible de réussir à sélectionner les transcrits; 3) il est sélectif, sur certaines préparations comportant 2 transcrits dans la fraction ARN total, un seul est sélectionné par affinité, et il s'agit du plus petit.

Nous concluons donc que l'étape de sélection des ARN poly(A<sup>+</sup>) est peu recommandée lorsqu'elle s'applique aux grands ARNm : le rendement est beaucoup trop faible, une sélection de transcrits peut s'effectuer avec une perte d'informations sur le Northern blot.

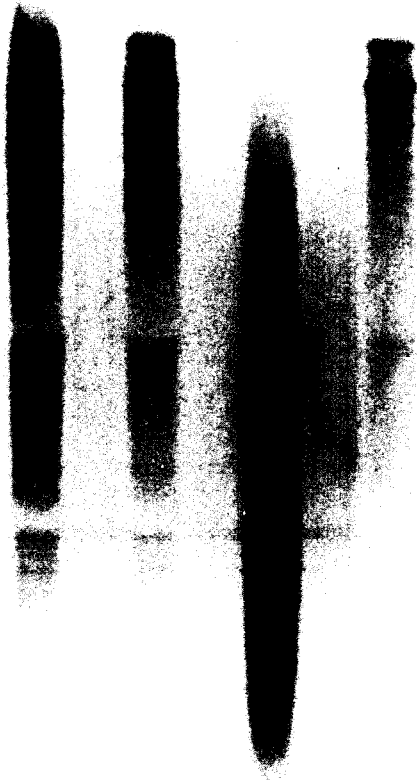
Plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

- cassures mécaniques occasionnées par une étape supplémentaire de purification
- difficulté à réaliser une affinité suffisante si l'ARN est de trop grande taille par rapport à celle de la queue poly(A).

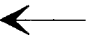


A				B			
Cla.		Opt.		Cla.		Opt.	
T	A <sup>+</sup>	T	A <sup>+</sup>	T	A <sup>+</sup>	T	A <sup>+</sup>

A				B			
Cl		Op		Cl		Op	
T	A <sup>+</sup>	T	A <sup>+</sup>	T	A <sup>+</sup>	T	A <sup>+</sup>



autoradiographie 2 jours



autoradiographie 7 jours

MUC 4



ACTINE

A, B : individus A et B  
 Cla. : technique "classique"  
 Opt. : technique "optimisée"  
 T : ARN total  
 A<sup>+</sup> : ARN poly A<sup>+</sup>

FIGURE 31 : Sélection des ARN poly A<sup>+</sup> d'apomucines.

## VII TAILLE DES ARNm DE MUCINES

### 1- Profil obtenu en Northern blot

En réunissant toutes les modifications techniques adaptées à l'étude de grands ARN :

- purification
- paramètres de l'électrophorèse
- transfert

des Northern blots ont été réalisés à partir de tissus différents et provenant de 7 individus, dans le but d'étudier les ARNm des différents gènes de mucines (MUC 2 à MUC 6).

Les résultats sont présentés dans la **figures 32-33-34**.

On observe que quelle que soit la sonde et quel que soit le tissu, on obtient uniquement 1 ou 2 transcrits dont la taille varie en fonction des individus, excepté MUC 5B où seul un transcrit de même taille est présent chez tous les individus.

### 2- Taille des ARNm de mucines

#### *a- problèmes rencontrés pour l'étalonnage :*

L'étalonnage habituel des gels d'électrophorèse est réalisé grâce à un marqueur de taille constitué d'un mélange de six ARN synthétisés *in vitro* à partir d'ADN de phage  $\lambda$  dont les tailles sont 0,24/ 1,35/ 2,37/ 4,40/ 7,46 et 9,49 kb. L'établissement de la droite d'étalonnage est réalisé. Cependant, nous nous trouvons confrontés au fait les tailles des ARN des apomucines étudiées sont largement au delà de la courbe. Il faut donc travailler par extrapolation.

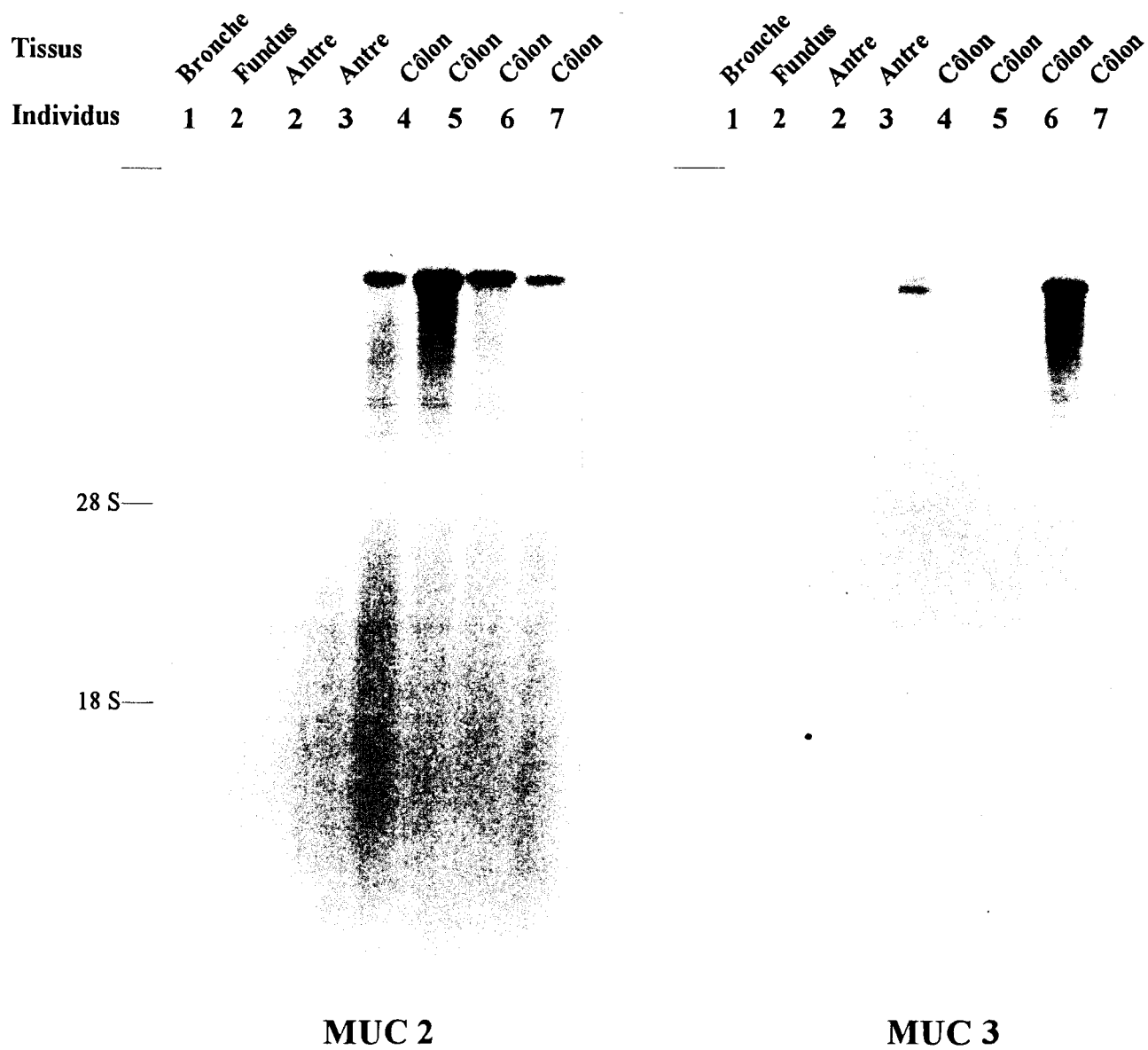
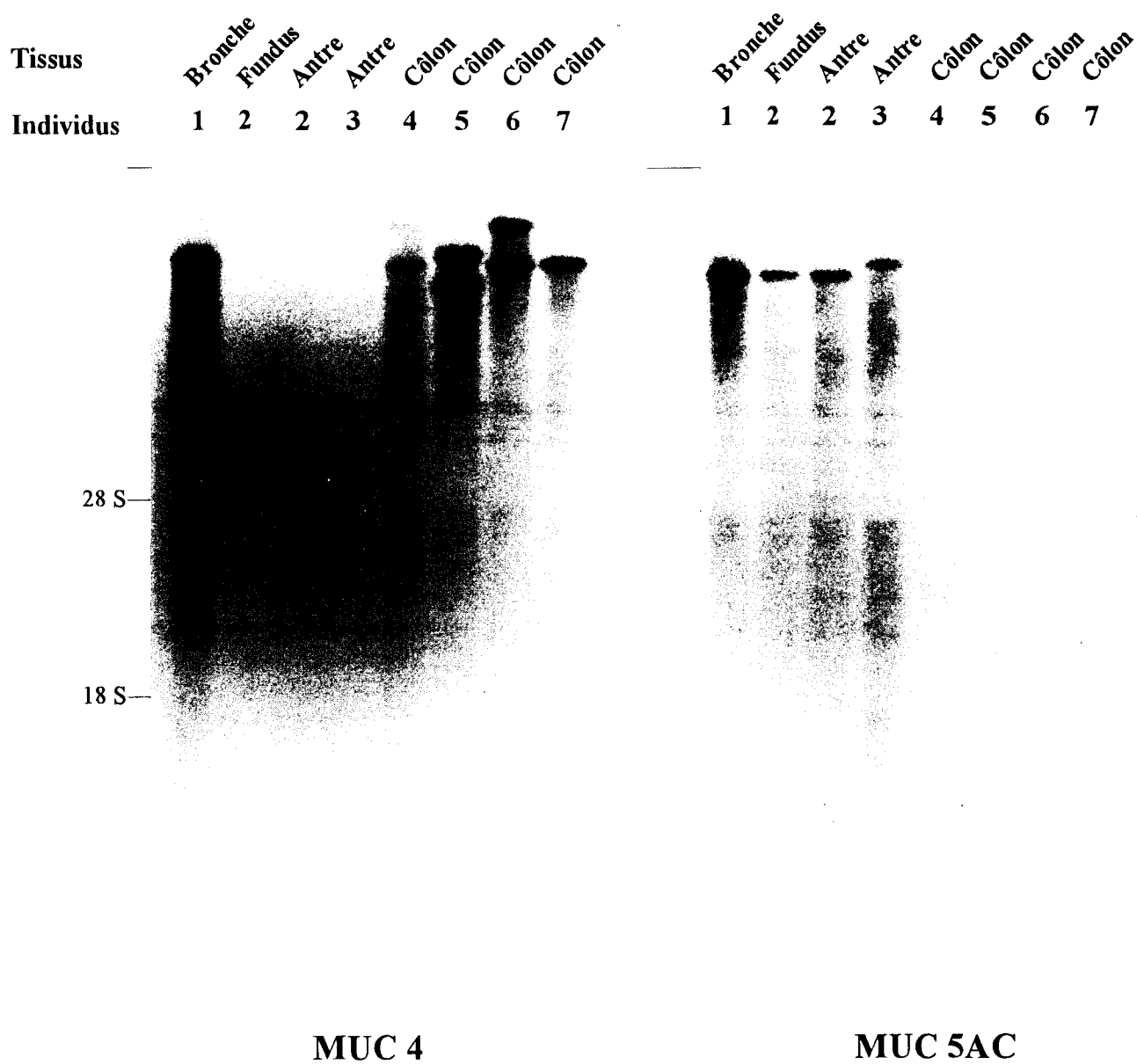


FIGURE 32 : Polymorphisme des ARNm des gènes MUC 2 et MUC 3



**FIGURE 33 :** Polymorphisme des ARNm des gènes *MUC 4* et *MUC 5AC*

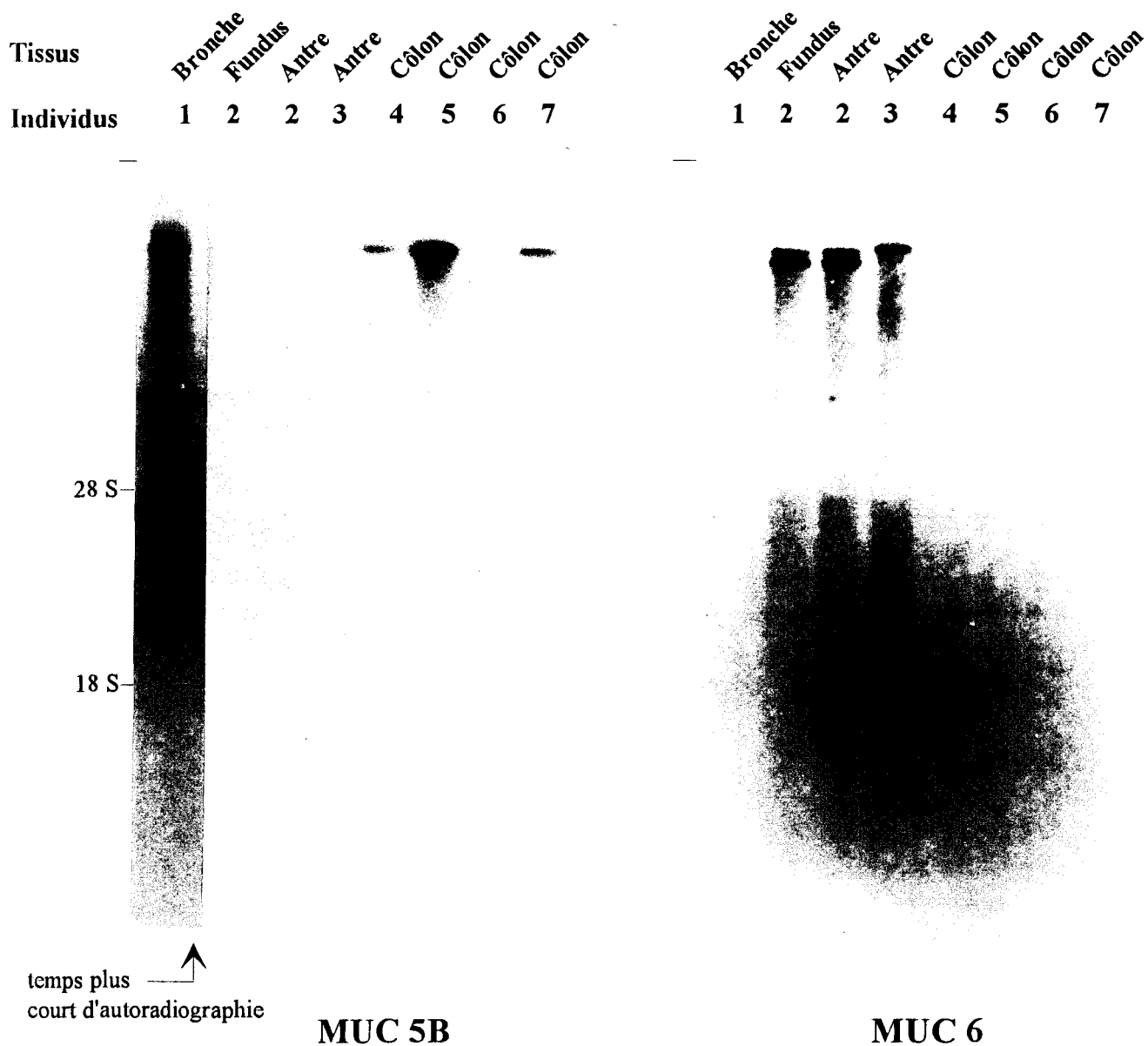


FIGURE 34 : Polymorphisme des ARNm des gènes MUC 5B et MUC 6

Pour vérifier si cette façon de procéder est valable, nous avons de nouveau utilisé la sonde ApoB, dont la taille de l'ARNm est connue : 14,1 kb. Nous avons calculé la valeur correspondant à l'ApoB par extrapolation de notre courbe, elle est de 22 kb. Ceci démontre que les droites d'étalonnage habituellement tracées ne sont pas utilisables dans le cas d'ARN de taille supérieure à 9,5 kb.

Nous proposons une nouvelle droite d'étalonnage tracée en utilisant 3 points : les distances de migration de la  $\beta$ actine, de l'ARNr 28S et du transcrit de l'ApoB.

### *b- résultats*

La droite d'étalonnage nous a permis de déterminer la taille des ARNm des gènes de mucines MUC 2, MUC 3, MUC 4, MUC 5AC, MUC 5B et MUC 6.

Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 7**.

Les ARNm de mucines sont tous très grands de 14 à 20 kb environ.

### **3- Questions posées**

Nos résultats montrent que :

- la taille des ARNm pour un gène donné peut varier d'un individu à un autre ;
- d'autre part, pour certains gènes et dans certains tissus, 2 bandes sont visibles, dans ce cas, elles ont toutes les deux la même intensité.

Ces résultats suscitent plusieurs interrogations :

- chez certains individus, une bande unique est visible, dans d'autres, on observe 2 bandes nettes et de même intensité, ces 2 bandes correspondent-elles aux 2 allèles ?
- pour plusieurs gènes de mucines, il a été montré un polymorphisme de type V.N.T.R., les différences de taille des ARNm d'un même gène, d'un individu à un autre, correspondent-elles à ce polymorphisme ?

GENE	TISSU bronche		fundus	antre	colon	colon	colon	colon
	SUJET	A	B	C	D	E	F	G
MUC2				16 14	16	16 15	16	15,5
MUC 3					17,5 16		17	17
MUC 4		18,5			22 18	19 16,5	22 18	18
MUC 5AC		17	17	18				
MUC 5B		17,5			17,5	17,5	17,5	17,5
MUC 6			17,5 16,5	18				

**TABLEAU 7 :** Tailles (en kb) des ARNm des apomucines MUC 2 à MUC 6.

Pour répondre à la première interrogation, nous avons testé :

- des temps de migration d'électrophorèse plus longs et à plus haut voltage dans les conditions conventionnelles, pour tenter de mieux séparer d'éventuels transcrits de tailles moléculaires proches (**figure 35-36**);

- une migration électrophorétique en champs pulsés dans les conditions décrites précédemment (**figure 37**).

Il a ainsi été possible, en augmentant la durée de l'électrophorèse, dans certains cas, alors que dans des conditions classiques une bande épaisse et unique était visible, de séparer 2 transcrits de tailles très proches, et toujours de même intensité (**figure 35-36**). Ces conditions électrophorétiques de type conventionnel nous ont paru parfaitement adaptées à l'étude du polymorphisme interindividuel.

L'électrophorèse en champs pulsés confirme ces résultats mais n'apporte pas une résolution nettement supérieure (**figure 37**).

Il semble donc que ces 2 bandes correspondent bien aux 2 allèles et non à 2 transcrits différents issus du même gène. Cette hypothèse a été vérifiée ensuite :

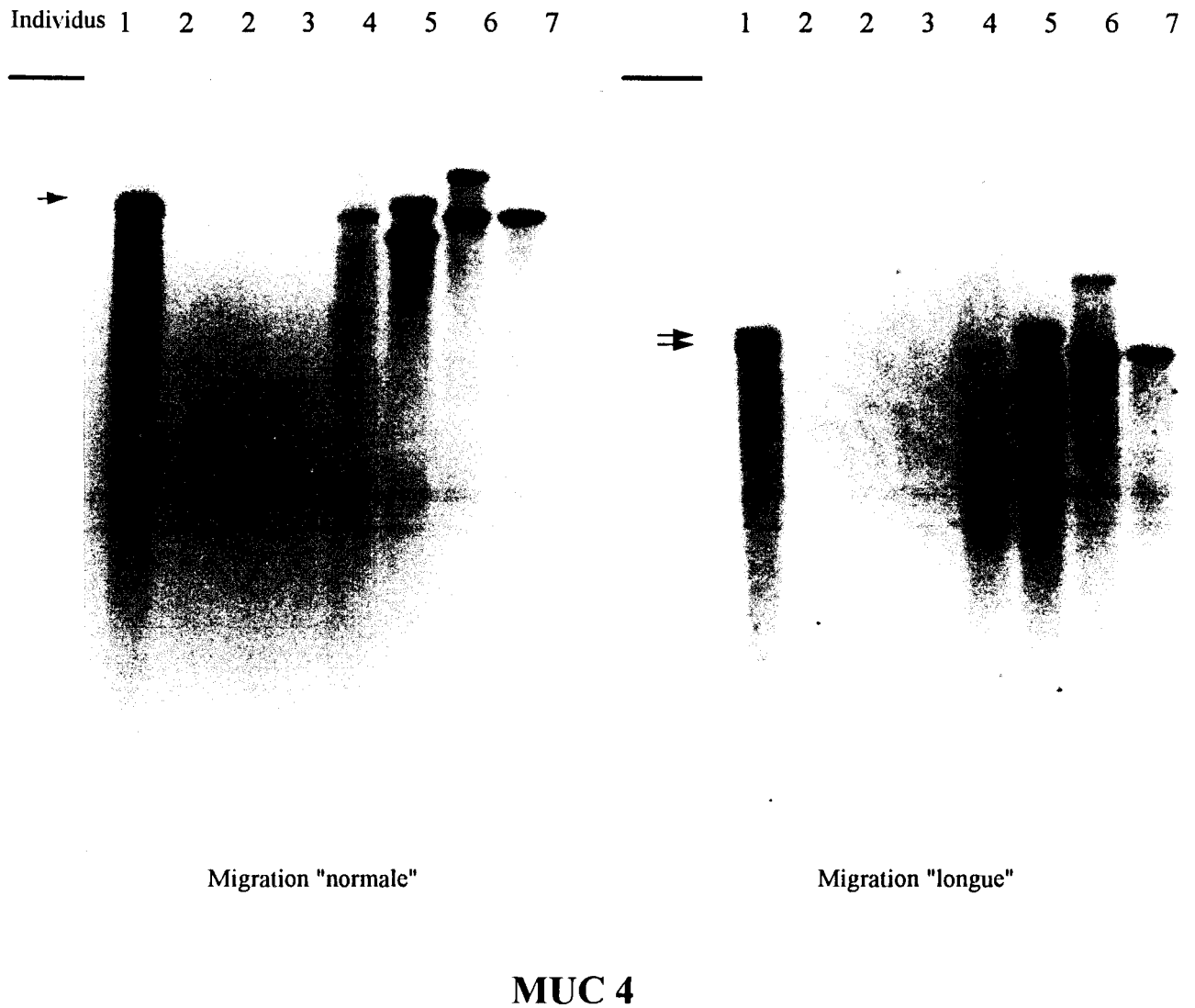
## VII ETUDE PRELIMINAIRE DU POLYMORPHISME

La taille des ARN est-elle en relation avec le polymorphisme allélique de type V.N.T.R.?

### 1- Southern blot

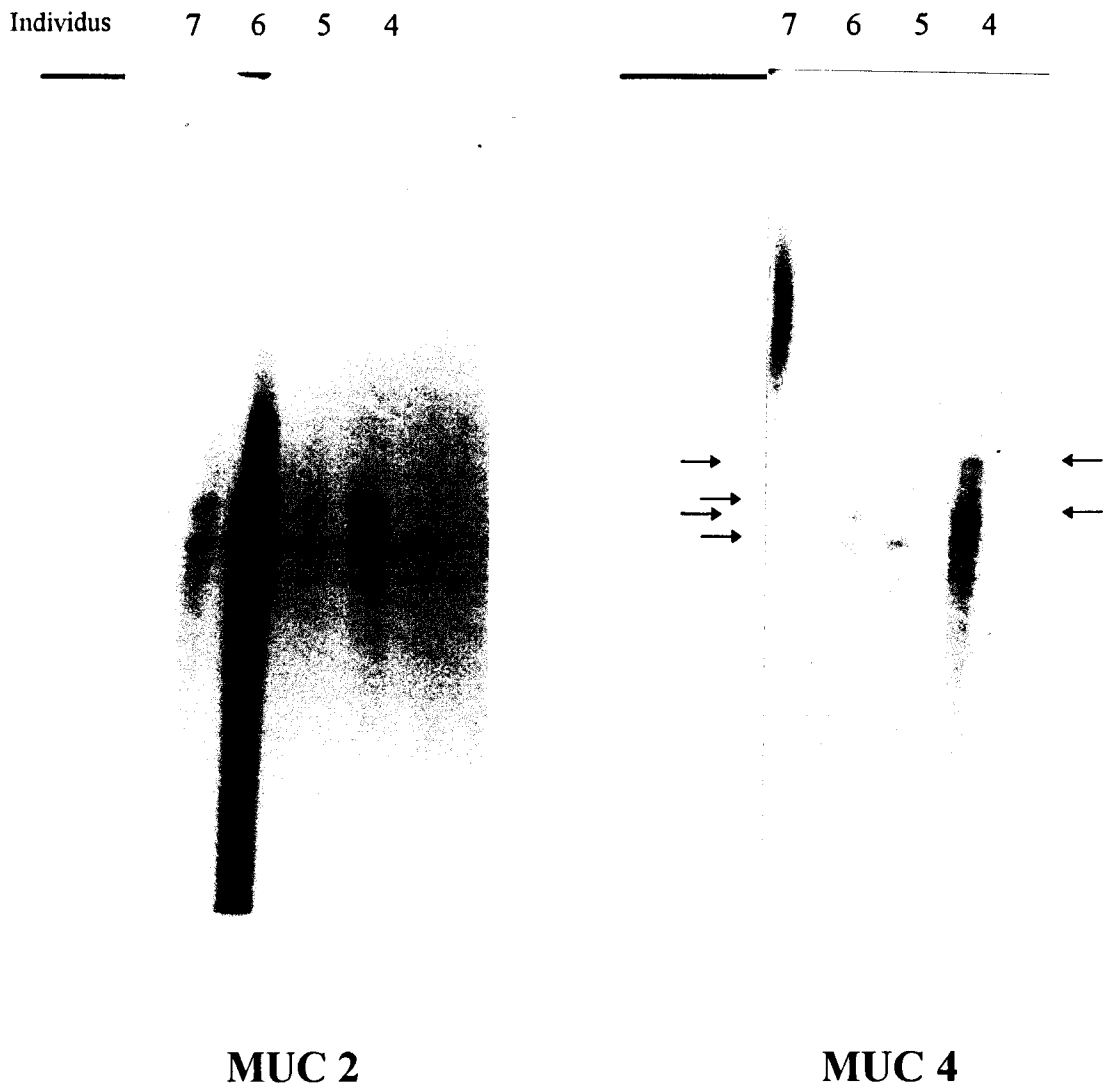
Au laboratoire, l'étude de deux gènes est bien avancée : MUC 4 et MUC 5B. Dans la littérature, seule une partie de l'organisation du gène MUC 2 a été décrite.





**FIGURE 35 :** *Optimisation des conditions électrophorétiques en vue de l'étude du polymorphisme des ARNm de MUC 2 à MUC 6 : augmentation du temps d'électrophorèse.*





**FIGURE 37:** *Optimisation des conditions électrophorétiques en vue de l'étude du polymorphisme des ARNm de MUC 2 à MUC 6 : essai par la méthode d'électrophorèse en champs pulsés.*

La cartographie qui est maintenant connue pour ces gènes, permet un choix d'enzymes de restriction qui coupent de part et d'autre du domaine répétitif pour MUC 2 et MUC 4 ou qui permettent d'obtenir un plus grand fragment mais contenant tout le domaine répétitif de MUC 5B. Nous pouvons donc étudier les variations interindividuelles de type V.N.T.R.

Par électrophorèse, nous pouvons alors parallèlement comparer la taille du domaine répétitif analysé sur le gène (Southern blot) et la taille de l'ARN correspondant (Northern blot). L'étude a été faite sur 3 individus (5, 6 et 7) en comparant l'ADN génomique et l'ARN de muqueuse colique.

Nous avons utilisé sur l'ADN génomique les coupures suivantes :

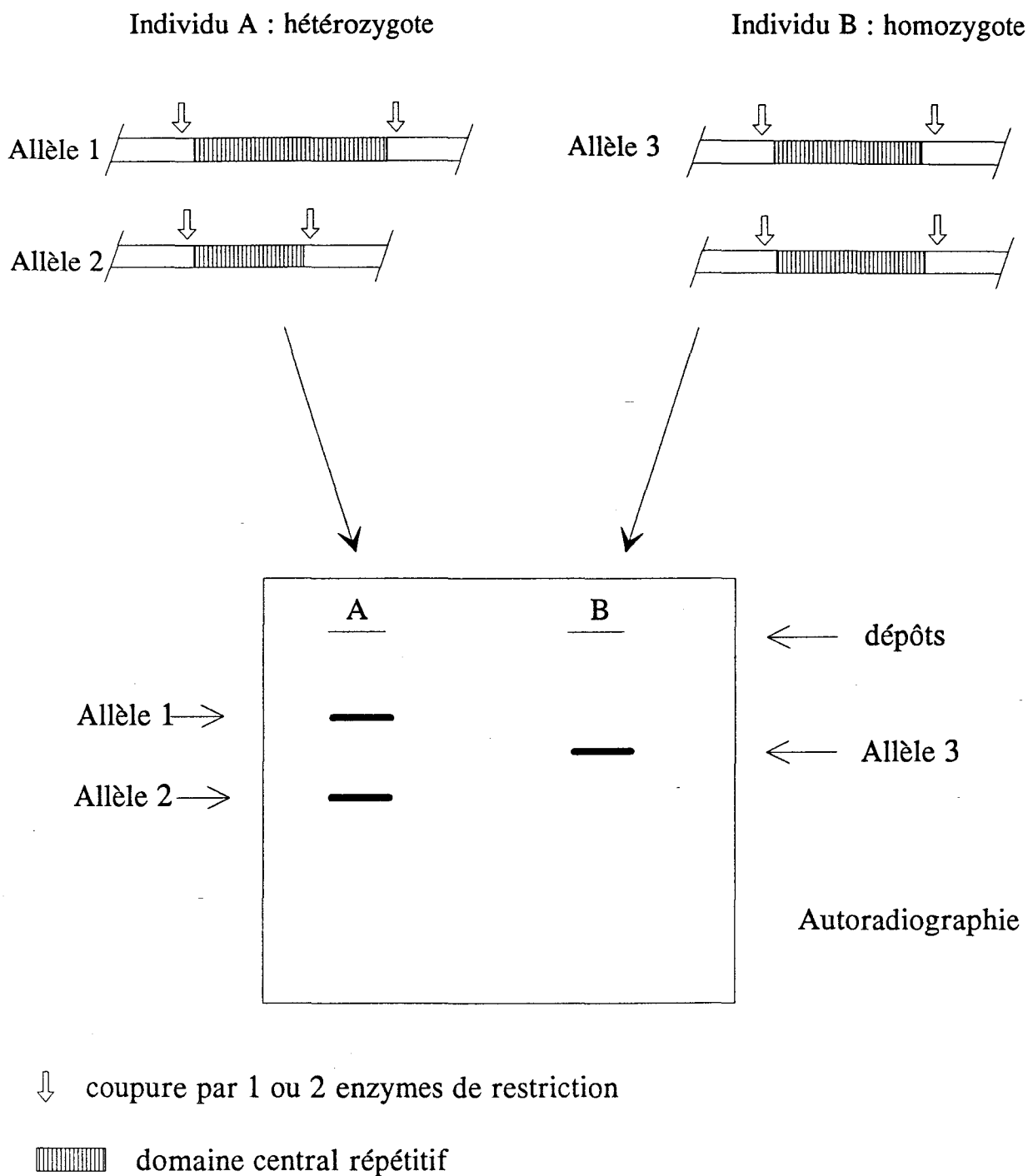
- EcoRI-PstI pour étudier MUC 4 [65];
- BglII pour étudier MUC 5B [152];
- HinfI pour étudier MUC 2 [215].

L'électrophorèse de l'ADN digéré en gel d'agarose, le transfert puis l'hybridation avec la sonde correspondant à la séquence répétitive nous permet pour chaque individu d'identifier s'il est homozygote ou hétérozygote et d'estimer la taille du domaine répétitif (**figure 38**).

Il est alors possible de comparer le profil obtenu en Southern blot avec le profil obtenu en Northern blot, et ainsi de voir si les individus qui possèdent le plus grand domaine répétitif sont ceux qui ont les plus grands ARNm.

La taille (en kb) des fragments révélés avec les sondes répétitives des trois individus testés a été déterminée :

	MUC 2	MUC 4	MUC 5B
<b>Individu 5</b>	7,8 / 8,5	12 / 9	18
<b>Individu 6</b>	8,5 / 8,6	19 / 10	18
<b>Individu 7</b>	8,3 / 8,5	10	18



**FIGURE 38 :** Mise en évidence du polymorphisme de type V.N.T.R. des gènes de mucines par la technique de Southern blot.

On observe donc une parfaite concordance entre les profils obtenus en Southern blot et en Northern blot (**figure 39-40-41** ).

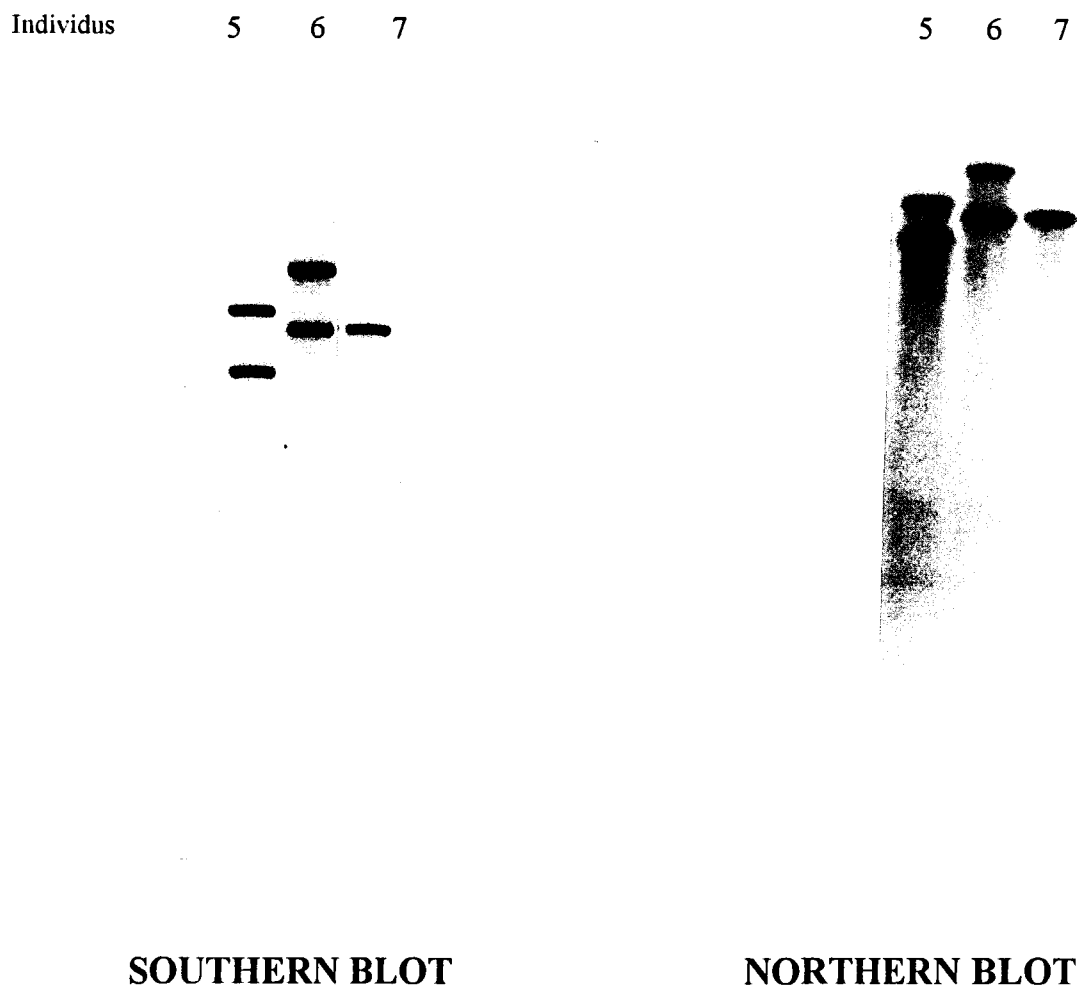
Pour un gène donné, plus la taille du domaine répétitif est importante, plus l'ARN est grand et inversement, ceci en supposant que les régions en 5' et 3' du domaine répétitif sont de mêmes tailles.

Lorsque l'individu est homozygote pour un gène, 1 bande unique mais souvent plus large, est obtenue en Northern blot.

Lorsque l'individu est hétérozygote, 2 bandes sont visibles en Northern blot, elles sont de même intensité et correspondent aux 2 allèles.

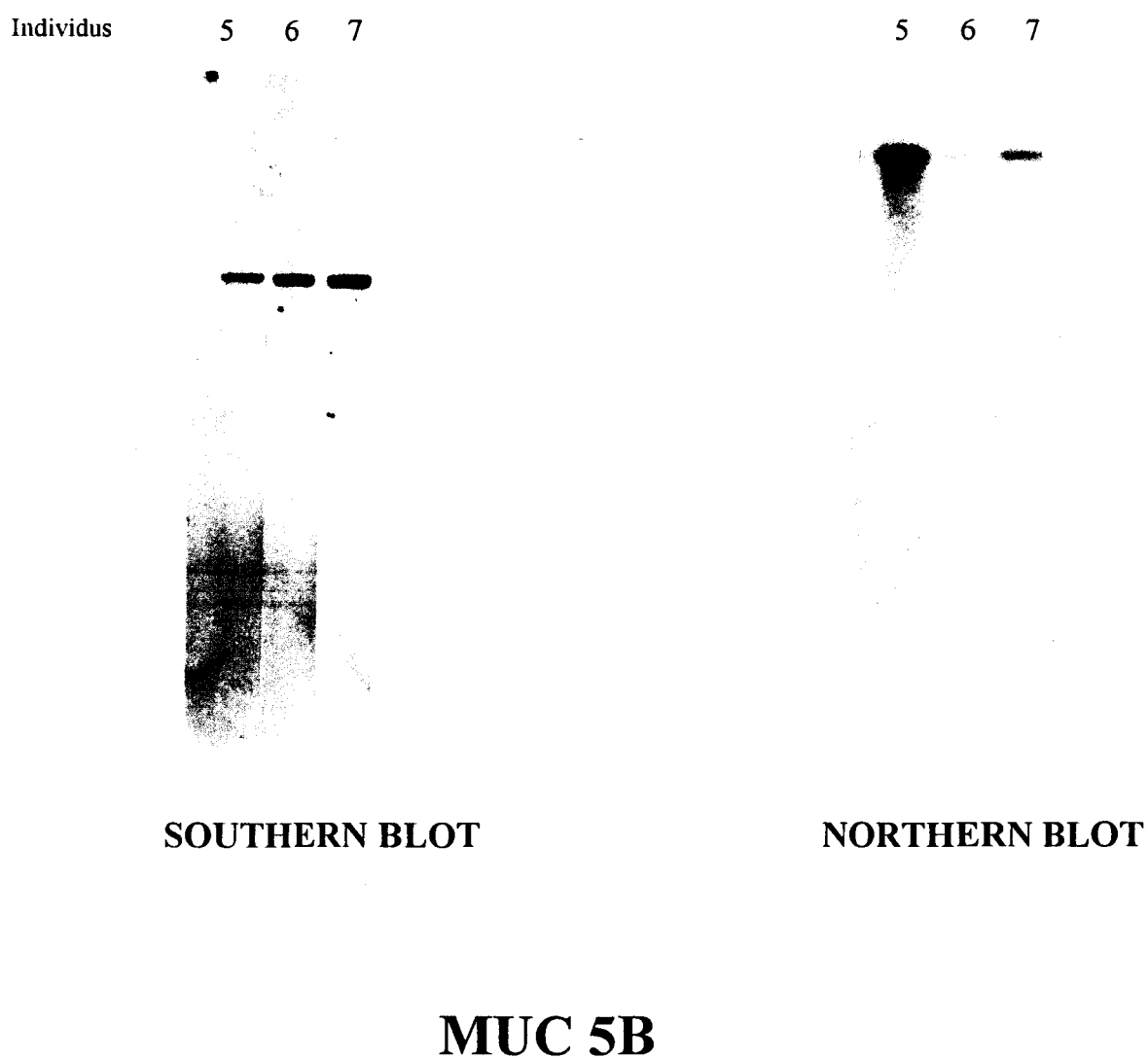
Les deux transcrits ne sont donc pas issus d'un épissage alternatif.

D'autre part, les différences de tailles des transcrits d'un même gène d'un individu à un autre sont directement reliées au polymorphisme de type V.N.T.R.



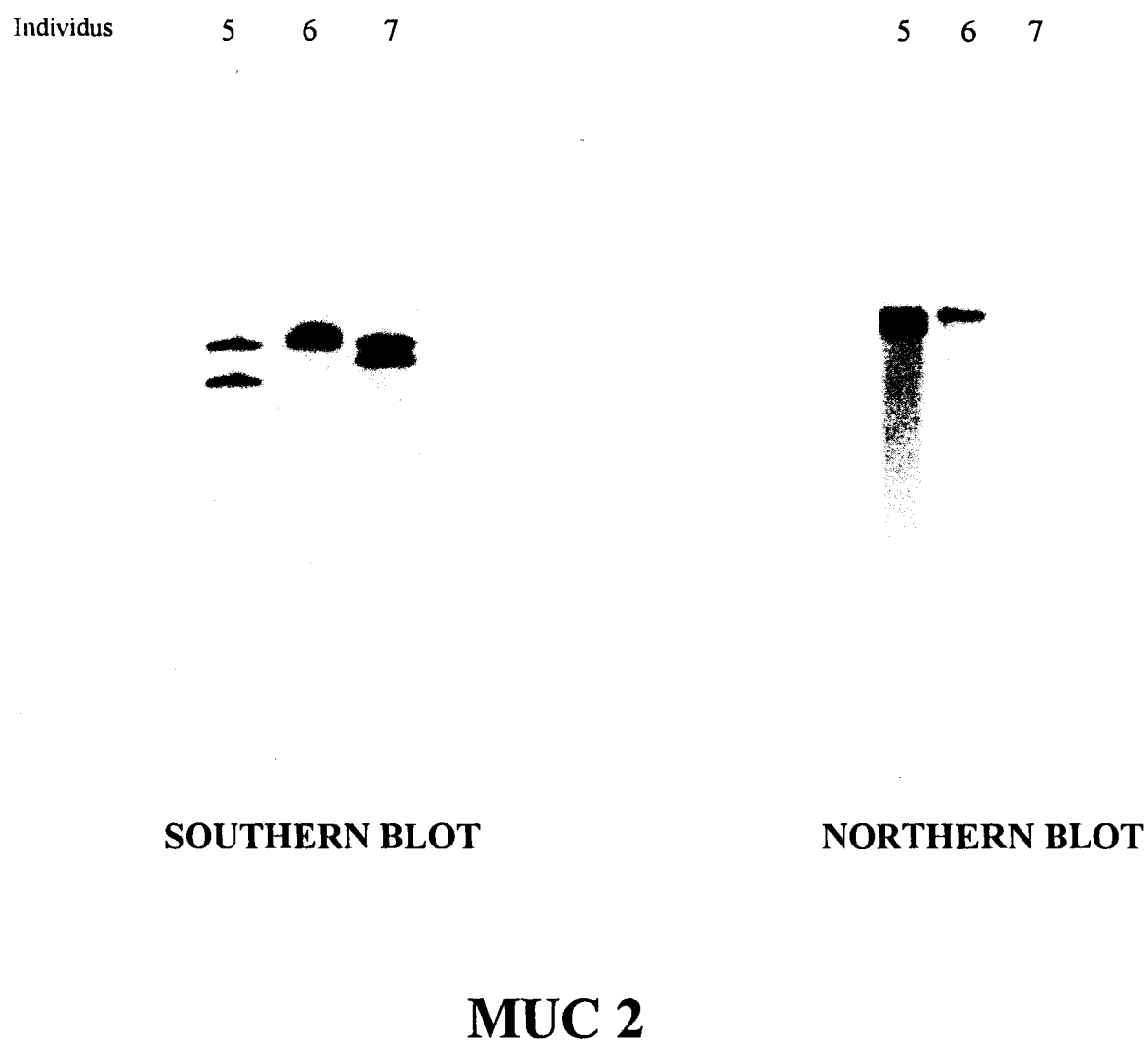
## MUC 4

**FIGURE 39** : *Polymorphisme de type V.N.T.R. : parfaite concordance entre les données du Southern blot et du Northern blot.*



**FIGURE 40** : *Polymorphisme de type V.N.T.R. : parfaite concordance entre les données du Southern blot et du Northern blot.*





**FIGURE 41** : *Polymorphisme de type V.N.T.R. : parfaite concordance entre les données du Southern blot et du Northern blot.*

## 2- Polymorphisme des gènes de mucines : résultats préliminaires

L'analyse par Northern blot permet une étude du polymorphisme même pour les gènes dont l'organisation génomique n'est pas encore connue (MUC 3, MUC 5AC et MUC 6) et confirme les résultats obtenus par Southern blot pour les gènes les mieux connus actuellement (MUC 2, MUC 4 et MUC 5B). Ce travail nous permet donc de déduire que les gènes de mucines présentent un polymorphisme de type V.N.T.R. plus ou moins important (**tableau 8**).

On peut ainsi noter, même sur une série courte, des différences de leur degré de polymorphisme. Cependant, des études portant sur un plus grand nombre de sujets seront nécessaires pour confirmer ce résultat et les assortir d'une étude statistique.

- **MUC 4** serait le gène le plus polymorphique : la taille des allèles varie de 16,5 à 22 kb ;
- **MUC 2**, les tailles des allèles varient de 14 à 16 kb;
- **MUC 3** et **MUC 6**, les tailles de leurs allèles varient de 16 à 17,5 et 16,5 à 18 kb respectivement ;
- **MUC 5AC**, les tailles des allèles varient de 17 à 18 kb;
- **MUC 5B** ne semble pas présenter de polymorphisme.

Les différences de taille les plus importantes ont été observées avec le gène MUC 4 : 5,5 kb entre le plus petit et le plus grand.

GENE	Nombre d'individus étudiés	Nombre d'allèles	Taille des allèles (kb)	Tailles extrêmes	Ecart de tailles
MUC 2	5	4	14 15 15,5 16	14-16	2
MUC 3	2	3	16 17 17,5	16-17,5	1,5
MUC 4	5	4	16,5 18 19 22	16,5-22	5,5
MUC 5AC	3	2	17 18	17-18	1
MUC 5B	5	1	17,5		0
MUC 6	2	3	16,5 17,5 18	16,5-18	1,5

**TABEAU 8 :** *Etude préliminaire du polymorphisme des gènes de mucines MUC 2 à 6.*

## **DISCUSSION**

---

## DISCUSSION

---

Au démarrage de notre travail de thèse, aucune information n'était disponible concernant la taille et le nombre de transcrits exprimés par les gènes de mucines MUC 2 à MUC 6. Le seul gène dont la structure était connue était MUC 1, surprenant par sa petite taille, et finalement l'idée que des apomucines de grande taille puissent résulter de l'association de plusieurs petites sous-unités n'apparaissait pas impossible.

A cette époque, la notion de très grands ARNm ne s'imposait pas. Par contre, la notion d'une grande diversité des mucines était très généralement reconnue, même si certains travaux concernant l'étude des précurseurs polypeptidiques d'apomucines étaient contradictoires.

Ceci explique que nous ayons privilégié la recherche de raisons biologiques à l'hétérogénéité apparente des ARNm d'apomucines.

Nous avons pu montrer que les ARNm des gènes MUC 2 à MUC 6 sont très stables : une demi-vie de treize heures pour MUC 2 et MUC 3, seize heures pour MUC 5AC et MUC 5B, quinze heures pour MUC1. Ce résultat infirme l'hypothèse d'une instabilité majeure de ces apomucines, qui a été l'hypothèse la plus citée dans la littérature encore très récemment, comme pouvant être à l'origine de l'hétérogénéité des ARNm.

La démonstration que la cycloheximide ne modifie pas de façon notable le niveau de transcription des gènes suggère que la stabilisation ou la dégradation de ces transcrits ne soit pas sous la dépendance de protéines labiles, tout au moins dans le modèle cellulaire étudié (HT 29-MTX).

Un résultat similaire a été rapporté dans la littérature à propos du gène MUC1 dans un autre modèle cellulaire MCF-7. Ces deux résultats ne permettent pas néanmoins de préjuger d'une stabilité identique des différents gènes de mucines dans tous les types cellulaires.

Parallèlement à l'étude que nous menions sur la stabilité des ARNm d'apomucines, les travaux menés au laboratoire à propos de l'organisation du gène MUC 5B, venaient confirmer la difficulté de trouver une origine biologique à l'hétérogénéité de ce gène. En effet, très récemment, la localisation du domaine répétitif de MUC 5B dans un seul exon [65], le plus grand décrit jusqu'ici chez les mammifères (10,713 kb), rendait l'hypothèse de l'épissage alternatif responsable de l'hétérogénéité comme peu probable. Nous savons depuis peu que au moins 34 autres exons ont été individualisés, ces exons sont tous de plus petite taille. L'hypothèse d'un épissage alternatif demeure envisageable, mais n'affecterait pas la taille des transcrits de façon aussi conséquente que l'aspect de continuum en Northern blot ne le laissait penser (taille de l'ARNm : 17,5 kb; taille de l'exon répétitif : 10,713 kb).

De plus, il a pu être montré au laboratoire que les gènes MUC 2, MUC 5AC, MUC 5B et MUC 6 sont organisés en une famille de gènes dans la même région chromosomique 11p15.5, dérivant probablement d'un gène précurseur ancestral commun et possédant un schéma d'organisation génomique commun.

Des travaux menés à San Francisco à propos de MUC 2, et à Lille à propos de MUC 5AC, montrent, bien que la démonstration ne soit pas encore absolue, que les domaines répétitifs de ces gènes puissent être contenus eux aussi dans un seul exon.

Peu à peu s'est imposée l'idée que l'hétérogénéité présumée des ARNm d'apomucines pouvait être essentiellement liée à une inadéquation des méthodes utilisées habituellement pour les purifier, vis à vis de leurs propriétés inhabituelles : grande taille et structure répétitive.

Nous avons pu définir et proposer un protocole précis de purification et d'analyse des ARNm d'une taille de l'ordre de 20 kb. Ainsi l'utilisation de sonde comme la  $\beta$ -actine n'est pas adaptée pour contrôler l'intégrité des ARNm lorsque les transcrits étudiés se situent dans les grandes tailles. Nos résultats ont été confirmés par l'utilisation d'une sonde correspondant à un grand transcrit (ApoB).

Nous avons pu montrer que les ARNm codant les apomucines MUC 2 à MUC 6 ont une taille comprise entre 14 et 22 kb, ce qui place ces molécules d'ARNm au rang des plus grandes jamais décrites. Le "record" de taille serait détenu par la titine qui possède le plus grand ARNm (23 kb) et qui est aussi la plus grande protéine de mammifère (3000kDa).

Si l'on en croit Noara et Coll. [156], qui ont étudié les molécules fossiles impliquées dans l'information génétique, une taille d'environ 20 kb correspond à un maximum pour qu'un polynucléotide simple brin, ADN ou ARN, ait une stabilité physico-chimique compatible avec une fonction biologique. En effet, cette taille d'environ 20 kb apparaît toujours être une limite supérieure, même dans le cas des polynucléotides simples brins viraux.

Les tailles des ARNm de mucines que nous avons déterminées sont en accord avec des travaux récents portant sur l'étude des précurseurs des mucines humaines. Des anticorps monoclonaux ont été utilisés pour immunoprécipiter, puis analyser par SDS/PAGE, les précurseurs peptidiques correspondant aux différents gènes de mucines. Cette étude a permis de montrer que les apomucines sont synthétisées dans le RER sous forme de précurseurs N-glycosylés de très haut poids moléculaire. Après oligomérisation, ils sont O-glycosylés, on obtient alors des mucines matures [224].

L'analyse par SDS/PAGE a permis pour chaque gène de mucine d'estimer la taille de son précurseur : 600 kDa pour MUC 2, 550 kDa pour MUC 3, 900 kDa pour MUC 4, 500 kDa pour MUC 5AC et 400 kDa pour MUC 6.

Les tailles des ARNm que nous avons déterminées sont donc compatibles avec la taille du transcrite nécessaire pour la synthèse de ces très grands polypeptides.

Nous avons pu constater dans les différents tissus étudiés, la présence d'un ou deux transcrits pour chaque gène. Lorsque deux transcrits pouvaient être caractérisés, l'étude du domaine répétitif au niveau génomique a permis de montrer qu'il s'agissait en fait de deux allèles et ainsi de démontrer qu'il s'agissait de polymorphisme.

Il s'agit ici d'un polymorphisme de type V.N.T.R., c'est à dire d'une variation de longueur de l'ARNm en rapport avec le nombre d'unités élémentaires dans le domaine répétitif, support de la O-glycosylation. Ceci implique probablement, lorsque deux transcrits distincts

sont présents, la synthèse de deux précurseurs peptidiques de tailles différentes plus ou moins proches et présents en quantité équivalente. Ceci a été montré pour le gène MUC 1, premier gène de mucine dont le polymorphisme de type V.N.T.R. a été décrit, où les mêmes variations alléliques ont été démontrées au niveau protéique, et où de plus, les produits peptidiques sont codominants [209].

Une étude portant sur les précurseurs peptidiques des mucines coliques de rat a mis en évidence un précurseur de 600 kDa et un polymorphisme de taille de ce précurseur entre les différents rats[219]. De plus, chez certains rats, deux précurseurs de tailles différentes sont présents. Ces données biochimiques sont donc en parfaite concordance avec nos résultats.

Le nombre de tissus étudiés pour l'instant, ne permet pas une analyse statistique mais il nous a permis néanmoins de voir que les variations de tailles affectaient de façon différente les apomucines étudiées. Dans le cas de MUC 5B, un transcrite unique (17,5 kb) a été observé. Ceci est en concordance avec un travail réalisé au laboratoire [168], qui a montré que le fragment contenant le domaine répétitif de MUC 5B a une taille constante de 16,5 kb dans une série de 54 sujets : 52 sujets sont homozygotes pour cet allèle, 2 sujets sont hétérozygotes et présentent un allèle de taille différente : 20 kb pour le plus grand et 14 kb pour le plus petit, à côté de l'allèle de taille habituelle. Il reste à vérifier dans ces 2 cas, s'il s'agit réellement de polymorphisme de type V.N.T.R. et non d'un polymorphisme de restriction.

Concernant le polymorphisme de MUC 2, MUC 3 et MUC 5AC, les tailles des ARNm mesurées sont en parfait accord avec les données disponibles [168, 215].

Dans notre étude, MUC4 s'est distingué, sur cinq individus analysés, quatre allèles différents ont été caractérisés. Les variations de tailles observées au niveau des messagers sont importantes : le plus petit mesure 16,5 kb et le plus grand 22 kb, ce qui signifie une variation de 5,5 kb, c'est à dire 114 répétitions de 48 nucléotides entre ces deux allèles de tailles extrêmes. Ce chiffre correspondrait à une différence d'environ 800 chaînes glycaniques si les sept sérine et thréonine présentes dans chaque domaine élémentaire sont réellement glycosylées. Un travail d'étude du polymorphisme réalisé pour l'instant au niveau de l'ADN au



laboratoire et portant sur 85 sujets, montre des variations de taille beaucoup plus importantes que celles mesurées ici sur cette courte série.

En conclusion, le développement technologique réalisé ici nous permet maintenant de retrouver avec le Northern blot un outil utile aux analyses *qualitatives* et *quantitatives* et d'envisager toute une série d'études portant sur l'expression des gènes d'apomucines et de répondre aux interrogations sur les relations entre polymorphisme de type V.N.T.R. et pathologie. Dans ce but, un travail relatif au polymorphisme du gène MUC 4 dans la maladie de Crohn est en cours.

Il nous permettra également d'analyser les transcrits tumoraux et si possible fœtaux. Un autre travail relatif aux modifications d'expression des apomucines dans les tumeurs bronchopulmonaires et les tumeurs de l'oesophage a pu se mettre en place.

Nous espérons enfin pouvoir rechercher si les gènes d'apomucines sont capables par épissage alternatif de donner naissance à des formes courtes, comme par exemple, celles dépourvues du domaine répétitif mises en évidence à propos du gène MUC 1.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

---

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

## I PREPARATION DES ARN TOTAUX

### 1- Technique utilisée dite "classique"

La technique utilisée a été adaptée à partir de la technique décrite par Chirgwin [46].

Les prélèvements chirurgicaux provenaient des services de chirurgie du C.H.R. de Lille.

Les prélèvements provenant de dons d'organes ont été effectués avec l'approbation du comité d'éthique local.

Les échantillons de muqueuses prélevés sont sidérés et conservés dans l'azote liquide jusqu'à leur utilisation.

L'ARN est plus difficile à étudier que l'ADN parce qu'il est très sensible aux RNases, en particulier la RNase A, celle-ci est ubiquitaire, extrêmement active et très résistante par rapport aux autres enzymes, par exemple, un traitement à 90 °C pendant une heure n'altère pas son activité. Toute préparation et manipulation d'ARN doit être effectuée le plus stérilement possible : les tampons et l'eau sont traités au DEPC (diéthylpyrocarbonate) puis autoclavés, le matériel est aussi autoclavé quand cela est possible, sinon il est traité la nuit dans la soude 1N puis rincé soigneusement à l'eau DEPC juste avant son utilisation. De plus le port de gants permet d'éviter un apport exogène de RNases.

Le tissu (environ 1 à 5 g) est broyé sous azote liquide dans un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.

On ajoute 60 ml de tampon GT, auquel on a ajouté extemporanément du  $\beta$ -mercaptoéthanol (356  $\mu$ l pour 50 ml de tampon GT). Ce tampon associe un détergent (sarcosyl), un agent dissociant (isothiocyanate de guanidinium) et un agent réducteur ( $\beta$ -mercaptoéthanol).

Le mélange dégelé, est homogénéisé à l'aide d'un homogénéiseur (Sorvall) 2 fois 10 secondes à vitesse maximale. Le mélange est ensuite passé sur une gaze stérile pour éliminer le tissu conjonctif. Puis, afin de diminuer la viscosité, l'ADN est cassé par des passages successifs de cet homogénat au travers de 2 aiguilles de diamètres décroissants (environ 6 fois chacune).

On ajoute à l'échantillon 24 g de chlorure de césium (4g pour 10 ml de tampon GT de départ). Six tubes contenant chacun un coussin de 3,2 ml de chlorure de césium 5,7M sont préparés. Lorsque le chlorure de césium de l'échantillon est bien dissous, le mélange divisé en 6 est déposé délicatement sur les coussins de chlorure de césium. Les tubes sont ensuite équilibrés 2 à 2 grâce à une solution constituée de 5 ml de tampon GT et 2g de chlorure de césium.

Les tubes sont ensuite centrifugés dans une ultracentrifugeuse Beckman L8-80 (rotor SW 41) à 29 500 tours/mn pendant 16 heures à 18 °C.

L'utilisation de l'ultracentrifugation repose sur le fait que la densité de l'ARN est très supérieure à celle de l'ADN. Ainsi, seul l'ARN est capable de traverser le coussin de chlorure de césium 5,7M.

Au bout de 16 heures de centrifugation, l'ARN est récupéré au fond du tube, alors que l'ADN flotte à la surface du coussin.

Après avoir éliminé très délicatement le surnageant, le culot d'ARN est repris par 2 x 1 ml TE 1X; SDS 0,1%.

L'ARN est alors purifié par une extraction avec 2 volumes de chloroforme/n-butanol (4/1, v/v). Les tubes sont mélangés au vortex et centrifugés à 3 000 tours /mn pendant 5 mn. La phase aqueuse (phase supérieure) contenant l'ARN est récupérée et mise dans un nouveau

tube, la phase organique est réextraite par 2 ml de TE 1X; SDS 0,1%. Après une seconde centrifugation, la phase aqueuse est récupérée, les 2 phases aqueuses sont réunies.

L'ARN est alors précipité par l'addition de 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,5 et 2,2 volumes d'éthanol absolu froid (conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ ), pendant une nuit à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

L'ARN est ensuite précipité par une centrifugation à 10 000 tours/mn pendant 30 mn (Beckman J21, rotor JS 13.1). Le surnageant est éliminé en grande partie (on laisse environ 0,5 ml car le culot d'ARN n'adhère pas au fond du tube).

Le culot d'ARN est alors lavé par plusieurs étapes :

- 1 lavage avec 5 ml de NaCl 0,2M 30% et d'éthanol froid 70% (v / v);
- 3 lavages avec 5 ml d'éthanol froid à 95% (v / v);
- 1 lavage avec 5 ml d'éthanol absolu froid.

Entre chaque lavage, le tube est mélangé au vortex et centrifugé 15 mn à 10 000 tours/mn, le surnageant est éliminé mais, à chaque fois on laisse environ 0,5ml.

Le culot est séché sous-vide, puis il est repris par 50 à 200  $\mu\text{l}$  d'eau DEPC. L'ARN est ainsi conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Le dosage et la pureté de l'ARN sont estimés par analyse spectrophotométrique à 230, 260 et 280 nm, les acides nucléiques absorbent à 260 nm.

Le dosage est réalisé à partir d'un aliquot dilué dans 1 ml d'eau. Une unité de D.O. correspond à 40  $\mu\text{g/ml}$  d'ARN.

La pureté de l'ARN est appréciée par 2 critères :

- une éventuelle contamination protéique est écartée si le rapport de la D.O. à 260 nm sur la D.O. à 280 nm est compris entre 1,8 et 2;
- une éventuelle contamination par des solvants est écartée si le rapport de la D.O. à 260 nm sur la D.O. à 230 nm est supérieur à 2.

## 2- Autres techniques testées

D'autres techniques ont été utilisées pour vérifier si le même profil hétérogène est obtenu, quelle que soit la technique utilisée, elles ont la caractéristique de ne pas comporter d'étape d'ultracentrifugation.

### *a- la méthode urée/LiCl*

Cette technique a été décrite par Auffray et Coll. [3].

Le tissu est homogénéisé à l'aide d'un pilon, dans un mortier, sous azote liquide, jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Puis, 10 ml de tampon LiCl/urée sont ajoutés.

Le mélange dégelé est homogénéisé dans un homogénéiseur (Sorvall) 2 fois 10 secondes. Le mélange est ensuite passé sur une gaze stérile pour éliminer le tissu conjonctif.

L'ARN est mis à précipiter la nuit à 4°C.

Le tube est centrifugé à 10 000 tours/minutes pendant 30 minutes, à 4°C.

Le précipité est dissous dans 5 à 10 ml de tampon Tris 10mM pH7,6; SDS 0,5%

L'ARN est ensuite purifié par une extraction avec 1 volume de chloroforme/phénol (1/1; v/v). Les tubes sont mélangés au vortex et centrifugés à 3000 tours/minutes pendant 15 minutes. La phase aqueuse est récupérée, l'étape de purification est répétée jusqu'à ce que la phase aqueuse ne soit plus trouble. Puis, on ajoute 1 volume de chloroforme/alcool isoamylique (v/v; 240/10). Le tube est mélangé au vortex puis centrifugé 15 minutes à 3000 tours/minutes.

L'ARN est précipité par 0,1 volume d'acétate de sodium 2M pH6,8 et 2 volumes d'éthanol absolu.

L'ARN est récupéré par une centrifugation de 30 minutes à 10 000 tours/mn. Le surnageant est éliminé.

Le culot d'ARN est ensuite lavé, repris et dosé comme décrit précédemment

*b- la technique décrite par Chomczynski [48]*

Cette technique possède des caractéristiques décrites dans les 2 techniques précédentes : elle utilise le tampon GT comme agent dissociant et le  $\beta$ -mercaptoéthanol comme agent réducteur, mais n'utilise pas l'ultracentrifugation pour purifier l'ARN comme dans la technique décrite par Chirgwin, mais une purification basée sur l'utilisation du phénol comme la technique décrite par Auffray.

Nous avons testé des kits "adaptés", commercialisés par Clontech (Total RNA Separator kit) et Promega (RNagents Total RNA Isolation System), utilisés dans les conditions recommandées par les fabricants.

## **II ANALYSE DES ARN PAR LA TECHNIQUE DE NORTHERN BLOT**

### **1- Electrophorèse des ARN en milieu dénaturant-formamide : technique utilisée**

*a- préparation du matériel et des échantillons*

La cuve d'électrophorèse, le peigne et le barreau aimanté sont laissés la nuit dans la soude 1N et rincés abondamment juste avant leur utilisation avec de l'eau DEPC, l'élimination de la soude est vérifiée au papier pH.

20 µg de l'ARN ainsi préparé sont précipités par addition de 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,5 et 2,2 volumes d'éthanol absolu froid, au moins 2 heures à -80°C. Après centrifugation à 10 000 tours/mn pendant 30 mn, le culot est séché et repris dans 10 µl de tampon de dénaturation.

#### *b- électrophorèse*

Le gel d'agarose (0,9%) est préparé de la façon suivante : à 0,81 g d'agarose, on ajoute environ 65 ml d'eau DEPC, le mélange est porté à ébullition pour bien dissoudre l'agarose, puis laisser à refroidir avant d'ajouter 16 ml de formaldéhyde désionisée, 9 ml de MOPS 10X et compléter à 90 ml avec de l'eau DEPC.

Après environ 1 heure, lorsque le gel est bien solidifié, l'échantillon d'ARN est dénaturé à 68°C pendant 10mn. Il est ensuite maintenu dans la glace, puis on ajoute 3 µl de bleu de bromophénol. L'échantillon est ensuite déposé dans le gel, la migration débute par 30 mn à 50 volts. Puis la migration est poursuivie à 30 volts pendant 16 heures sous agitation.

Le lendemain, le gel est rincé par 3 bains successifs de 10 mn en SSC 10X afin d'éliminer la formaldéhyde, puis équilibré en SSC 20X.

L'intégrité des ARN est contrôlée en posant le gel sur une plaque de silice et en visualisant sous une lampe U.V les 2 bandes ribosomales correspondant aux ARN 28S et 18S. De plus, la distance de migration de ces 2 bandes est mesurée afin de pouvoir tracer la droite d'étalonnage.

## **2- Electrophorèse des ARN en milieu dénaturant-glyoxal : autre technique testée**

#### *a- préparation des échantillons*

Le matériel est utilisé dans les mêmes conditions que décrites précédemment.



L'échantillon d'ARN (environ 20µg) est dénaturé pendant une heure à 50°C, dans un tampon glyoxal 1M; tampon phosphate 10mM pH6,5.

#### *b- électrophorèse en tampon phosphate*

Le gel est préparé comme décrit précédemment en remplaçant le tampon de préparation du gel et le tampon de cuve par un tampon contenant 0,01M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.

Après l'étape de dénaturation, l'ARN est refroidi à -20°C, et est déposé comme précédemment.

### **3- Transfert et hybridation**

#### *a- transfert*

Les ARN équilibrés en SSC 20X sont transférés sur une membrane de nylon N<sup>+</sup> par transfert sous vide pendant 1 heure. La fixation covalente de l'ARN sur le support est assurée par chauffage de la membrane à 80°C pendant 30 mn sous vide partiel puis par une exposition aux U.V. pendant 3mn30.

#### *b- préhybridation et hybridation*

La membrane est rincée en SSPE 6X puis préhybridée pendant au moins 2 heures en tampon de préhybridation/hybridation ARN à 42°C. Ce tampon est ensuite remplacé par du tampon frais, puis on ajoute la sonde marquée (1.10<sup>6</sup> c.p.m./ml), l'hybridation est réalisée par une incubation d'une nuit à 42°C.

Le lendemain, l'excès de sonde non fixée est éliminée par un rinçage en SSPE 6X, 2 lavages de 15 mn en SSPE 0,1X; SDS 0,1%, à 65°C, suivis d'un rinçage en SSPE 6X.

La membrane est mise en autoradiographie à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant des temps variables en fonction de l'intensité de l'expression (de quelques heures à 3 semaines).

Avant de tester une autre sonde, la membrane est déshybridée par une solution de SDS 0,1% bouillant. La déshybridation est contrôlée par autoradiographie.

### III SELECTION DES ARN POLY(A<sup>+</sup>)

#### 1- Affinité sur colonne d'oligo dT cellulose

L'oligo dT cellulose (à raison de 100 mg d' oligo dT/mg d'ARN) est équilibrée en tampon d'équilibrage (au moins 5 volumes).

L'ARN est dénaturé à  $68^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes, est mis dans de la glace et est repris par 1 volume de tampon de dépôt.

L'ARN est déposé sur la colonne.

Les ARN poly(A<sup>-</sup>) sont élués.

Les ARN poly(A<sup>+</sup>) sont décrochés par un tampon de décrochage, puis sont précipités par 0,1 volume d'acétate de sodium 2M pH6,8 et 2,2 volumes d'éthanol absolu froid, la nuit à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Après une centrifugation de 30 minutes à 10 000 tours/minutes, le culot d'ARN est lavé par plusieurs étapes :

- 1 lavage avec 5 ml de NaCl 0,2M 30% et d'éthanol froid 70% (v / v);
- 3 lavages avec 5 ml d'éthanol froid à 95% (v / v);
- 1 lavage avec 5 ml d'éthanol absolu froid.

Le culot est séché sous-vide, puis il est repris par 50  $\mu\text{l}$  d'eau DEPC. L'ARN est ainsi conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Le dosage et la pureté de l'ARN sont estimés par analyse spectrophotométrique à 260 nm.

## 2- Affinité sur billes magnétiques

Pour cela, nous avons utilisé un kit commercialisé par Promega : PolyAtract mRNA Isolation System III, utilisé dans les conditions recommandées par le fabricant.

# IV ETUDE DE LA DEMI-VIE DES ARNm DE MUCINES

## 1- Culture des cellules HT29-MTX

La lignée cellulaire d'adénocarcinome colique HT-29 MTX a été isolée par sélection à partir de la lignée HT-29 "standard" avec une drogue anticancéreuse : le méthotrexate, à une concentration  $10^{-6}$  M [139b]. Les cultures de cellules ont été réalisées en collaboration avec G. Huet (unité INSERM N°377) et M. Collyn (unité INSERM N°124).

Les cellules sont cultivées dans le milieu DMEM (GIBCO), auquel on ajoute 10% de sérum de veau foetal. Les cellules sont maintenues dans une atmosphère à 10% de CO<sub>2</sub>.

Les repiquages sont réalisés à partir d'un flacon de 25 cm<sup>2</sup> à 80% de confluence (soit entre le 5<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour pour les cellules HT-29).

Après élimination du milieu de culture, les cellules sont détachées par addition de 2 à 3 ml de trypsine à 0,25% dans du PBS/EDTA 1%, pendant 10 minutes à 37°C.

Après dissociation des cellules à l'aide d'une pipette, l'excès de trypsine est neutralisé par transvasement dans un tube contenant 10 ml de milieu de culture avec sérum de veau foetal.

Les cellules sont récupérées par une centrifugation à 1 500 tours/mn pendant 5mn.

Après avoir éliminer le surnageant, le culot cellulaire est repris par 10 ml de milieu de culture. Un comptage est réalisé en cellule de Malassez.

Les cellules sontensemencées à raison de  $1,5 \cdot 10^6$  cellules par flacon de  $75 \text{ cm}^2$ .

A partir du surlendemain (de façon à ce que les cellules aient bien adhéré au fond de la boîte), le milieu de culture est remplacé chaque jour.

## **2- Culture des cellules en présence d'actinomycine D (avec ou sans cycloheximide)**

Après 14 jours de culture, on incube les cellules (environ  $5 \cdot 10^7$  cellules) avec de l'actinomycine D à une concentration de  $8 \mu\text{g/ml}$  finale. Une solution mère d'actinomycine D 100X est préparée dans du DMSO (soit  $0,8 \text{mg/ml}$ ). Lorsque de la cyclohexomide est utilisée, elle est ajoutée 2 heures avant l'addition d'actinomycine D à une concentration de  $10 \mu\text{g/ml}$  finale.

Ces incubations sont réalisées pendant différents temps : 3, 6, 9, 16 et 24 heures. Une culture Témoin sans actinomycine D a été effectuée en parallèle.

Les cellules sont ensuite récupérées pour l'extraction de l'ARN.

Le milieu de culture est éliminé, les cellules sont rincées 3 fois avec 10 ml de PBS;et sont récupérées dans 10 ml de PBS à l'aide d'un grattoir et transférées dans un tube stérile.

Le flacon est rincé avec 5 ml de PBS qui est ensuite ajouté au tube précédent.

Après centrifugation à 1 500 tours/mn pendant 5 mn, on récupère ainsi le culot de cellules (avec du mucus), qui est remis en suspension dans 3 ml de tampon GT;

Le tube immédiatement est plongé dans l'azote liquide et conservé à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'à la préparation de l'ARN (voir paragraphe préparation de l'ARN, méthode de Chirgwin).

## V QUANTIFICATION DES ARN PAR LA TECHNIQUE DE DOT BLOT

### 1- Préparation des échantillons

0,5 à 1,5  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux préparés par la technique de Chirgwin (décrite précédemment) sont repris dans 25  $\mu\text{l}$  de tampon de dénaturation puis 25  $\mu\text{l}$  de SSC X sont ajoutés à chaque échantillon.

Après une étape de dénaturation de 10 minutes à 68°C, les tubes sont mis dans la glace et 100  $\mu\text{l}$  de SSC 20X sont ajoutés.

### 2- Transfert et hybridation

Les ARN sont ensuite déposés dans les puits d'un appareil à dot blot et ainsi sont transférés sous vide sur une membrane de nylon N<sup>+</sup> préalablement saturée en SSC 20X. Les puits sont rincés avec 500  $\mu\text{l}$  de SSC 10X puis l'ARN est fixé sur la membrane par un chauffage à 80°C sous vide partiel pendant 30 minutes puis par une exposition aux U.V. pendant 3 minutes 30.

La membrane est rincée en SSPE 6X et préhybridée au moins 2 heures dans du tampon préhybridation/hybridation ARN à 42°C. Après avoir remplacé le tampon, on ajoute la sonde marquée (1.106 c.p.m./ml), l'hybridation est réalisée la nuit à 42°C.

Le lendemain, l'excès de sonde non fixée est éliminé par un rinçage en SSPE 6X suivi de 2 lavages de 15 mn en SSPE 0,1X; SDS 0,1% à 65°C. La membrane est rincée en SSPE 6X.

### 3- Quantification

La membrane est placée dans une cassette qui pourra être lue grâce au PhosphorImager 445SI (Molecular Dynamics).

La quantité d'ARN correspondant à chaque gène de mucines est estimée par l'appareil qui compte le nombre de c.p.m. pour chaque dépôt.

## VI PREPARATION DE L'ARN NUCLEAIRE, POLYSOMAL ET CYTOPLASMIQUE

Les échantillons de muqueuses prélevés sont sidérés et conservés dans l'azote liquide jusqu'à leur utilisation.

Toutes les manipulations ont été réalisées à 4°C et le plus stérilement possible (tampons et matériel stérilisés, eau DEPC, gants...).

Après de nombreux essais, nous avons mis au point une technique combinant deux protocoles publiés [131, 242].

Le tissu est broyé et homogénéisé sous azote liquide, dans un mortier, avec 10 ml de tampon (sucrose 0,25M; KCl 100mM; acétate de magnésium 5mM; Tris-HCl 20mM pH7,6;  $\beta$ -mercaptoéthanol 10mM; dithiotréitol 2mM, et 1unité/ $\mu$ l de RNasin) jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.

Le mélange est dégelé lentement et homogénéisé dans un Potter-Elvehjem (15 coups). La lyse cellulaire est contrôlée grâce à l'utilisation de bleu trypan. Les noyaux sont précipités par une centrifugation à 10 000 tours/minutes pendant 10 minutes à 4°C. Le culot contenant les noyaux est repris dans du tampon GT (pour la préparation d'ARN).

Le surnageant est récupéré délicatement et déposé sur un coussin de 3 ml de sucrose (sucrose 1M; KCl 100mM; acétate de magnésium 5mM; Tris-HCl 20mM pH7,6;  $\beta$ -mercaptoéthanol 10mM; dithiotréitol 2mM et 0,1 unité/ $\mu$ l de RNasin).

Les tubes sont ensuite centrifugés dans une ultracentrifugeuse Beckman L8-80 (rotor SW41) à 38 000 tours/minutes pendant 3 heures à 4°C.

Le culot contenant l'ARN polysomal ainsi que le surnageant contenant l'ARN cytoplasmique sont repris dans du tampon GT.

L'extraction de l'ARN correspondant à ces 3 fractions (reprises dans du tampon GT) est ensuite poursuivie de la même façon que pour une préparation d'ARN total.

Après purification, l'ARN est analysé par la technique de Northern blot.

## VII ELECTROPHORESE D'ARN EN CHAMPS PULSES

### 1- Matériel

L'appareil utilisé a été conçu à l'unité n°124 INSERM.

Il s'agit de la technique CHEF (Contour clamped Homogeneous Electric Field).

Il est composé de :

- un générateur Apelex qui débite un courant stable d'une tension de 0 à 500 volts et d'une intensité de 0 à 500mA;
- un pulseur (Multicomat) qui alterne les deux champs électriques dans les deux directions différentes de façon régulière;
- un microprocesseur qui permet la programmation des paramètres de migration;
- une cuve qui peut contenir 5 litres de tampon d'électrophorèse;
- un système de refroidissement permettant la circulation permanente du tampon d'électrophorèse afin de maintenir une température constante (12°C).

### 2- Préparation des échantillons d'ARN

L'échantillon d'ARN total (environ 20µg) est mélangé au tampon de dénaturation dans un volume total de 40 µl. Il est chauffé 10mn à 68°C puis est mélangé à 40 µl de gel d'agarose 1% (MOPS 1X ,17% formaldéhyde) maintenu à 68°C. Le mélange est coulé dans un moule (qui a été décontaminé à la soude), composé de plusieurs puits (0,6 x 0,15 x 0,9 cm soit 80 µl).

Après solidification (environ 30 mn sur la glace), les blocs sont démoulés et déposés en haut du gel.

### 3- Paramètres utilisés pour l'électrophorèse

#### *a- le gel d'agarose et le tampon d'électrophorèse*

La cuve avec le système de circulation pour le refroidissement ainsi que les plaques utilisées pour couler le gel sont laissées la nuit dans de la soude 1N pour éviter tout risque de contamination par des RNases. Le matériel est rincé soigneusement juste avant l'utilisation.

Le gel est préparé comme pour une électrophorèse classique, il contient 1% d'agarose et est préparé dans du MOPS 1X et 17% de formaldéhyde désionisée. Il est coulé entre deux plaques de 15x15 cm. La cuve contient 5 litres de MOPS 0,5X.

#### *b- l'électrophorèse*

Pour déterminer les paramètres de l'électrophorèse, nous nous sommes inspirés des conditions mises au point pour la séparation optimale des molécules d'ADN [80]. Comme nous voulions séparer des molécules dont les tailles varient jusqu'à environ 30kb, nous avons alors utilisé les conditions suivantes :

2 temps de pulse : 15 secondes pendant 24 heures, puis 30 secondes pendant 16 heures.

### 4- Transfert et hybridation

Après l'électrophorèse, le gel est trempé 3 fois 10 mn dans du SSC 10X puis équilibré pendant 10mn dans du SSC 20X, pour éliminer la formaldéhyde. Ensuite, l'ARN est transféré sur un membrane N<sup>+</sup> par transfert sous-vide pendant 1 heure en SSC 20X. La membrane est ensuite séchée 30 mn à 80°C sous-vide partiel et le matériel est fixé sur la membrane de nylon par une exposition de 3mn30 aux U.V..



La membrane est ensuite humidifiée en tampon SSPE 6X et incubée au minimum 2 heures en tampon de préhybridation/hybridation ARN à 42°C (étape de préhybridation). Le tampon est éliminé et remplacé par du tampon frais, la sonde radioactive est ajoutée ( $1.10^6$  c.p.m./ml de tampon), le contact membrane/sonde est laissé toute la nuit à 42°C.

L'excès de sonde non fixée est éliminé :

- un rinçage en SSPE 6X;
- deux lavages de 15 mn en SSPE 0,1X/SDS 0,1%;
- un rinçage dans du SSPE 6X.

La membrane est ensuite mise en autoradiographie à -80°C pendant des temps variables en fonction de l'intensité du marquage.

## **VIII ANALYSE DE L'ADN GENOMIQUE PAR LA TECHNIQUE DE SOUTHERN BLOT.**

La technique de Southern blot décrite en 1975 permet de visualiser une séquence unique d'ADN. Elle comporte les étapes suivantes :

- la préparation de l'ADN génomique;
- l'hydrolyse de l'ADN par une ou plusieurs enzymes de restriction appropriées;
- la séparation des fragments en fonction de leur taille par une électrophorèse en gel d'agarose;
- la dénaturation *in situ* de l'ADN;
- le transfert de l'ADN sur un support (membrane de nylon);
- l'hybridation avec une sonde monobrin radioactive (marquée au  $^{32}\text{P}$ );
- les lavages et la révélation du signal par autoradiographie.

## 1- Préparation de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée à partir de sang selon la méthode de M. Jeanpierre [118]. Cette technique utilisant le chlorure de guanidinium, a l'avantage d'éviter l'emploi de phénol :

### *a- lyse cellulaire*

Un prélèvement sanguin (environ 10 ml) est recueilli sur un anticoagulant (EDTA) et est congelé.

Au moment de l'utilisation, l'échantillon est décongelé et est mélangé vigoureusement à 40 ml d'une solution de lyse (Tris 10mM pH7,4-EDTA 10mM).

Une centrifugation de 10 mn à 3 000g permet l'élimination du surnageant, de l'hémoglobine ainsi que les autres constituants solubles. Plusieurs lavages (5 à 6) sont réalisés jusqu'à l'obtention d'un culot de débris et de noyaux pratiquement blanc.

### *b- protéolyse*

On ajoute 14 ml d'hydrochlorure de guanidinium 6M filtré au culot (dénaturant protéique) qui est homogénéisé par une agitation ménagée dans un automate de type "turbula", pendant environ 30 mn. Puis on ajoute 2 ml de détergent anionique (sarcosyl à 10%) et 150 µl de protéinase K (à 10 mg/ml et préparée extemporanément). Le mélange est incubé une heure à 60 °C ou une nuit à 37 °C.

### *c- précipitation de l'ADN*

L'ADN est précipité par l'addition de 1 ml d'acétate d'ammonium 7,5M et d'éthanol absolu froid (Q.S.P. 50ml). Il est ensuite récupéré par enroulement autour d'une baguette de verre et rincé 4 fois dans de l'éthanol à 70% (v/v). L'ADN purifié est ensuite remis en solution dans du TE 1X (4 ml pour un tube de départ de 10 ml de sang) et mis 48 heures sous agitation pour une bonne homogénéisation.

### *d- quantification et pureté*

La concentration de l'ADN obtenu est calculée par spectrophotométrie, la densité optique (D.O.) est mesurée à 260 nm, sachant qu'une unité de D.O. correspond à 50 µg/ml. La pureté de l'ADN est estimée par le rapport de la D.O. à 260 nm sur la D.O. à 280nm qui doit être proche de 2.

D'autre part, l'absence de dégradation de l'ADN est contrôlée par une électrophorèse dans un gel d'agarose à 0,8% en tampon TBE contenant du bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml. La migration est réalisée à fort voltage pendant une heure et demi environ. Si l'ADN est de bonne qualité, il doit migrer sous la forme d'une bande d'environ 50 kb, sinon de l'ADN dégradé migre sous la forme d'une trainée.

Les solutions d'ADN sont stockées à 4°C.

## **2- Hydrolyse enzymatique**

L'hydrolyse est réalisée sur 10 à 40 µg d'ADN avec 5 à 10 unités d'enzyme par µg d'ADN dans les conditions optimales recommandées par le fabricant. Le temps d'incubation est de l'ordre de 24 heures. Une recharge d'enzyme peut être ajoutée au bout de 6 heures si nécessaire.

## **3- Electrophorèse**

Les fragments d'ADN hydrolysés sont ensuite séparés par une électrophorèse dans un gel d'agarose à 0,8%, en tampon phosphate et contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg/ml), pendant une nuit à 20 volts.

Sur chaque gel est déposé un témoin de masse moléculaire. Ce marqueur "13i" est l'ADN d'un phage recombinant hydrolysé par l'enzyme de restriction EcoRI qui libère 8 fragments dont les tailles sont : 33 / 22 / 11 / 4,3 / 3,2 / 2 / 1,3 et 0,5 kb.

## **4- Transfert**

Le gel d'électrophorèse est trempé 2 fois 30mn dans du tampon de dénaturation (NaCl 1,5M; NaOH 0,5N) pour dénaturer l'ADN. Le gel est ensuite rincé en eau désionisée, puis

neutralisé par 2 bains de 30 mn dans du tampon de neutralisation (Tris-HCl 0,5M pH7,5; NaCl 3M). L'ADN est alors transféré sous-vide sur une membrane de nylon N<sup>+</sup> en tampon SSC 20X pendant 2 heures. L'ADN est ensuite fixé sur la membrane par une exposition de 3mn aux U.V.(312nm).

## 5- Hybridation à une sonde nucléique

### *a- préhybridation et hybridation*

La membrane est rincée en SSC 6X et préhybridée par une incubation d'au moins 1 heure à 65°C dans du tampon de préhybridation, de tampon. Cette étape de préhybridation consiste à saturer ses sites afin d'obtenir une fixation spécifique de la sonde d'ADN marquée. Puis ce tampon est remplacé par tampon d'hybridation, auquel on ajoute la sonde marquée avec de l' $\alpha^{32}\text{PdCTP}$ . L'hybridation a lieu toute la nuit à 65°C.

### *b-lavages*

L'excès de sonde est éliminé par plusieurs lavages :

- rinçage de la membrane en SSC 2X;
- lavage : 2 fois 15 mn en tampon SSC 2X à 65°C ou 2 fois 15 mn en tampon SSC 2X; SDS 0,1%;
- rinçage dans du SSC 2X.

### *c- autoradiographie*

La membrane est alors mise en autoradiographie à -80°C pendant des temps variables (1 journée à 8 jours).

Avant de tester un autre sonde, la membrane est déshybridée par une solution de SDS à 0,1 % bouillant. La déshybridation est contrôlée par une autoradiographie.

## IX MARQUAGE DES SONDAS NUCLÉIQUES

La technique utilisée est le "multiprime" utilisant des amorces hexanucléotidiques et une extension par la Klenow en présence de  $\alpha^{32}\text{PdCTP}$  (Random Primed DNA labelling kit commercialisé par Boehringer, utilisé dans les conditions recommandées par le fabricant). Le principe est le suivant :

Le fragment d'ADN (25 ng) est chauffé à 95 °C afin de séparer les 2 brins. Après un refroidissement brutal, on ajoute un cocktail d'héxanucléotides synthétiques, des dATP, dGTP, dTTP et  $\alpha^{32}\text{dCTP}$ . Ces oligonucléotides hybridés au brins du fragment d'ADN servent alors d'amorce pour le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I, qui reconstitue le second brin et incorpore le dCTP radioactif. Les nucléotides non incorporés sont séparés de la sonde marquée par une chromatographie de gel-filtration. La sonde est ensuite dénaturée par la soude et neutralisée par de l'acide chlorhydrique.

## X PROTOCOLE ORIGINAL ADAPTE A LA PREPARATION DE GRANDS ARN

Cette technique dite "optimisée" reprend les grandes étapes de celle que nous avons décrite précédemment (les tampons et les quantités utilisés sont identiques).

Nous avons modifié peu à peu les paramètres qui nous semblaient pouvoir avoir un rôle dans la dégradation mécanique des ARN, c'est à dire que nous avons éliminé certaines étapes et nous avons en adapté d'autres :

1- la première étape importante est la collecte et le stockage du tissu : le tissu doit être sidéré dans l'azote liquide le plus rapidement possible après la résection.

2- le tissu est broyé sous azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Le tampon GT est ajouté dans le mortier et homogénéisé au tissu sous azote liquide, ainsi tout le volume

du tissu sera en contact avec du tampon GT lors de la décongélation. (dans la technique habituelle, le tampon GT est versé sur le tissu réduit en poudre, sans mélange préalable avant la décongélation).

3- l'échantillon dégelé est filtré sur gaze stérile, l'étape d'homogénéisation à l'aide d'un homogénéiseur est supprimé, ainsi que les passages à travers les aiguilles d'une seringue pour diminuer casser l'ADN.

4- l'échantillon est ensuite déposé directement et très délicatement sur le coussin de CsCl, et centrifugé dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus après centrifugation ont montré :

\*que la composition du tampon assure la lyse cellulaire sans utiliser l'homogénéiseur;

\*que l'ADN "flotte" dans le surnageant (visible à l'œil nu), il n'est pas retrouvé avec l'ARN et donc que l'étape de passage à la seringue pour casser l'ADN n'est pas indispensable, et au contraire pourrait entraîner la dégradation de l'ARN.

5- le culot est repris dans les mêmes conditions, excepté l'utilisation de la pipette Pasteur a été supprimé au profit de pipette à embout plus large type 10 ml. La mise en solution du culot se fait très délicatement en évitant des "pipetages" trop brusques.

6- la purification de l'ARN est poursuivie comme précédemment avec remplacement des étapes de mélange au vortex par un mélange par plusieurs retournements de tubes. Les mêmes précautions concernant le pipetage sont utilisées.

7- l'ARN est repris en eau DEPC, dosé et stocké à -80°C. Les étapes de congélation et décongélation doivent être évitées, l'ARN est aliquoté par tubes d'environ 10µg.

## **LEXIQUE DES FORMULES**

---

## LEXIQUE DES FORMULES

---

<b>Denhardt's 50X</b>	ficoll 400 -----1 g polyvinylpyrrolidone -----1 g sérumalbumine bovine -----1 g eau stérile----- qsp 100 ml filtrer sur filtre 0,22µm
<b>eau DEPC</b>	eau stérile----- 1 l DEPC (diéthylpyrocarbonate)----- 1 ml ajouter le DEPC sous hotte, agiter vivement, laisser minimum une nuit avant autoclavage.
<b>formamide désionisée</b>	résine AG 501X8 -----5 g formamide----- 100 ml sous agitation à l'abri de la lumière, récupère la formamide, recommencer avec 5g de résine neuve
<b>MOPS 10X</b>	MOPS ----- 10 g acétate de sodium 3M----- 4,2 ml EDTA 0,5M pH 8 ----- 5 ml eau DEPC ----- qsp 250 ml ajuster à pH 7(avec NaOH 3M),autoclaver
<b>PBS</b>	NaCl -----8 g KCl----- 0,2 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O ----- 1,78 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----0,24 g eau stérile-----qsp 1 l ajuster à pH 7,4 (avec HCl 1N)
<b>SSC 20X</b>	NaCl -----175 g citrate trisodique-----88,2 g eau stérile-----qsp 1 l ajuster à pH 7
<b>SSPE 20X</b>	NaCl -----174 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O-----27,6 g EDTA----- 7,4 g eau stérile-----qsp 1 l ajuster à pH 7,4 (avec NaOH 10N)



<b>TE 10X</b>	tris----- 12,1 g EDTA----- 2,9 g eau DEPC ----- qsp 100 ml ajuster à pH 7 (avec HCl 1N)
<b>Tampon de dénaturation des ARN-formamide</b>	formamide désionisée -----5 µl formaldéhyde désionisée----- 1,78 µl MOPS 10X-----1 µl ARN -----x µl eau DEPC ----- qsp 10 µl
<b>Tampon de dénaturation des ARN-glyoxal</b>	glyoxal 6M ----- 2,7 µl DMSO -----8 µl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,1M pH7 ----- 1,6 µl ARN -----x µl eau DEPC ----- qsp 16 µl
<b>Tampon préhybridation/ hybridation ARN</b>	formamide désionisée -----50 ml SSPE 20X-----25 ml Denhardt's 50X -----20 ml SDS -----2 g ADN de sperme de saumon(10mg/ml)1 ml eau stérile----- qsp 100 ml
<b>Tampon préhybridation ADN</b>	SSC 20X -----60 ml Denhardt's 50X -----20 ml SDS 10%-----10 ml eau stérile----- qsp 200 ml
<b>Tampon hybridation ADN</b>	SSC 20X -----60 ml Denhardt's 50X -----20 ml ADN de sperme de saumon(10mg/ml)5 ml sulfate de dextran----- 20 g SDS 10%-----10 ml eau stérile----- qsp 200 ml
<b>Tampon GT</b>	isothiocyanate de guanidinium ----- 23,6 g citrate trisodique-----73,5 mg sarcosyl ----- 250 mg eau stérile----- qsp 50 ml ajouter (sous hotte)du DEPC (1µl/ml), agitation vive, laisser minimum une nuit avant autoclavage, conserver à 4°C, à l'abri de la lumière. Extemporément, ajouter 357 µl de β-mercaptoéthanol

<b>Tampon LiCl/urée</b>	urée ----- 36,04 g LiCl ----- 16,96 g eau stérile----- qsp100 ml
<b>Gradient CsCl</b>	CsCl----- 24 g EDTA 0,1M pH 7,5----- 12,5 ml dissoudre au bain marie à 60°C EDTA 0,1M pH 7,5----- qsp 25 ml ajouter (sous hotte)du DEPC (1µl/ml), agitation vive, laisser minimum une nuit avant autoclavage, conserver à 4°C, à l'abri de la lumière.
<b>TE-SDS 10X</b>	Tris 1M pH8 ----- 5 ml EDTA 0,5M pH8----- 1 ml SDS 10%----- 5 ml eau DEPC ----- qsp 50 ml autoclaver. Préparer une solution au 1/10, autoclaver.
<b>Tampon d'équilibrage colonne oligodT cellulose</b>	Tris 0,1M pH7,6----- 50 ml NaCl 2M----- 62,5 ml SDS 10%----- 2,5 ml EDTA 0,1M pH 7,6----- 2,5 ml eau stérile----- qsp 250 ml
<b>Tampon de dépôt ARN poly(A<sup>+</sup>)</b>	Tris 0,1M pH7,6----- 20 ml NaCl 2M----- 25 ml SDS 10%----- 1 ml EDTA 0,1M pH 7,6----- 1 ml eau stérile----- qsp 50 ml
<b>Tampon de décrochage ARN poly(A<sup>+</sup>)</b>	Tris 0,1M pH7,6----- 25 ml SDS 10%----- 1,25 ml EDTA 0,1M pH 7,6----- 2,5 ml eau stérile----- qsp 250 ml

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [1] **ABE M. and KUFÉ D.**  
Transcriptional regulation of DF3 gene expression in human MCF-7 breast carcinoma cells.  
*J. Cell Physiol.*, 1990, 143 : 226-231
- [2] **ABE M. and KUFÉ D.**  
Characterization of cis-acting elements regulating transcription of the human DF3 breast carcinoma-associated antigen (MUC1) gene.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90 : 282-286
- [3] **AUFFRAY C. and ROUGEON F.**  
Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA.  
*Eur. J. Biochem.*, 1980, 107 : 303-314
- [4] **AGAWA S., MUTO T. and MORIOKA Y.**  
Mucin abnormality of colonic mucosa in ulcerative colitis associated with carcinoma and/or dysplasia.  
*Dis. Colon Rectum*, 1988, 31 : 387-389
- [5] **ALBONE E.F., HAGEN F.K., VANWUYCKHUYSE B.C., and TABAK L.A.**  
Molecular cloning of a rat submandibular gland apomucin.  
*J. Biochem.*, 1994, 269 : 16845-16852
- [6] **ALLEN A.**  
The structure and function of gastric mucin.  
*GUT*, 1972, 13 : 666-672
- [7] **ALLEN A.**  
Mucus—a protective secretion of complexity.  
*TIBS*, 1983, 169-173
- [8] **ALLEN A., HUTTON D.A., LEONARD A.J., PEARSON J.P. and SELLERS L.A.**  
The role of mucus in the protection of the gastroduodenal mucosa.  
*Scand. J. Gastroenterol.*, 1986, 21 (suppl. 125) : 71-77
- [9] **AN G., LUO G. and WU R.**  
Expression of MUC 2 gene is down-regulated by vitamin A at the transcriptional level in vitro in tracheobronchial epithelial cells.  
*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1994, 10 : 546-551

- [10] **ANDERSSON L.C., GAHMBERG C.G., KIMURA A.K. and WIGZELL H.**  
Activated human T-lymphocytes display new surface glycoproteins.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75 : 3455
- [11] **ASKER N., BAECKSTRÖM D., AXELSSON M.A.B., CARLSTEDT I. and HANSSON G.C.**  
The human MUC2 mucin apoprotein appears to dimerize before O-glycosylation and shares epitopes with the 'insoluble' mucin of rat small intestine.  
*Biochem. J.*, 1995, 308 : 873-880
- [12] **AUBERT J.P., PORCHET N., CREPIN M., DUTERQUE-COQUILLAUD M., VERGNES G., MAZZUCA M., DEBUIRE B., PETITPREZ D. and DEGAND P.**  
Evidence for different human tracheobronchial mucin peptides deduced from nucleotide cDNA sequences.  
*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1991, 5 : 178-185
- [13] **AUDIE J.P., JANIN A., PORCHET N., COPIN M.C., GOSSELIN B. and AUBERT J.P.**  
Expression of human mucin genes in respiratory, digestive and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization.  
*J. Histochem. Cytochem.*, 1993, 41 : 1479-1485
- [14] **AUDIE J.P., TETAERT D., PIGNY P., BUISINE M.P., JANIN A., AUBERT J.P., PORCHET N. and BOERSMA A.**  
Mucin gene expression in the human endocervix.  
*Human Reproduction*, 1995, 10 : 98-102
- [15] **BAECKSTRÖM D. and HANSSON G.C.**  
The transcripts of the apomucin genes MUC 2, MUC 4, and MUC 5AC are large and appear as distinct bands.  
*Glycoconjugate Journal*, 1996, 13 : 833-837
- [16] **BALAGUE C., GAMBUS G., CARRATO C., PORCHET N., AUBERT J.P., KIM Y.S. and REAL F.X.**  
Altered expression of MUC 2, MUC 4 and MUC 5 mucin genes in pancreas tissues and cancer cell lines.  
*Gastroenterology*, 1994, 106 : 1054-1061
- [17] **BALAGUE C., AUDIE J.P., PORCHET N. and REAL F.X.**  
In situ hybridization shows distinct patterns of mucin gene expression in normal, benign and malignant pancreas tissues.  
*Gastroenterology*, 1995, 109 : 953-964
- [18] **BARUCH A., HARTMAN M., ADERETH Y., MOES M., GREENSTEIN S., BURSTAJN M., KEYDAR I. and WRESCHNER H.**  
The breast cancer MUC1/Y receptor binds a mucin-like protein.  
*4<sup>th</sup> International Workshop on Carcinoma-Associated Mucins, Cambridge, 1996*

- [19] **BERG E.L., ROBINSON M.K., MANSSON O., BUTCHER E.C. and MAGNANI J.L.**  
A carbohydrate domain common to both sialyl-Le<sup>a</sup> and sialyl-Le<sup>x</sup> is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1.  
*J. Biol. Chem.*, 1991, 15 : 14869-14872
- [20] **BERNSTEIN P. and ROSS J.**  
Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability.  
*TIBS*, 1989, 14 : 373-377
- [21] **BHARGAVA A.K., WOITACH J.T., DAVIDSON E.A. and BHAVANANDAN V.P.**  
Cloning and cDNA sequence of a bovine submaxillary gland mucin-like protein containing two distinct domains.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87 : 6798-6802
- [22] **BLASER E.H.**  
Gastric Campylobacter-like organisms, gastritis, and peptic ulcer disease.  
*Gastroenterology*, 1987, 93 : 371-383
- [23] **BOBEK L.A., TSAI H., BIESBROCK A.R. and LEVINE M.J.**  
Molecular cloning, sequence and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7).  
*J. Biol. Chem.*, 1993, 268 : 20563-20569
- [24] **BOBEK L.A., LIU J., SAIT S.N.J., SHOWS T.B., BOBEK Y.A. and LEVINE M.J.**  
Structure and chromosomal localization of the human salivary mucin gene MUC7.  
*Genomics*, 1996, 31 : 277-282
- [25] **BOGOMOLETZ W.V., FILIPE M.I. and POTET F.**  
Intérêt de l'histochimie des mucines dans le tube digestif normal et pathologique.  
*Gastroenterol. Clin. Biol.*, 1984, 8 : 364-372
- [26] **BOSHELL M., LALANI E.N., PEMBERTON L., BURCHELL J., GENDLER S. and TAYLOR-PAPADIMITRIOU J.**  
The product of the human MUC1 gene when secreted by mouse cells transfected with the full-length cDNA lacks the cytoplasmic tail.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, 185 : 1-8
- [27] **BOURDON M.A., KRUSIUS T., CAMPBELL S., SCHWARTZ N.B. and RUOSLAHTI E.**  
Identification and synthesis of a recognition signal for the attachment of glycosaminoglycans to proteins.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84 : 3194-3198

- [28] **BRAGA V.M.M., PEMBERTON L.F., DUHIG T. and GENDLER S.J.**  
Spatial and temporal expression of an epithelial mucin, MUC 1, during mouse development.  
*Development*, 1992, 115 : 427-437
- [29] **BREG J., VAN HALBEEK H., Vliegenthart J. F. G., Klein A., Lamblin G. and ROUSSEL P.**  
Structure of sialyl-oligosaccharides isolated from bronchial mucus glycoproteins of patients suffering from cystic fibrosis.  
*Eur. J. Biochem.*, 1987, 16 : 57-68
- [30] **BRESALIER R.S., NIV Y., BYRD J.C. , DUH Q.Y., TORIBARA N.W., ROCKWELL R.W., DAHIYA R. and KIM Y.S.**  
Mucin production by human colonic carcinoma cells correlates with their metastatic potential in animal models of colon cancer metastasis.  
*J. Clin. Invest.*, 1991, 87 : 1037-1045
- [31] **BROCK M.L. and SHAPIRO D.J.**  
Estrogen stabilizes vitellogenin mRNA against cytoplasmic degradation.  
*Cell*, 1983, 34 : 207-214
- [32] **BROCKHAUSEN I.**  
Meeting Reports, 3<sup>rd</sup> international workshop on carcinoma-associated mucins, Cambridge  
*Glycoconjugate journal*, 1995, 12 :IV
- [33] **BUISINE M.P., JANIN A., MAUNOURY V., AUDIE J.P., DELESCAUT M.P., COPIN M.C., COLOMBEL J.F., DEGAND P., AUBERT J.P. and PORCHET N.**  
Aberrant expression of a human mucin gene (MUC 5AC) in rectosigmoid villous adenoma.  
*Gastroenterology*, 1996, 110 : 84-91
- [34] **BURCHELL J., WANG D. and TAYLOR-PAPADIMITRIOU J.**  
Detection of the tumour associated antigens recognised by the monoclonal antibodies HMFG-1 and 2 in serum from patients with breast cancer.  
*Int. J. Cancer*, 1984, 34 : 763-768
- [35] **BYRD J.C., NARDELLI J., SIDDIKI B. and KIM Y.S.**  
Isolation and characterization of colon cancer mucin from xenografts of LS174T cells.  
*Cancer Res.*, 1988, 48 : 6678-6685
- [36] **BYRD J.C., LAMPORT D.T.A., SIDDIQUI B., KUAN S., ERICKSON R., ITZKOWITZ S.H. and KIM Y.S.**  
Deglycosylation of LS174T colon cancer mucin by hydrogen fluoride treatment.  
*Biochem. J.*, 1989, 261 : 617-625

- [37] **CAMPBELL B.J., FINNIE I.A., HOUNSELL E.F. and RHODES J.M.**  
Direct demonstration of increased expression of Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in colonic adenocarcinoma and ulcerative colitis mucin and its concealment in normal mucin.  
*J. Clin. Invest.*, 1995, 95 : 571-576
- [38] **CAMPION J.P., PORCHET N., AUBERT J.P., L'HELGOUALC'H A. and CLEMENT B.**  
UW-preservation of cultured human gallbladder epithelial cells : phenotypic alterations and differential mucin gene expression in the presence of bile.  
*Hepatology*, 1995, 21 : 223-231
- [39] **CAPUT D., BEUTLER B., HARTOG K., THAYER R., BROXN-SHIMER S. and CERAMI A.**  
Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83 : 1670-1674
- [40] **CARLSSON S.R. and FUKUDA M.**  
Isolation and characterization of leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes.  
*J. Biol. Chem.*, 1986, 261 : 12779-12786
- [41] **CARLSTEDT I., LINDGREN H. and SHEEHAN J.K.**  
The macromolecular structure of human cervical-mucus glycoproteins. Studies on fragments obtained after reduction of disulphide bridges and after subsequent trypsin digestion.  
*Biochem. J.*, 1983, 213 : 427-435
- [42] **CHAMBERLAIN J.S., PEARLMAN J.A., MUZNY D.M., GIBBS R.A., RANIER J.E., REEVES A.A. and CASKEY C.T.**  
Expression of the murine Duchenne muscular dystrophy gene in muscle and brain.  
*Science*, 1988, 239 : 1416-1417
- [43] **CHAMBERS J.A., HOLLINGSWORTH M.A., TREZISE A.E.O. and HARRIS A.**  
Developmental expression of human mucin genes MUC 1 and MUC 2.  
*J. Cell Sci.*, 1994, 107 : 413-424
- [44] **CHAZALETTE J.P., GALABERT C., LIPPENS M.F., FILLIAT M. et GHERSI B.**  
Anomalies du mucus et mucoviscidose.  
*Mucus et maladies respiratoires*, 1989, *Excerpta medica, Elsevier ed.*
- [45] **CHEN S.H., YANG C.Y., CHEN P.F., SETZER D., TANIMURA M., LI W.H., GOTTO A.M. and CHAN L.**  
The complete cDNA and amino acid sequence of human apolipoprotein B-100.  
*J. Biol. Chem.*, 1986, 261 : 12918-12921



- [46] **CHIRGWIN J.M., PRZYBYLA A.E., MACDONALD R.J. and RUTTER W.J.**  
Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.  
*Biochemistry*, 1979, 18: 5294-5299
- [47] **CHO S.H., SAHIN A., HORTOBAGYI G.N., HITTELMAN W.N. and DHINGRA K.**  
Sialyl-Tn antigen expression occurs early during human mammary carcinogenesis and is associated with high nuclear grade and aneuploidy.  
*Cancer Res.*, 1994, 54: 6302-6305
- [48] **CHOMCZYNSKI P. and SACCHI N.**  
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.  
*Anal. Biochem.*, 1987, 162: 156-159
- [49] **CLADARAS C., HADZOPULOLOU-CLADARAS M., NOLTE R.T., ATKINSON D. and ZANNIS V.I.**  
The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100 : relationship between apoB-100 and apoB-48 forms.  
*EMBO J.*, 1986, 5: 3495-3507
- [50] **CLAMP J.R., FRASER G. and READ E.A.**  
Study of the carbohydrate content of mucus glycoproteins from normal and diseased colons.  
*Clin. Sci.*, 1981, 61: 229-237
- [51] **CLEVELAND D.W.**  
Gene regulation through messenger RNA stability.  
*Curr. Opin. Cell Biol.*, 1989, 1: 1148-1153
- [52] **CORFIELD T.**  
Mucus glycoproteins, super glycoforms : how to solve a sticky problem ?  
*Glycoconjugate Journal*, 1992, 9: 217-221
- [53] **CORFIELD A.P., WAGNER S.A., O'DONNELL L.J.D., DUTDEY P., MOUNTFORD R.A. and CLAMP J.R.**  
The roles of enteric bacterial sialidase, sialate O-acetyltransferase and glycosulfatase in the degradation of human colonic mucin.  
*Glyconjug. J.*, 1993, 10: 72-81
- [54] **CREETH J.M., BHASKAR K.R., HORTON J.R., DAS T., LOPEZ-VIDRIER M.T. and REID L.**  
The separation and characterisation of bronchial glycoproteins by density-gradient methods.  
*Biochem. J.*, 1977, 167: 557-569
- [55] **CREPIN M., PORCHET N., AUBERT J.P. and DEGAND P.**  
Diversity of the peptide moiety of human mucins.  
*Biorheology*, 1990, 27: 471-484

- [56] **CULLING C.F.A., REID P.E. and DUNN W.L.**  
A histochemical comparison of the O-acylated sialic acids of the epithelial mucins in ulcerative colitis, Crohn's disease and normal controls.  
*J. Clin. Pathol.*, 1979, 32 : 1272-1277
- [57] **DANI C., BLANCHARD J.M., PIECHACZYK M., SABOUTY S.E., MARTY L. and JEANTEUR P.**  
Extreme instability of myc mRNA in normal and transformed human cells.  
*Proc. Natl. Sci. USA*, 1984, 81 : 7046-7050
- [58] **DAVID L., NESLAND J.M., CLAUSEN H., CARNEIRO F. and SOBRINHO-SIMÕES M.**  
Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, sialosyl-Tn and T) in gastric mucosa, carcinomas and metastases.  
*APMIS*, 1992, suppl 27 : 162-172
- [59] **DEGAND P., HAVEZ R. and BISERTE G.**  
Séquence en acides aminés au voisinage du point d'attache d'un glycopeptide de mucine bronchique humaine.  
*C. R. Acad. Sci.*, 1972, 275 : 491-493
- [60] **DEVISME L., BUISINE M.P., SAVIDGE T.C., JANIN A., GESPACH C., PUECH F., DEGAND P., GOSSELIN B., PORCHET N. and AUBERT J.P.**  
Mucin gene expression in human fetal intestine.  
*Soumis.*
- [61] **DEKKER J., VAN BEURDEN-LAMERS W.M.O. and STROUS G.J.**  
Biosynthesis of gastric mucus glycoprotein of the rat.  
*J. Biol. Chem.*, 1989, 264 : 10431-10437
- [62] **DEKKER J. and STROUS G.J.**  
Covalent oligomerization of rat gastric mucin occurs in the rough endoplasmic reticulum, is N-glycosylation-dependent, and precedes initial O-glycosylation.  
*J. Biol. Chem.*, 1990, 265 : 18116-18122
- [63] **DEKKER J., VAN DER ENDE A., AELMANS P.H. and STROUS G.J.**  
Rat gastric mucin is synthesized and secreted exclusively as filamentous oligomers.  
*Biochem. J.*, 1991, 279 : 251-256
- [64] **DEKKER J., AELMANS P.H. and STROUS G.J.**  
The oligomeric structure of rat and human gastric mucins.  
*Biochem. J.*, 1991, 277 : 423-427
- [65] **DESSEYN J.L., GUYONNET DUPERAT V., PORCHET N., AUBERT J.P. and LAINE A.**  
Human mucin gene MUC 5B : the 10.7 kb large central exon encodes various alternate subdomains resulting in a super-repeat.  
*J. Biol. Chem.*, 1997, 272 : 3168-3178

- [66] **DEVINE P.L. and McKENZIE I.F.C.**  
Mucins : structure, function and associations with malignancy.  
*BioEssays*, 1992, 14, 9 : 619-625
- [67] **DIAMOND D.J. and GOODMAN H.M.**  
Regulation of growth hormone messenger RNA synthesis by dexamethasone and triiodothyronine : transcriptional rate and mRNA stability changes in pituitary tumor cells.  
*J. Mol. Biol.*, 1985, 81 : 41-62
- [68] **DUFOSSE J., PORCHET N., AUDIE J.P., GUYONNET DUPERAT V., LAINE A., VAN SEUNINGEN I., MARRAKCHI S., DEGAND P. and AUBERT J.P.**  
Degenerate 87-base-pair tandem repeats create hydrophilic/hydrophobic alternating domains in human mucin peptides mapped to 11p15.  
*Biochem. J.*, 1993, 293 : 329-337
- [69] **DURAND-REVILLE M.**  
Etude de l'expression des gènes de mucines dans l'endomètre, l'endométriose et le cancer de l'endomètre.  
Diplôme d'Etudes Approfondies des Sciences Chirurgicales, Paris, 1995.
- [70] **ECKHARDT A.E., TIMPTE C.S., ABERNETHY J.L., TOUMADJE A., JOHNSON N.C.Jr and HILL R.L.**  
Structural properties of porcine submaxillary gland apomucin.  
*J. Biol. Chem.*, 1987, 262 : 11339-11344
- [71] **ECKHARDT A.E., TIMPTE C.S., ABERNETHY J.L., ZHAO Y. and HILL R.L.**  
Porcine submaxillary mucin contains a cysteine-rich, carboxyl-terminal domain in addition to a highly repetitive, glycosylated domain.  
*J. Biol. Chem.*, 1991, 266 : 9678-9686
- [72] **ERNST T.J., RITCHIE A.R., DEMETRI G.D. and GRIFFIN J.D.**  
Regulation of granulocyte- and monocyte-colony stimulating factor mRNA levels in human blood monocytes is mediated primarily at a post-transcriptional level.  
*J. Biol. Chem.*, 1989, 264 : 5700-5703
- [73] **FAHIM R.E.F., SPECIAN R.D., FORSTNER G.G. and FORSTNER J.F.**  
Characterization and localization of the putative "link" component in rat small intestinal mucin.  
*Biochem. J.*, 1987, 243 : 631-640
- [74] **FILIBE M.I.**  
Value of histochemical reactions for mucosubstances in the diagnosis of certain pathological conditions of the colon and rectum.  
*Gut*, 1969, 10 : 577-586

- [75] **FILIPPE M.I.**  
Mucins in the human gastrointestinal epithelium : a review  
*Invest. Cell Pathol.*, 1979, 2 : 195-216
- [76] **FOX M.F., LAHBIB F., PRATT W., ATTWOOD J., GUM J., KIM Y. and SWALLOW D.M.**  
Regional localization of the intestinal mucin gene MUC3 to chromosome 7q22.  
*Ann. Hum. Genet.*, 1992, 56 : 281-287
- [77] **FOYT H.L., LEROITH D. and ROBERTS C.T. Jr.**  
Differential association of insulin-like growth factor I mRNA variants with polysomes *in vivo*.  
*J. Biol. Chem.*, 1991, 266 : 7300-7305
- [78] **FRITZ J.D., WOLFF J.A. and GREASER L.**  
Characterization of a partial cDNA clone encoding porcine skeletal muscle titin : comparison with rabbit and mouse skeletal muscle titin sequences.  
*Comp. Biochem. Physiol.*, 1993, 105B : 357-360
- [79] **FUKUDA M.**  
Leukosialin, a major O-glycan-containing sialoglycoprotein defining leukocyte differentiation and malignancy.  
*Glycobiology*, 1991, 1 : 347-356
- [80] **GALIEGUE-ZOUITINA S., COLLYN-D'HOOOGHE M., DENIS C., MAINARDI A., HILDEBRAND M.P., TILLY H., BASTARD C. and KERCKAERT J.P.**  
Molecular cloning of a t(11;14)(q13;q32) translocation breakpoint centromeric to the *BCL1-MTC*.  
*Genes Chromosom. Cancer*, 1994, 11 : 246-255
- [81] **GARCIA-VILLAR R. et FIORAMONTI J.**  
Actualités sur le mucus à l'AGA 1996.  
*Mucus Dialogue*, 1996, 8 : 1-7, *IPSEN*
- [82] **GENDLER S., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., DUHIG T., ROTHBARD J and BURCHELL J.**  
A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats.  
*J. Biol. Chem.*, 1988, 293 : 12820-12823
- [83] **GENDLER S.J., BURCHELL J. M., DUHIG T., LAMPORT D., WHITE R., PARKER M. and TAYLOR-PAPADIMITRIOU J.**  
Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 84 : 6060-6066

- [84] **GENDLER S.J., LANCASTER C.A., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., DUHIG J., PEAT T., BURCHELL J. M., PEMBERTON L., LALANI E.N. and WILSON D.**  
Molecular cloning and expression of a human tumor-associated polymorphic epithelial mucin.  
*J. Biol. Chem.*, 1990, 265 : 15286-15293
- [85] **GENDLER S.J., SPICER A.P., LALANI E.L., DUHIG T., PEAT N., BURCHELL J., PEMBERTON L., BOSHELL M. and TAYLOR-PAPADIMITRIOU J.**  
Structure and biology of a carcinoma-associated mucin, MUC1.  
*Am. Rev. Respir. Dis.*, 1991, 144 : S42-S47
- [86] **GENDLER S.J. and SPICER A.P.**  
Epithelial mucin genes.  
*Annu. Rev. Physiol.*, 1995, 57 : 607-634
- [87] **GERARD C., EDDY R.L. and SHOWS T.B.**  
The core polypeptide of cystic fibrosis tracheal mucin contains a tandem repeat structure. Evidence for a common mucin in airway and gastrointestinal tissue.  
*J. Clin. Invest.*, 1990, 86 : 1921-1927
- [88] **GOOLEY A.A., CLASSON B.J., MARSCHALEK R. and WILLIAMS K.L.**  
Glycosylation sites identified by detection of glycosylated amino acids released from Edman degradation : the identification of Xaa-Pro-Xaa-Xaa as a motif for Thr-O-glycosylation.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, 178 : 1194-1200
- [89] **GRIFFITHS B., MATTHEWS D.J., WEST L., ATTWOOD J., POVEY S., SWALLOW D.M., GUM J.R. and KIM Y.S.**  
Assignment of the polymorphic intestinal mucin gene (MUC2) to chromosome 11p15.  
*Ann. Hum. Genet.*, 1990, 54 : 277-285
- [90] **GROSS M.S., GUYONNET DUPERAT V., PORCHET N., BERNHEIM A., AUBERT J.P. and VAN CONG NGUYEN.**  
Mucin 4 (MUC4) gene : regional assignment (3q29) and RFLP analysis.  
*Ann. Genet.*, 1992, 35 : 21-26
- [91] **GUM J.R., BYRD J.C., HICKS J.W., TORIBARA N.W., LAMPORT D.T.A. and KIM Y.S.**  
Molecular cloning of human intestinal mucin cDNA. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism.  
*J. Biol. Chem.*, 1989, 264 : 6480-6487
- [92] **GUM J.R., HICKS J.W., SWALLOW D.M., LAGACE R.L., BYRD J.C., LAMPORT D.T.K. SIDDIKI B. and KIM Y.S.**  
Molecular cloning of cDNA derived from a novel human intestinal mucin gene.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, 171 : 407-415

- [93] **GUM J.R., HICKS J.W., LAGACE R.E., BYRD J.C., TORIBARA N.W., SIDDIKI B., FEARNEY F.J., LAMPORT D.T.A. and KIM Y.S.**  
Molecular cloning of rat intestinal mucin. Lack of conservation between mammalian species.  
*J. Biol. Chem.*, 1991, 266 : 22733-22738
- [94] **GUM J.R.**  
Mucin genes and the proteins they encode : structure, diversity and regulation.  
*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1992, 7 : 557-564
- [95] **GUM J.R., HICKS J.W., TORIBARA N.W., ROTHE E.M., LAGACE R.E. and KIM Y.S.**  
The human MUC2 intestinal mucin gene has cysteine-rich subdomains located upstream and downstream of its central repetitive region.  
*J. Biol. Chem.*, 1992, 267 : 21375-21383
- [96] **GUM J.R., HICKS J.W., TORIBARA N.W., SIDDIKI B. and KIM Y.S.**  
Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA .Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-Willebrand factor.  
*J. Biol. Chem.*, 1994, 269 : 2440-2446
- [97] **GUM J.R.**  
Human mucin glycoproteins : varied structures predict diverse properties and specific functions.  
*Biochemical Society Transactions*, 1995, 23 : 795-799
- [98] **GUYONNET DUPERAT V., AUDIE J.P., DEBAILLEUL V., LAINE A., BUISINE M.P., GALIEGUE-ZOUTINA S., PIGNY P., DEGAND P., AUBERT J.P. and PORCHET N.**  
Characterization of the human mucin gene MUC5AC : a consensus cysteine-rich domain for 11p15 mucin genes?  
*Biochem. J.*, 1995, 305 : 211-219
- [99] **HABIB N.A, DAWSON P.M., KRAUSZ T., BLOUNT M.A., KERSTEN D. and WOOD C.B.**  
A study of histochemical changes in mucus from patients with ulcerative colitis, Crohn's disease, and diverticular disease of the colon.  
*Dis. Col. Rect.*, 1986, 29 : 15-17
- [100] **HANDA K., NUDELMAN E.D., STROUD M.R., SHIOZAWA T. and HAKOMORI S.I.**  
Selectin GPM-140 (CD62 ; PADGEM) binds to sialosyl-Le<sup>a</sup> and sialosyl-Le<sup>x</sup>, and sulfated glycans modulate this binding.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, 181 : 1223-1230

- [101] **HANSKI C., HANSKI M.L., ZIMMER T., OGOREK D., DEVINE P. and RIECKEN E.O.**  
Characterization of the major sialyl-Le<sup>x</sup>-positive mucins present in colon, colon carcinoma, and sera of patients with colorectal cancer.  
*Cancer Res.*, 1995, 55 : 928-933
- [102] **HAUSER F. and HOFFMAN W.**  
P-domains as shuffled cysteine-rich modules in integumentary mucin C.1 (FIM-C.1) from *Xenopus laevis*. Polydispersity and genetic polymorphism.  
*J. Biol. Chem.*, 1992, 267 : 24620-24624
- [103] **HAYES D.F., SILBERSTEIN D.S., RODRIGUE S.W. and KUFÉ D.W.**  
DF3 antigen, a human epithelial cell mucin, inhibits adhesion of eosinophils to antibody-coated targets.  
*J. Immunol.*, 1990, 145 : 962-967
- [104] **HILKENS J.**  
Biochemistry and function of mucins in malignant disease.  
*Cancer Rev.*, 1988, 11-12 : 25-54
- [105] **HILKENS J., LIGTENBERG M.J.L., VOS H.L. and LITVINOV S.V.**  
Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property.  
*TIBS*, 1992, 17 : 359-363
- [106] **HILL H.D., SCHWYZER M., STEINMAN H.M. and HILL R.L.**  
Ovine submaxillary mucin primary structure and peptides substrates of UDP-N-Acetylgalactosamine-mucin transferase.  
*J. Biol. Chem.*, 1977, 252 : 3799-3804
- [107] **HO J.L.H. and KIM Y.S.**  
Do mucins promote tumor cell metastasis ? (Review)  
*International Journal of Cancer*, 1995, 7, 913-926
- [108] **HO S.B. and KIM Y.S.**  
Carbohydrate antigens on cancer-associated mucin-like molecules.  
*Cancer Biology*, 1991, 2 : 389-400
- [109] **HO S.B., NIEHANS G.A., LYFTOGT C., YAN P.S., CHERWITZ D.L., GUM E.T., DAHIYA R. and KIM Y.S.**  
Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues.  
*Cancer Res.*, 1993, 53 : 641-651
- [110] **HO S.B., SHEKELS L.L., TORIBARA N.W., KIM Y.S., LYFTOGT C., CHERWITZ D.L. and NIEHANS G.A.**  
Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium.  
*Cancer Res.*, 1995, 55 : 2681-2690

- [111] **HOFFMANN W. and HAUSER F.**  
Biosynthesis of frog skin mucins : cysteine-rich shuffled modules, polydispersities and genetic polymorphism.  
*Comp. Biochem. Physiol.*, 1993, 105B : 465-472
- [112] **HOFFMANN W. and JOBA W.**  
Biosynthesis and molecular architecture of gel-forming mucins : implications from an amphibian model system.  
*Biochemical Society Transactions*, 1995, 23 : 805-810
- [113] **HOUNSELL E.F., DAVIES M.J. and RENOUF D.V.**  
O-linked protein glycosylation structure and function.  
*Glycoconjugate journal*, 1996, 13 : 19-26
- [114] **IRIMURA T., McISAAC A.M., CARLSON D.A., YAGITA M., GRIMM E.A., MENTER D.G., OTA D.M. and CLARY K.R.**  
Soluble factor in normal tissues that stimulates high-molecular weight sialo-glycoprotein production by human colon carcinoma cells.  
*Cancer Res.*, 1990, 50 : 3331-3338
- [115] **ITZKOWITZS.H., BLOOM E.J., KOKAL W.A., MODIN G., HAKOMORI S.I. and KIM Y.S.**  
A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients.  
*Cancer*, 1990, 1960-1966
- [116] **JANY B.H., GALLUP M.W., YAN P.S., GUM J.R., KIM Y.S. and BASBAUM C.B.**  
Human bronchus and intestine express the same mucin gene.  
*J. Clin. Invest.*, 1991, 87 : 77-82
- [117] **JANY B., GALLUP M., TSUDA T. and BASBAUM C.**  
Mucin gene expression in rat airways following infection and irritation.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, 181 : 1-8
- [118] **JEANPIERRE M.**  
Rapid method for the purification of DNA from blood.  
*Nucl. Acid. Res.*, 1987, 15 : 9611
- [119] **JEROME K.R., BARND D.L., BENDT K.M., BOYER C.M., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., McKENZIE I.F.C., BAST R.C. and FINN O.J.**  
Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells.  
*Cancer Res.*, 1991, 51 : 2908-2916
- [120] **JOUET J.B., ZAHM J.M., JACQUOT J., BENALI R. et PUCHELLE E.**  
Anomalies du mucus et pathologies broncho-pulmonaires de l'enfant.  
*Mucus et maladies respiratoires*, 1989, *Excerpta medica, Elsevier ed.*



- [121] **KHATRI I.A., FORSTNER G.G. and FOSTNER J.F.**  
Suggestive evidence for two different mucin genes in rat intestine.  
*Biochem. J.*, 1993, 294 : 391-399
- [122] **KIM Y.S. and GUM J.R.**  
Diversity of mucin genes, structure, function and expression.  
*Gastroenterology*, 1995, 109 : 999-1013
- [123] **KIMURA A.K. and WIGZELL H.**  
Cell surface glycoproteins of murine cytotoxic T lymphocytes.I.T145, a new cell surface glycoprotein selectively expressed on Ly1-2+ cytotoxic T lymphocytes.  
*J. Exp. Med.*, 1978, 147 : 1418-1434
- [124] **KINGSMORE S.F., MOSELEY W.S., WATSON M.L., SABINA R.L., HOLMES E.W. and SELDIN M.F.**  
Long-range restriction site mapping of a syntenic segment conserved between human chromosome 1 and mouse chromosome 3.  
*Genomics*, 1990, 7 : 75-83
- [125] **KITAMURA H., CHO M., LEE B.H., GUM J.R., SIDDIKI B.B., HO S.B., TORIBARA N.W., LESUFFLEUR T., ZWEIBAUM A., KITAMURA Y., YONEZAWA S. and KIM Y.S.**  
Alteration in mucin gene expression and biological properties of HT29 colon cancer cell subpopulations.  
*Eur. J. Cancer*, 1996, 32A : 1788-1796
- [126] **KLOMP L.W.J., VAN RENS L. and STROUS G.J.**  
Identification of a human gastric mucin precursor : N-linked glycosylation and oligomerization.  
*Biochem. J.*, 1994, 304 : 693-698
- [127] **KLOMP L.W.J., VAN RENS L. and STROUS G.J.**  
Cloning and analysis of human gastric mucin cDNA reveals two types of conserved cysteine-rich domains.  
*Biochem. J.*, 1995, 308 : 831-838
- [128] **KOVARIK A., PEAT N, WILSON D., GENDLER S.J. and TAYLOR-PAPADIMITRIOU J.**  
Analysis of the tissue-specific promoter of the MUC 1 gene.  
*J. Biol. Chem.*, 1993, 268 : 9917-9926
- [129] **KOVARIK A., LU P.J., PEAT N., MORRIS J. and TAYLOR-PAPADIMITRIOU J.**  
Two GC boxes (Sp1 sites) are involved in regulation of the activity of the epithelium-specific MUC1 promoter.  
*J. Biol. Chem.*, 1996, 271 : 18140-18147

- [130] **LABOISSE C. et BOGOMOLETZ W.V.**  
Les mucines : des glycoprotéines en quête de reconnaissance.  
*Ann. Pathol.*, 1989, 2 : 175-181
- [131] **LAINÉ R.O., SHAY N.F. and KILBERG M.S.**  
Nuclear retention of the induced mRNA following amino acid-dependent transcriptional regulation of mammalian ribosomal proteins L17 and S25.  
*J. Biol. Chem.*, 1994, 269 : 9693-9697
- [132] **LAMBLIN G., LAFITTE J.J., LHERMITTE M et al.**  
Mucins from cystic fibrosis sputum.  
*Mod. Probl. Paediatr.*, 1977, 19 : 53-64
- [133] **LAMBLIN G., AUBERT J.P., PERINI J.M., KLEIN A., PORCHET N.; DEGAND P. and ROUSSEL P.**  
Human respiratory mucins.  
*Eur. Respir. J.*, 1992, 5 : 247-256
- [134] **LAMBLIN G. and ROUSSEL P.**  
Airway mucins and their role in defence against micro-organisms.  
*Respiratory Medicine*, 1993, 87 : 421-426
- [135] **LAN M.S., BATRA S.K., QI W.N., METZGAR R.S. and HOLLINGSWORTH M.A.**  
Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA.  
*J. Biol. Chem.*, 1990, 265 : 15294-15299
- [136] **LANCASTER C.A., PEAT N., DUHIG T., WILSON D., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J. and GENDLER S.**  
Structure and expression of the human polymorphic epithelial mucin gene : an expressed VNTR unit.  
*Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1990, 173 : 1019-1029
- [137] **LAW S.W., GRANT S.M., HIGUCHI K., HOSPATTANKAR A., LACKNER K., LEE N. and BREWER H.B.Jr.**  
Human liver apolipoprotein B-100 cDNA : complete nucleic acid and derived amino acid sequence.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1986, 83 : 8142-8146
- [138] **LESUFFLEUR T., ZWEIBAUM A. and REAL F.X.**  
Mucins in normal and neoplastic human gastrointestinal tissues.  
*Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 1994, 17 : 153-180
- [139] **LESUFFLEUR T., ROCHE F., HILL A.S., LACASA M., FOX M., SWALLOW D.M., ZWEIBAUM A. and REAL F.X.**  
Characterization of a mucin cDNA clone isolated from HT-29 mucus-secreting cells.  
*J. Biol. Chem.*, 1995, 270 : 13665-13673

- [139b] **LESUFFLEUR T., PORCHET N., AUBERT J.P., SWALLOW D., GUM J.R., KIM Y.S., REAL F.X. and ZWEIBAUM A.**  
Differential expression of the human mucin genes MUC 1 to MUC 5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT 29 cell subpopulation.  
*J. Cell. Sci.*, 1993, 106 : 771-783
- [140] **LIGTENBERG M.J.L., VOS H.L., GENNISSEN A.M.C. and HILKENS J.**  
Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini.  
*J. Biol. Chem.*, 1990, 265 : 5573-5578
- [141] **LIGTENBERG M.J.L., KRUIJSHAAR L., BUIJS F., VAN MEIJER M., LITVINOV S.V. and HILKENS J.**  
Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor.  
*J. Biol. Chem.*, 1992, 267 : 6171-6177
- [142] **LITVINOV S.V. and HILKENS J.**  
The epithelial sialomucin, episialin, is sialylated during recycling.  
*J. Biol. Chem.*, 1993, 268 : 21364-21371
- [143] **MANTLE M., MANTLE D. and ALLEN A.**  
Polymeric structure of pig small intestinal mucus glycoprotein.  
*Biochem. J.*, 1981, 195 : 277-285
- [144] **MANTLE M., FORSTNER G.G. and FORSTNER J.F.**  
Antigenic and structural features of goblet cell mucin of human small intestine.  
*Biochem. J.*, 1984, 217 : 159-167
- [145] **MANTLE M. and ALLEN A.**  
Gastrointestinal mucus.  
*in Gastrointestinal secretion, éd. J.S. Davison, Wright, 1989; 202-229*
- [146] **MARIANNE T., PERINI J.M., LAFITTE J.J., HOUDRET N., PRUVOT F.R., LAMBLIN G., SLAYTER H.S. and ROUSSEL P.**  
Peptides of human bronchial mucus glycoproteins. Size determination by electron microscopy and by biosynthetic experiments.  
*Biochem. J.*, 1987, 248 : 189-195
- [147] **MARSCHALL T. and ALLEN A.**  
Isolation and characterisation of the high molecular weight glycoproteins from pig colonic mucus.  
*Biochem. J.*, 1978, 173 : 569
- [148] **MARSHALL R.D.**  
Glycoproteins.  
*Annu. Rev. Biochem.*, 1972, 41 : 673-702

- [149] **MARTH J.D.**  
Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases.  
*Glycobiology*, 1996, 6 : 701-705
- [150] **MARZLUFF W.F. and PANDEY N.B.**  
Multiple regulatory steps control histone mRNA concentrations.  
*TIBS*, 1988, 13 : 49-52
- [151] **MEERZAMAN D., CHARLES P., DASKAL E., POLYMEROPOULOS M.H., MARTIN B.M. and ROSE M.C.**  
Cloning and analysis of cDNA encoding a major airway glycoprotein, human tracheobronchial mucin (MUC5).  
*J. Biol. Chem.*, 1994, 269 : 12932-12939
- [152] **MONIAUX N., NOLLET S., LAINE A., AUBERT J.P., PORCHET N.**  
The human mucin gene MUC 4 contains at least two perfectly conserved sequences repeated in tandem.  
*4<sup>th</sup> International Workshop on Carcinoma-Associated Mucins, Cambridge, 1996*
- [153] **MÜLLNER E.W. and KÜHN L.C.**  
A stem-loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm.  
*Cell*, 1988, 53 : 815-825
- [154] **NAKAMORI S., KAMEYAMA M., IMAOKO S., FURUKAWA H., ISHAKAWA O., SASAKI Y., KABUTO T., IWANAGA T., MATSUSHITA Y. and IRIMURA T.**  
Increased expression of sialyl-Le<sup>x</sup> antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma : clinicopathological and immunohistochemical study.  
*Cancer Res.*, 1993, 53 : 3632-3637
- [155] **NGUYEN P.L., NIEHANS G.A., CHERWITZ D.L., KIM Y.S. and HO S.B.**  
Membrane-bound (MUC1) and secretory (MUC2, MUC 3 and MUC 4) mucin gene expression in human lung cancer.  
*Tumor Biol.*, 1996, 17 : 176-172
- [156] **NOARA H., MIYAHARA K. and CURNOW R.N.**  
Origin of noncoding DNA sequences : Molecular fossils of genome evolution.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84 : 6195-6199
- [157] **NUNES D.P., KEATES A.C., AFDHAL N.H. and OFFNER G.D.**  
Bovine gall-bladder mucin contains two distinct tandem repeating sequences : evidence for scavenger receptor cysteine-rich repeats.  
*Biochem. J.*, 1995, 310 : 41-48
- [158] **OFFNER G.D., NUNES D.P., ZHANG F., McANENY D.B. and AFDHAL N.H.**  
Alterations in gallbladder mucin gene expression in patients with cholesterol gallstones.  
*Gastroenterology, AGA Abstracts*, 1996, 110 : A1282

- [159] **OGATA S., UEHARA H., CHEN A. and ITZKOWITZ S.H.**  
Mucin gene expression in colonic tissues and cell lines.  
*Cancer Res.*, 1992, 52 : 5971-5978
- [160] **OHMORI H., DOHRMAN A.F., GALLUP M., TSUDA T., KAI H., GUM J.R., KIM Y.S. and BASBAUM C.**  
Molecular cloning of amino-terminal region of a rat MUC2 mucin gene homologue.  
Evidence for expression in both intestine and airway.  
*J. Biol. Chem.*, 1994, 269 : 17833-17840
- [161] **PARK J.K., ROSENSTEIN Y.J., REMOLD-O'DONNELL E., BIERER B.E., ROSEN F.S. and BURAKOFF S.J.**  
Enhancement of T-cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott-Aldrich syndrome.  
*Nature*, 1991, 350 : 706
- [162] **PASLEAU F., GROOTECLAES M. and GOL-WINKLER R.**  
Expression of the *c-erbB2* gene in the BT474 human mammary tumor cell line : measurement of the *c-erbB2* mRNA half-life.  
*Oncogene*, 1993, 8 : 846-854
- [163] **PELTZ S.W., BREWER G., BERNSTEIN P., HART P.A. and ROSS J.**  
Regulation of mRNA turnover in eukaryotic cells.  
*Crit. Rev. Eukario. Gene Expr.*, 1991, 1 : 99-126
- [164] **PERINI J.M., VANDAMME-CUBADDA N., AUBERT J.P., PORCHET N., MAZZUCA M., LAMBLIN G., HERSCOVICS A. and ROUSSEL P.**  
Multiple apomucin translation products from human respiratory mucosa mRNA.  
*Eur. J. Biochem.*, 1991, 196 : 321-328
- [165] **PIGNY P., PRATT W.S., LAINE A., LECLERCQ A., SWALLOW D.M., NGUYEN V.C., AUBERT J.P. and PORCHET N.**  
The MUC5AC gene : RFLP analysis with the JER 58 probe.  
*Hum. Genet.*, 1995, 96 : 367-368
- [166] **PIGNY P., VAN SEUNINGEN I., DESSEYN J.L., NOLLET S., PORCHET N., LAINE A. and AUBERT J.P.**  
Identification of a 42-kDa nuclear factor (NF1-MUC5B) from HT-29 MTX cells that binds to the 3' region of human mucin gene MUC5B.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, 220 : 186-191

- [167] **PIGNY P., GUYONNET DUPERAT V., HILL A.S., PRATT W.S., GALIEGUE-ZOUITINA S., COLLYN D'HOOGHE M., LAINE A., VAN-SEUNINGEN I., DEGAND P., GUM J.R., KIM Y.S., SWALLOW D.M., AUBERT J.P. and PORCHET N.**  
Human mucin gene assigned to 11p15.5 : identification and organization of a cluster of genes.  
*Genomics*, 1996, 38 : 340-352
- [168] **PIGNY P.**  
Les gènes de mucines humaines localisés en 11p15, polymorphisme, cartographie et approche de régulation.  
*Thèse de doctorat d'Université en Sciences de la vie et de la santé, Université de Lille II, France, 1997*
- [169] **PILLER F., PILLER V., FOX R.I. and FUKUDA M.**  
Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis.  
*J. Biol. Chem.*, 1988, 263 : 15146-15150
- [170] **PODOLSKY D.K. and ISSELBACHER K.J.**  
Composition of human colonic mucin : selective alteration in inflammatory bowel disease.  
*J. Clin. Invest.*, 1983, 72 : 142-153
- [171] **POLU J.M. et DELORME N.**  
Anomalies du mucus et pathologie bronchique de l'adulte.  
*Mucus et maladies respiratoires, 1989, Excerpta medica, Elsevier ed.*
- [172] **PORCHET N., NGUYEN VAN CONG, DUFOSSE J., AUDIE J.P., GUYONNET DUPERAT V., GROSS M.S., DENIS C., DEGAND P., BERNHEIM A. and AUBERT J.P.**  
Molecular cloning and chromosomal localization of a novel human tracheo-bronchial mucin cDNA containing tandemly repeated sequences of 48 base pairs.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, 175 : 414-422
- [173] **PORCHET N., DUFOSSE J., AUDIE J.P., GUYONNET DUPERAT V., PERINI J.M., NGUYEN V.C., DEGAND P. and AUBERT J.P.**  
Structural features of the core proteins of human airway ascertained by cDNA cloning.  
*Am. Rev. Respir. Dis.*, 1991, 144 : S15-S18
- [174] **PORCHET N., PIGNY P., BUISINE M.P., DEBAILLEUL V., DEGAND P., LAINE A. and AUBERT J.P.**  
Human mucin genes : genomic organization and expression of MUC 4, MUC 5AC and MUC 5B.  
*Biochemical Society Transactions*, 1995, 23 : 800-805
- [175] **POWELL L.M., WALLIS S.C., PEASE R.J., EDWARDS Y.H., KNOTT T.J. and SCOTT J.**  
A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine.  
*Cell*, 1987, 50 : 831-840

- [176] **PRAKOBPHOL A., LEVINE M.J., TABAK L.A. and REDDY M.S.**  
Purification of a low-molecular weight, mucin-type glycoprotein from human submandibular -sublingual saliva.  
*Carbohydr. Res.*, 1982, 108 : 11-122
- [177] **PROBST J.C., HAUSER F., JOBA W. and HOFFMAN W.**  
The polymorphic integumentary mucin B.1 from *Xenopus laevis* contains the short consensus repeat.  
*J. Biol. Chem.*, 1992, 267 : 6310-6312
- [178] **PROCKOP D.J., KIVIRIKKO K.I., TUDERMAN L. and GUZMAN N.A.**  
Medical progress. The biosynthesis of collagen and its disorders.  
*N. Engl. Med.*, 1979, 301 : 13-23
- [179] **PULLAN R.D., THOMAS G.A.O., NEWCOMBE R.G., WILLIAMS G.T., ALLEN A. and RHODES J.**  
Thickness of adherant mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis.  
*Gut*, 1994, 35 : 354-359
- [180] **RAMPHAL R., HOUDRET N., KOO L., LAMBLIN G and ROUSSEL P.**  
Differences in adhesion of *Pseudomonas aeruginosae* to mucin glycopeptides from sputa of patients with cystic fibrosis and chronic bronchitis.  
*Infect. Immun.*, 1989, 57 : 3066-3071
- [181] **RAOUF A., PARKER N., IDDEN D., RYDER S., LANGDON-BROWN B., MILTON J.D., WALKER R. and RHODES J.M.**  
Ion exchange chromatography of purified colonic mucus glycoproteins in inflammatory bowel disease : absence of a selective subclass defect.  
*Gut*, 1991, 32 : 1139-1145
- [182] **REAL F.X., CARRATO C., GONZALEZ E., BALAGUE C., DE BOLOS C. and GAMBUS G.**  
Differential expression of apomucins in human tissues analysed with antibodies.  
*2<sup>nd</sup> International Workshop on Carcinoma-Associated Mucins, Cambridge, 1992*  
(abstract 16)
- [183] **REYNOLDS K.W., JOHNSON A.G. and FOX B.**  
Is intestinal metaplasia of the gastric mucosa a premalignant lesion?  
*Clin. Oncol.*, 1975, 1 : 101-109
- [184] **RICE A.P. and ROBERTS B.E.**  
Vaccinia virus induces cellular mRNA degradation.  
*J. Virol.*, 1983, 47 : 529-539

- [185] **ROSE M.C., KAUFMAN B. and MARTIN B.M.**  
Proteolytic fragmentation and peptide mapping of human carboxyamidomethylated tracheobronchial mucin.  
*J. Chem. Biol.*, 1989, 264 : 8193-8199
- [186] **ROSE M.C.**  
Mucins : structure, function, and role in pulmonary diseases.  
*Am. J. Physiol.(Lung Cell. Mol. Physiol. 7)*, 1992, 263 : L413-L429
- [187] **ROUSSEL P., LAMBLIN G., LHERMITTE M., HOUDRET N., LAFITTE J.J., PERINI J.M., KLEIN A. and SCHARFMAN A.**  
The complexity of mucins  
*Biochimie*, 1988, 70 : 1471-1482
- [188] **ROUSSEL P. and LAMBLIN G.**  
Human mucosal mucins in diseases.  
*Glycoproteins and Disease*, 1996, Elsevier ed.
- [189] **SAMBROOK J., FRITSCH E.F. and MANIATIS T.**  
Molecular cloning : a laboratory manual.  
1989, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y.
- [190] **SCHACHTER**  
The biosynthesis of serine (threonine)-N-Acetylgalactosamine-linked carbohydrates moieties.  
*Glycoconjugates, Composition, structure and function*, 1992, edited by H.J. Allen and E.C. Kisailus.
- [191] **SCHIAVI S.C., BELASCO J.G. and GREENBERG M.E.**  
Regulation of proto-oncogene mRNA stability.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1114 : 95-106
- [192] **SCHOUMACHER R.A., SHOEMAKER R.L., HALM D.R., TALLANT E.A., WALLACE R.W. and FRIZELL R.A.**  
Phosphorylation fails to activate chloride channels from cystic fibrosis airway cells.  
*Nature*, 1987, 330 : 752-754
- [193] **SCHWARTZ D.C. and CANTOR C.R.**  
Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gel electrophoresis.  
*Cell*, 1984, 37 : 67-75
- [194] **SHANKAR V., TAN S., GILMORE M.S. and SACHDEV G.P.**  
Molecular cloning of the carboxy terminus of a canine tracheobronchial mucin.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, 189 : 958-964
- [195] **SHANKAR V., GILMORE M.S., ELKINS R.C., and SACHDEV G.P.**  
A novel human airway mucin cDNA encodes a protein with unique tandem-repeat organization.  
*Biochem. J.*, 1994, 300 : 295-298



- [196] **SHANKAR V., GILMORE M.S. and SACHDEV G.P.**  
Further evidence that the human MUC 2 gene transcripts in the intestine and trachea are identical.  
*Biochem. J.*, 1995, 306 : 311-312
- [197] **SHEEHAN J.K., OATES K. and CARLSTEDT I.**  
Electron microscopy of cervical, gastric and bronchial mucus glycoproteins.  
*Biochem. J.*, 1986, 239 : 147-153
- [198] **SHEEHAN J.K. and CARLSTEDT I.**  
Size heterogeneity of human cervical-mucus glycoproteins. Studies performed with rate-zonal centrifugation and laserlight scattering.  
*Biochem. J.*, 1987, 245 : 757-762
- [199] **SHEEHAN J.K., BOOT-HANDFORT R.P., CHANTLER E., CARLSTEDT D. and THORNTON D.J.**  
Evidence for shared epitopes within the "naked" protein domains of human mucus glycoproteins.  
*Biochem. J.*, 1991, 274 : 293-296
- [200] **SHEEHAN J.K., THORNTON D.J., HOWARD M., CARLSTEDT I., CORFIELD A.P. and PARASKEVA C.**  
Biosynthesis of the MUC2 mucin : evidence for a slow assembly of fully glycosylated units.  
*Biochem. J.*, 1996, 0 : 1055-1060
- [201] **SHEKELS L.L., LYFTOGT C., KIELISZEWSKI M., FILIE J.D., KOZAK C.A. and HO S.B.**  
Mouse gastric mucin : cloning and chromosomal localization.  
*Biochem. J.*, 1995, 311 : 775-785
- [202] **SHIMIZU Y. and SHAW S.**  
Mucins in the mainstream.  
*Nature*, 1993, 366 : 630
- [203] **SHIROTANI K., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., GENDLER S.J. and IRIMURA T.**  
Transcriptional regulation of MUC1 gene in colon carcinoma cells by a soluble factor : identification of a regulatory element.  
*J. Biol. Chem.*, 1994, 269 : 15030-15035
- [204] **SLOMIANY A., OKAZAKI K., TAMURA S. and SLOMIANY B.L.**  
Identity of mucin's "118 kDa link protein" with fibronectin fragment.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, 286 : 383-391

- [205] **SORIMACHI H., EMORI Y., KAWASAKI H., KITAJIMA K., INOUE S., SUZUKI K. and INOUE Y.**  
Molecular cloning and characterization of cDNAs coding for Apo-polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. Multiple mRNA species transcribed from multiple genes contain diverged numbers of exact 39-base (13-amino acid) repeats.  
*J. Biol. Chem.*, 1988, 263 : 17678-17684
- [206] **SPICER A.P., PARRY G., PATTON S., and GENDLER S.J.**  
Molecular cloning and analysis of the mouse homologue of the tumor-associated mucin, MUC1, reveals conservation of potential O-glycosylation sites, transmembrane, and cytoplasmic domains and a loss of minisatellite-like polymorphism.  
*J. Biol. Chem.*, 1991, 266 : 15099-15109
- [206b] **SPICER A.P., ROWSE G.J., LIDNER T.K. and GENDLER S.J.**  
Delayed mammary tumor progression in Muc-1 null mice.  
*J. Biol. Chem.*, 1995, 270 : 30093-30101
- [207] **SPRINGER G.F.**  
T and Tn, general carcinoma autoantigens.  
*Science*, 1984, 224 : 1198-1206
- [208] **STROUS G.J. and DEKKER J.**  
Mucin-type glycoproteins.  
*Critic. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1992, 27 : 57-92
- [209] **SWALLOW D.M., GENDLER S., GRIFFITHS B., CORNEY G., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J. and BRAMWELL E.**  
The human tumour-associated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus PUM.  
*Nature*, 1987, 328 : 82-84
- [210] **SWALLOW D.M., GENDLER S., GRIFFITHS B., KEARNEY A., POVEYS S, SHEER D. and TAYLOR-PAPADIMITRIOU J.**  
The hypervariable gene locus PUM, which codes for the tumor associated epithelial mucins, is located on chromosome 1, within the region 1q21-24.  
*Ann. Hum. Genet.*, 1987, 51 : 289-294
- [211] **TAN K.O., SATER G.R., MYERS A.M., ROBSON R.M. and HUIATT T.W.**  
Molecular characterization of avian muscle titin.  
*J. Biol. Chem.*, 1993, 269 : 22900-22907
- [212] **TASHIRO Y., YONEZAWA S., KIM Y.S. and SATO E.**  
Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in human ovarian tumors.  
*Hum. Pathol.*, 1994, 25 : 364-372

- [213] **THORNTON D.J., DAVIES J.R., KRAAYENBRINK M., RICHARDSON P.S., SHEEHAN J.K. and CARLSTEDT I.**  
Mucus glycoproteins from "normal" tracheobronchial secretion.  
*Biochem. J.*, 1990, 265 : 179-186
- [214] **TIMPTE C.S., ECKHARDT A.E., ABERNETHY J.L. and HILL R.L.**  
Porcine submaxillary gland apomucin contains tandemly repeated, identical sequences of 81 residues.  
*J. Biol. Chem.*, 1988, 263 : 1081-1088
- [215] **TORIBARA N.W., GUM J.R., CULHANE P.J., LAGACE R.E., HICKS J.W., PETERSEN G.M. and KIM Y.S.**  
MUC-2 human small intestinal mucin gene structure. Repeated arrays and polymorphism.  
*J. Clin. Invest.*, 1991, 88 : 1005-1013
- [216] **TORIBARA N.W., ROBERTON A.M., HO S.B., KUO W.L., GUM E., HICKS J.W., GUM J.R., BYRD J.C., SIDDIKI B. and KIM Y.S.**  
Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning.  
*J. Biol. Chem.*, 1993, 268 : 5879-5885
- [217] **TORIBARA N.W., GUM E., LAU P., GUM J.R. and KIM Y.S.**  
Human gastric mucin (MUC6) : sequencing of the carboxy terminus and analysis of its structural features.  
*Gastroenterology, AGA Abstracts*, 1996, 110 : A280
- [218] **TURNER B.S., BHASKAR K.R., HADZOPOULOU-CLADARAS M., SPECIAN R.D. and LAMONT J.T.**  
Isolation and characterization of cDNA clones encoding pig gastric mucin.  
*Biochem. J.*, 1995, 308 : 89-96
- [219] **TYTGAT K.M.A.J., BOVELANDER F.J., OPDAM F.J.M., EINERHAND A.W.C., BÜLLER H.A. and DEKKER J.**  
Biosynthesis of rat MUC 2 in colon and its analogy with human MUC 2.  
*Biochem. J.*, 1995, 309 : 221-229
- [220] **VAN CONG N., AUBERT J.P., GROSS M.S., PORCHET N., DEGAND P. and FREZAL J.**  
Assignment of human tracheobronchial mucin gene(s) to 11p15 and a tracheobronchial mucin-related sequence to chromosome 13.  
*Hum. Genet.*, 1990, 86 : 167-172
- [221] **VANDENHAUTE B., BUISINE M.P., DEBAILLEUL V., CLEMENT B., MONIAUX N., DIEU M.C., DEGAND P., PORCHET N. and AUBERT J.P.**  
Mucin gene expression in biliary epithelial cells.  
*Soumis pour publication.*

- [222] **VAN DE WIEL-VAN KEMENADE E., LIGTENBERG M.J.L., DE BOER A.J., BUIJS F., VOS H.L. et al.**  
Episialin (MUC1) inhibits cytotoxic lymphocyte-target cell interaction.  
*J. Immunol.*, 1993, 151 : 767-776
- [223] **VAN KLINKEN B.J.W., DEKKER J., BÜLLER H.A. and EINERHAND A.W.C.**  
Mucin gene structure and expression : protection vs. adhesion.  
*Am. J. Physiol.*, 1995, 269 : G613-G627
- [224] **VAN KLINKEN B.J.W., TYTGAT K.M.A.J., BÜLLER H.A., EINERHAND A.W.C. and DEKKER J.**  
Biosynthesis of intestinal mucins : MUC1, MUC2, MUC3 and more.  
*Biochemical Society Transactions*, 1995, 23 : 814-818
- [225] **VARKI A.**  
Biological roles of oligosaccharides : all of the theories are correct.  
*Glycobiology*, 1993, 3 : 97-130
- [226] **VERMA M. and DAVIDSON E.A.**  
Molecular cloning and sequencing of a canine tracheobronchial mucin cDNA containing a cysteine-rich domain.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90 : 7144-7148
- [227] **VERMA M. and DAVIDSON E.A.**  
Mucin genes : structure, expression and regulation.  
*Glycoconjugate Journal*, 1994, 11 : 172-179
- [228] **VIRMANI A.K., SHANKAR V., GILMORE M.S., GRAVES D.C. and SACHDEV G.P.**  
Translation of messenger RNA from canine tracheal epithelial cells : identification of mucin core protein.  
*Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 1991, 5 : 149-154
- [229] **VISHWANATH S. and RAMPHAL R.**  
Tracheo-bronchial mucin receptor for *Pseudomonas aeruginosa* : predominance of amino sugars in binding sites.  
*Infect. Immun.*, 1985, 48 : 331-335
- [230] **VOS H.L., DE VRIES Y. and HILKENS J.**  
*The mouse episialin (MUC1) gene and its promoter : rapid evolution of the repetitive domain in the protein.*  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, 181 : 121-130
- [231] **WILLIAMS C.J., WRESCHNER D.H., TANAKA A., TSARFATY I., KEYDAR I. and DION A.S.**  
Multiple protein forms of the human breast tumor-associated epithelial membrane antigen (EMA) are generated by alternative splicing and induced by hormonal stimulation.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, 170 : 1331-1338

- [232] **WILSON I.B.H., GAVEL Y. and VON HEIJNE G.**  
Amino acid distributions around O-linked glycosylation sites.  
*Biochem. J.*, 1991, 275 : 529-534
- [233] **WISE R.J., PITTMAN D.D., HANDIN R.I., KAUFMAN R.J. and ORKIN S.H.**  
The propeptide of von Willebrand factor independently mediates the assembly of von Willebrand multimers.  
*Cell*, 1988, 52 : 229-236
- [234] **WRESCHNER D.H., HAREUVENI M., TSARFATY I., SMORODINSKY N., HOREV J., ZARETSKY J., KOTHES P., WEISS M. and LATHE R.**  
Human epithelial tumor antigen cDNA sequences : differential splicing may generate multiple protein forms.  
*Eur. J. Biochem.*, 1990, 189 : 463-473
- [235] **WRESCHNER D.H.**  
*4<sup>th</sup> International Workshop on Carcinoma-Associated Mucins, Cambridge, 1996*
- [236] **XU G., WANG D., HUAN L.J., CUTZ E., FORSTNER G.G. and FORSTNER J.F.**  
Tissue-specific expression of a rat intestinal mucin-like peptide.  
*Biochem. J.*, 1992, 296 : 335-338
- [237] **XU G., HUAN L.J., KHATRI I.A., WANG D., BENNIC A., FAHIM R.E.F., FORSTNER G.G. and FORSTNER J.F.**  
cDNA for the carboxyl-terminal region of a rat intestinal mucin-like peptide.  
*J. Biol. Chem.*, 1992, 267 : 5401-5407
- [238] **XU G., KHATRI I., SAJJAN U.S., McCOOL D., WANG D., JONES C., FORSTNER G. and FORSTNER J.**  
Human intestinal mucin-like protein (MLP) is homologous with rat MLP in the C-terminal region and is encoded by a gene on chromosome 11p15.5.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, 183 : 821-828
- [239] **YEH M.M., PARK N.H., DUH Q., MONTGOMERY C.K., McQUAID K.R., TORIBARA N.W., HO S., SLEISENGER M.H. and KIM Y.S.**  
Association of colorectal cancer prognosis with expression of mucin core peptides and carbohydrate-associated antigens.  
*Gastroenterology, AGA Abstracts*, 1996, 110 : A617
- [240] **YEN T.J., MACHLIN P.S. and CLEVELAND D.W.**  
Autoregulated instability of  $\beta$ -tubulin mRNAs by recognition of the nascent amino terminus of  $\beta$ -tubulin.  
*Nature*, 1988, 334 : 580-584
- [241] **YU C.J., YANG P.C., SHEW J.Y., HONG T.M., YANG S.C., LEE Y.C. and LEE L.N.**  
Mucin mRNA expression in lung adenocarcinoma cell lines and tissues.  
*Oncology*, 1996, 53 : 118-126



[242] ZALESNA G., TSUKUDA H., OKAZAKI K., SLOMIANY B.L. and SLOMIANY A.

Synthesis and initial processing of gastric apomucin.

*Biochem. Int.*, 1989, 18 : 775-784

[243] ZRIHAN-LICHT S., VOS H.L., BARUCH A., ELROY-STEIN O., SAGIV D., KEYDAR I., HILKENS J. and WRESCHNER D.H.

Characterization and molecular cloning of a novel MUC 1 protein, devoid of tandem repeats, expressed in human breast cancer.

*Eur. J. Biochem.*, 1994, 224 : 787-795

