

Différenciation des cellules à mucus et régulation de la mucine gélifiante Muc5b : un nouvel outil pour des études *ex vivo* et précliniques *in vivo*

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

LIRIC - UMR 995 Inserm/Université de Lille/CHU Lille, Lille, France.

jean-luc.desseyn@inserm.fr

> Les épithéliums sécrétoires des tractus digestif (de la bouche à l'anus), respiratoire (des fosses nasales au poumon) ou encore génital sont protégés de l'environnement extérieur par des gels de mucus semi-perméables. Les principales fonctions du mucus sont la lubrification et l'hydratation des épithéliums sous-jacents. Il joue aussi un rôle primordial dans l'élimination de particules étrangères à l'organisme. En effet, il piège, par exemple, à la surface de l'œil les bactéries, poussières et pollens qui sont ensuite éliminés lors de clignements de la paupière. Dans le poumon, les battements des cils à la surface de l'épithélium font remonter au pharynx/larynx le mucus avec les bactéries engluées, qui sont ensuite évacuées par déglutition. Ce mucus est également une niche indispensable qui offre un support nutritif aux bactéries de la flore commensale, particulièrement dans l'intestin et le vagin. Les gels de mucus sont essentiellement constitués d'eau et des mucines gélifiantes. Ces mucines sont des macromolécules de très grande masse moléculaire (plusieurs millions de Da) fortement O-glycosylées et donc difficiles à étudier [1,2] (→). Les mucines gélifiantes, au nombre de 5 chez l'homme, sont très conservées dans l'évolution. Elles sont sécrétées sous forme d'oligomères à la surface des épithéliums. Une fois dans la lumière des organes, elles forment au

contact de l'eau un gel et lui confèrent ses propriétés physiques et chimiques [3]. Les mucines sont produites et stockées par des cellules spécialisées, comme les cellules caliciformes. Elles sont sécrétées en petite quantité de manière constitutive et de manière massive suite à une stimulation. Des modifications de densité de cellules à mucus et de production de mucines sont décrites dans de nombreuses maladies touchant les muqueuses sécrétoires (cancers solides, fibrose, maladies pulmonaires chroniques obstructives, syndrome de l'œil sec, ulcères, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, etc.). De plus, de nombreux épithéliums sécrétoires sont naturellement accessibles, comme dans la bouche, la trachée, le nez, la cavité vaginale ou encore le rectum. En conséquence, les mucines et les cellules à mucus peuvent représenter d'excellents marqueurs biologiques.

Mucine gélifiante Muc5b fluorescente

MUC5B est l'une des 5 mucines humaines gélifiantes. Elle est principalement présente dans le tractus respiratoire, mais elle est également produite dans la vésicule biliaire et par le cervix. Afin de tester si la mucine Muc5b de souris peut être un outil préclinique intéressant, et pour suivre sa production *in vivo*, nous avons couplé génétiquement la mucine de souris Muc5b à la molécule fluorescente de la méduse (*green fluorescent protein*, GFP). La souris « fluorescente »

transgénique Muc5b-GFP a été créée par recombinaison homologue pour remplacer l'unique codon stop du gène *Muc5b* par une séquence optimisée de la GFP [4]. Le profil d'expression de Muc5b-GFP a tout d'abord été déterminé, par immunohistochimie, à l'aide d'anticorps anti-GFP, sur des tissus fixés. Cette expression a été confirmée *ex vivo* sur tissus frais par microscopie à épifluorescence, et *in vivo* chez la souris anesthésiée par microscopie confocale laser endofibrée (MCLE)¹.

Muc5b-GFP, un outil d'étude de la régulation de Muc5b et un modèle préclinique

L'analyse de la souris transgénique *Muc5b-GFP* permet de montrer que cette mucine est produite dans l'oreille moyenne, la conjonctive de l'œil, la cavité nasale, la trachée (Figure 1), la vésicule biliaire, le cervix et le vagin. Elle est également présente très précocement dans le poumon puisque la mucine fluorescente est visualisée dès le jour embryonnaire (E) 12,5 sachant que le temps de gestation d'une souris de laboratoire est compris entre 18 et 21 jours. La parfaite superposition des profils d'expression de Muc5b murin et MUC5B

¹ Cette technique permet de faire de l'imagerie cellulaire en temps réel à l'aide d'une fibre constituée de milliers de microfibrilles qui, à la fois, excitent la protéine fluorescente verte par un laser à 488 nm et enregistrent la fluorescence émise sous forme de films [5]. La fluorescence peut ensuite être quantifiée par traitement des images à l'aide d'un logiciel comme ImageJ.

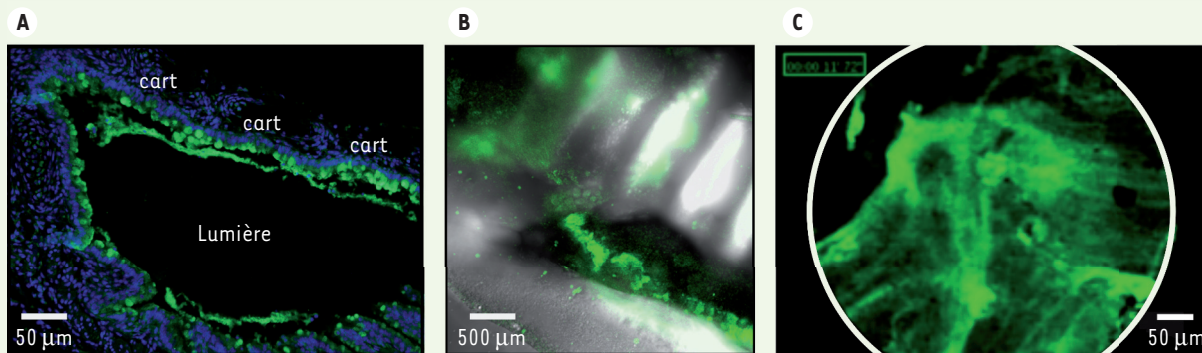


Figure 1. Exemple de visualisation de la production de Muc5b dans la trachée. (A) En immunohistochimie, Muc5b est visualisé en vert. Les noyaux cellulaires sont contre-colorés en bleu. Barre d'échelle, 50 µm ; cart : cartilage. (B) En microscopie sur trachée fraîche, les anneaux cartilagineux sont visualisés en lumière blanche et Muc5b en fluorescence. Barre d'échelle, 500 µm. (C) Par microscopie confocale laser endofibrée (MCLE, appareil Cellvizio, Mauna Kea Technologies), Muc5b apparaît formant des fils de mucus plus ou moins épais (en vert). Barre d'échelle, 50 µm.

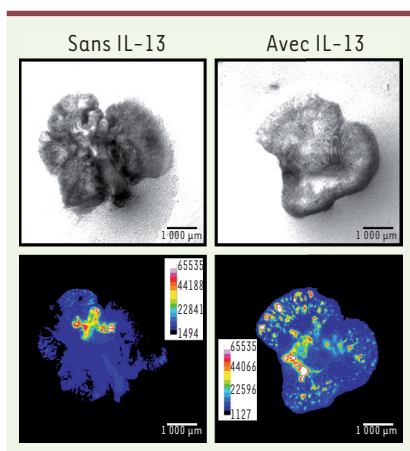


Figure 2. Stimulation de la production de Muc5b par l'IL-13. Des poumons embryonnaires de souris en culture sont visualisés en lumière blanche (partie haute) et en fluorescence (partie basse), 11 jours après ajout d'IL-13 (à droite) et en son absence (à gauche). Les images ont été acquises à l'aide d'un stéréomicroscope à épifluorescence Leica M205 équipé d'une caméra cMOS Flash4.0 (Hamamatsu) au grossissement x 30,3. Les images en fluorescence ont été « pseudo-colorées » en 16 couleurs à l'aide du logiciel ImageJ. Les couleurs froides signifient une fluorescence faible et les couleurs chaudes (vers le rouge) une fluorescence forte reflétant une stimulation de la production de la mucine gélifiante Muc5b par l'IL-13. Barre d'échelle, 1 mm.

humain valide la souris comme modèle pour les pathologies où des anomalies de

production de la mucine sont connues : cancer mammaire [6,7], otites, sinusites, rhinites allergiques, fibroses pulmonaire et trachéale, mucoviscidose, asthme, sécheresses oculaires [4]. Afin d'apporter la preuve de concept que la souris transgénique *Muc5b-GFP* peut être un modèle *ex vivo* et préclinique, nous avons, d'une part, stimulé par l'interleukine (IL) 13 des poumons embryonnaires murins en culture. D'autre part, nous avons mesuré, par MCLE chez des souris anesthésiées, la fluorescence émise par *Muc5b-GFP* dans la cavité vaginale au cours du cycle œstrale et chez des souris gestantes [4]. Nos expériences pharmacologiques sur les cultures d'explants du complexe poumons/trachée d'embryon au stade E12,5 montrent qu'une unique application d'IL-13 suffit pour stimuler la croissance pulmonaire et la différenciation de cellules caliciformes fluorescentes visualisée par stéréomicroscopie à fluorescence. Dans la cavité vaginale de la souris anesthésiée, la production de Muc5b est facilement évaluée par MCLE. On note une régulation hormonale de la production de la mucine puisqu'elle varie durant le cycle œstral atteignant un niveau maximal en pro-oestrus et chez la souris gestante. Un pic de production pré-ovulatoire de MUC5B était connu chez la femme, mais aucune donnée n'avait été publiée chez la souris.

En conclusion

La souris transgénique permet d'étudier la régulation de la production/sécrétion de cette mucine *in vivo*, sous le contrôle de tous les éléments régulateurs naturels du gène. Elle représente un modèle pertinent pour étudier la régulation et la sécrétion de cette mucine chez l'animal vivant ou par des explants, mais également pour isoler des cellules à mucus des voies respiratoires, de l'ectocervix et de la conjonctive. Ce modèle rapporteur rend possible l'étude, chez la souris vivante, de la différenciation en cellules à mucus produisant Muc5b, d'en quantifier leur densité, tout en suivant longitudinalement l'expression de Muc5b, limitant ainsi grandement le nombre d'animaux requis par expérience. La preuve de concept de l'intérêt en recherche préclinique du suivi des modifications chez la souris anesthésiée de la densité de cellules à mucus produisant cette mucine gélifiante vient d'être apportée dans un modèle de sécheresse oculaire, où la diminution de densité de cellules à mucus est contrebalancée par l'application topique d'IL-13 [8]. ♦

Mucous cell differentiation and regulation of the gelling mucin Muc5b: a new tool for *ex vivo* and *in vivo* preclinical studies

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Gouyer V, Gottrand F, Desseyn JL. The extraordinarily complex but highly structured organization of intestinal mucus-gel unveiled in multicolor images. *PLoS One* 2011 ; 6 : e18761.
2. Desseyn JL, Gouyer V, Gottrand F. Modification à façon des propriétés physiques du mucus. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 1063–6.
3. Desseyn JL, Gouyer V, Gottrand F. Biological modeling of mucus to modulate mucus barriers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016 ; 310 : G225–G7.
4. Portal C, Gouyer V, Magnien M, et al. In vivo imaging of the Muc5b gel-forming mucin. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 44591.
5. Salaün M, Bourg-Heckly G, Thiberville L. Confocal endomicroscopy of the lung: from the bronchus to the alveolus. *Rev Mal Respir* 2010 ; 27 : 579–88.
6. Valque H, Gouyer V, Husson MO, et al. Abnormal expression of Muc5b in Cftr-null mice and in mammary tumors of MMTV-ras mice. *Histochem Cell Biol* 2011 ; 136 : 699–708.
7. Valque H, Gouyer V, Gottrand F, et al. MUC5B leads to aggressive behavior of breast cancer MCF7 cells. *PLoS One* 2012 ; 7 : e46699.
8. Portal C, Gouyer V, Gottrand F, et al. Preclinical mouse model to monitor live Muc5b-producing conjunctival goblet cell density under pharmacological treatments. *PLoS One* 2017 ; 12 : e0174764.

NOUVELLE

PiT1 : du transport de phosphate à la signalisation insulinaire

Anne Forand

Inovation, F-75013, Paris, France ;
Inserm U1151-CNRS UMR8253,
Institut Necker-Enfants Malades (INEM),
université Paris Descartes,
F-75993 Paris, France.
anne.forand@inovation.com

> L'obésité est aujourd'hui une maladie répandue dans le monde entier. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, en 2014, 39 % des adultes de plus de 18 ans étaient en surpoids et, parmi eux, 13 % étaient obèses. Ces chiffres ont été multipliés par deux depuis 1980.

L'obésité est un facteur de risque aggravant pour des maladies cardiovasculaires, le diabète de type II et le syndrome métabolique [1] (→). Ce dernier se caractérise notamment par une augmentation du tissu adipeux viscéral, par une résistance à l'insuline et une hypertension.

Le foie, organe majeur du métabolisme

Le foie est l'organe majeur qui régule à la fois l'homéostasie glucidique et lipidique. Chez un individu sain, l'apport de glucose par l'alimentation stimule la production d'insuline au niveau du pancréas. L'insuline agit sur différents tissus cibles afin de diminuer la glycémie sanguine et la ramener à un taux basal. Elle stimule l'entrée de glucose au niveau des muscles, du foie et du tissu adipeux (TA) où il va être stocké sous forme de lipides via la lipogenèse

(dans le foie et le TA) ou sous forme de glycogène (dans le foie et le muscle). L'insuline inhibe également la production de glucose par le foie (appelée néoglucogenèse). Chez un individu insulino-résistant, les organes cibles ne répondent pas, ou mal, à l'insuline avec pour conséquence, un relargage continu d'acide gras par les adipocytes (hyperlipidémie), une production continue de glucose par le foie (hyperglycémie) ainsi qu'une accumulation d'acides gras sous forme de triglycérides (stéatose hépatique) [2].

Il était une « foie » PiT1...

La protéine membranaire PiT1 (*inorganic phosphate transporter 1*) est constituée de 12 domaines transmembranaires et d'une large boucle intracellulaire. Initialement identifiée comme un récepteur de rétrovirus, PiT1 joue un rôle de co-transporteur sodium-phosphate. Depuis quelques années, de nouvelles fonctions ont été mises en évidence pour cette protéine. Elle a été notamment impliquée dans la régulation de la prolifération, de l'adhérence et de la densité cellulaire, mais aussi dans l'apoptose induite par le TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) ou encore la différencia-

tion érythrocytaire [3]. La plupart de ces nouvelles fonctions ont été décrites comme étant indépendantes de sa fonction de transporteur de phosphate. L'inactivation totale du gène codant la protéine PiT1 chez la souris a pour conséquence une létalité embryonnaire à 12,5 jours de gestation. Les embryons meurent d'une anémie sévère et présentent un foie apoptotique, celui-ci étant l'organe hématopoïétique à ce stade du développement [4].

Dans le but de déterminer si la protéine PiT1 pouvait jouer un rôle dans le fonctionnement du foie, nous avons croisé des souris portant le gène *PiT1* flanqué de 2 sites loxP¹ avec des souris exprimant la recombinase Cre¹ sous contrôle du promoteur de l'albumine [5]. Ce promoteur, exprimé uniquement dans les hépatocytes, n'est que très faiblement actif en fin de gestation, son activité augmentant ensuite graduellement après la naissance [6]. Les souris qui naissent de ce croisement (que nous nommerons par la

¹ Le système de recombinaison Cre-lox utilise l'enzyme recombinase Cre, une tyrosine recombinase issue du bactériophage P1, afin de cibler des séquences loxP (également issues du bactériophage P1), permettant ainsi d'activer, réprimer, voire même échanger, les gènes situés entre les séquences lox.