



HAL
open science

Modification des gels de mucus par la délivrance de molécules composées de domaines CYS

Bastien Demouveau

► **To cite this version:**

Bastien Demouveau. Modification des gels de mucus par la délivrance de molécules composées de domaines CYS. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS029 . tel-03418084

HAL Id: tel-03418084

<https://theses.hal.science/tel-03418084>

Submitted on 6 Nov 2021

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

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

Université de Lille
Thèse de Doctorat d'Université
présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Lille

Spécialité :
Sciences de la Vie et de la Santé

**Modification des gels de mucus par la
délivrance de molécules composées de
domaines CYS**

Bastien Demouveau

Soutenue publiquement le 10 octobre 2019 à Lille devant le jury composé de :

M. le Professeur Frédéric GOTTRAND	Président
Mme. le Docteur Muriel MERCIER-BONIN	Rapporteur
M. le Docteur Fabrice NEIERS	Rapporteur
Mme. le Docteur Muriel THOMAS	Examineur
M. le Professeur Jean LESAGE	Examineur
M. le Docteur Jean-Luc DESSEYN	Directeur de thèse

À mes parents,

Voyez en ce travail l'expression de toute ma reconnaissance.

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

UMR 995, équipe du Professeur Frédéric Gottrand

Université de Lille / Inserm / CHU de Lille

Faculté de Médecine – Pôle Recherche – 5^{ème} étage

1 place de Verdun

59045 Lille

Remerciements

Ce travail n'aurait pas pu être mené sans le soutien financier de la **Région Hauts-de-France** et du **Centre Hospitalo-Universitaire de Lille** que je remercie sincèrement.

Je tiens également à remercier,

Madame le **Docteur Muriel Mercier-Bonin** et Monsieur le **Docteur Fabrice Neiers** de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

Madame le **Docteur Muriel Thomas** et Monsieur le **Professeur Jean Lesage** pour avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le **Professeur Frédéric Gottrand** pour m'avoir intégré au sein de son équipe de recherche et pour avoir accepté de présider mon jury de thèse et Monsieur le **Professeur Pierre Desreumaux** pour m'avoir accueilli dans son unité de recherche.

Monsieur le **Docteur Jean-Luc Desseyn**, vous avez accepté de m'encadrer durant ces quatre dernières années et je vous en remercie. Merci pour votre disponibilité, votre patience, votre rigueur scientifique et les nombreuses heures que vous avez passées à relire

et corriger mes écrits. J'ai beaucoup appris à vos côtés et vous adresse ma gratitude pour cela.

Madame le **Docteur Valérie Gouyer** pour avoir co-encadré ce travail. Je vous remercie pour le temps que vous m'avez consacré et la bienveillance que vous m'avez témoignée. Merci également pour les compétences techniques que m'avez enseignées notamment le fameux « protocole de la Thérèse » que je ne pouvais omettre de citer dans ce manuscrit. Vous avez largement contribué à la formation de qualité que j'ai reçue dans ce laboratoire et en cela je vous suis reconnaissant.

Monsieur le **Docteur Tetsuharu Narita** pour sa grande disponibilité quand certains concepts de rhéologie me paraissaient trop obscurs. Merci également pour la lecture attentive de mon travail de thèse.

Madame le **Docteur Catherine Robbe-Masselot** et Madame le **Docteur Caroline Cieniewski-Bernard** pour avoir réalisé les études de spectrométrie de masse que je présente dans ce manuscrit.

Monsieur le **Professeur Vincent Phalip** et Madame le **Docteur Alice Rochex** pour leur aide dans la production de molécules recombinantes par la levure *Pichia pastoris*. Merci pour vos nombreux conseils et les moyens matériels que vous avez mis à ma disposition.

Madame le **Docteur Chantal Fradin** pour ses conseils avisés sur la transformation de *Pichia pastoris* et, plus généralement, sur la biochimie et la biologie moléculaire.

Monsieur le **Docteur Didier Beigbeder** et **François Fasquelle** pour leurs explications sur la caractérisation de particules par diffusion dynamique de la lumière.

Ségolène Plet et **Mylène Magnien** pour leur aide précieuse et leurs nombreux conseils. Merci également d'avoir partagé votre bonne humeur au quotidien.

Un grand merci à toutes les personnes que j'ai eu le plaisir de côtoyer dans le laboratoire, Delphine Ley, Thierry Jouault, Salah-Eddine Amini, Thomas Hueso et Guillaume Lacroix, pour les moments que nous avons partagés.

Enfin, ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner ma famille et mes amis dont le soutien sans faille m'a permis de mener à son terme ce travail de thèse.

Communications scientifiques

— Communications orales sélectionnées sur résumé

2019 PROAKAP4 concentrations as an indicator of good spermatogenesis and sperm quality under oxydative stress conditions

M. Delehedde, **B. Demouveau**, G. Remy, M. Selleslagh, Q. Dewulf, J.-L. Desseyn, P. Moreau, P. Gosset, M. Pichavant, N. Sergeant

American Society of Andrology, Chicago (Illinois), 6–9 avril

2019 Mucus enrichment with CYS domain from gel-forming mucins remodels the mucus protein matrix and hinders motile cell displacements

B. Demouveau, V. Gouyer, C. Robbe-Masselot, F. Gottrand, T. Narita, J.-L. Desseyn

Gordon Research Seminar : Cilia, Mucus and Muciliary Interactions, Barga (Italie), 16–17 février

2017 Gel-forming mucin CYS domain decreases particles permeability and bacteria motility *in vitro* and *ex vivo*

B. Demouveau, V. Gouyer, C. Robbe-Masselot, F. Gottrand, J.-L. Desseyn

Mucins in health and disease, Cambridge (Royaume-Uni), 24-28 juillet

— **Résumés publiés**

2019 ProAKAP4 concentrations as an indicator of good spermatogenesis and sperm quality under oxidative stress conditions

M. Delehedde, **B. Demouveau**, G. Remy, M. Selleslagh, Q. Dewulf, J.-L. Desseyn, M. Moreau, P. Gosset, M. Pichavant, N. Sergeant

Andrology **7** (S1) 85

2019 Evaluation of the proAKAP4 detection kits as functional tests of sperm quality under stress conditions

M. Delehedde, **B. Demouveau**, G. Remy, J.-L. Desseyn, V. Mitchell, A.L. Barbotin, P. Gosset, M. Pichavant, N. Sergeant

Human Reproduction. In Press.

— **Communications affichées**

2019 Mucus enrichment with CYS domain from gel-forming mucins remodels the mucus protein matrix and hinders motile cell displacements

B. Demouveau, V. Gouyer, C. Robbe-Masselot, F. Gottrand, T. Narita, J.-L. Desseyn

Young Scientist Forum & Federation of European Biochemical Societies Congresses, Cracovie (Pologne), 3–11 juillet

2019 Evaluation of the ProAKAP4 Detection kits as functional tests of sperm quality under stress conditions

M. Delehedde, **B. Demouveau**, G. Remy, J.-L. Desseyn, V. Mitchell, A.L. Barbotin, P. Gosset, M. Pichavant, N. Sergeant

European Society of Human Reproduction and Embryology, Vienne (Autriche), 23–26 juin

2019 Mucus enrichment with CYS domain from gel-forming mucins remodels the mucus protein matrix and hinders motile cell displacements

B. Demouveau, V. Gouyer, C. Robbe-Masselot, F. Gottrand, T. Narita, J.-L. Desseyn

Gordon Research Conference : Cilia, Mucus and Mucociliary Interactions, Barga (Italie), 17–21 février

2018 CYS domain delivery remodels the mucin network hindering bacteria and spermatozoa

B. Demouveau, V. Gouyer, F. Gottrand, J.-L. Desseyn

Journée André Verbert, Lille, 13 septembre

— Publications dans des journaux à comité de lecture

- 2019** Mucin CYS domain stiffens the mucus gel hindering bacteria and spermatozoa
B. Demouveau, V. Gouyer, C. Robbe-Masselot, F. Gottrand, T. Narita, J.-L. Desseyn
Scientific Reports **9** 16993
- 2018** Gel-forming mucin interactome drives mucus viscoelasticity
B. Demouveau, V. Gouyer, F. Gottrand, T. Narita, J.-L. Desseyn
Advances in Colloid and Interface Science **252** p 69–82
- 2018** La structure des mucines conditionne les propriétés viscoélastiques des gels de mucus
B. Demouveau, V. Gouyer, M. Magnien, S. Plet, F. Gottrand, T. Narita, J.-L. Desseyn
médecine/sciences **34** (10) p 806–812
- 2018** Non-*C*-mannosylable mucin CYS domains hindered proper folding and secretion of mucin
V. Gouyer, **B. Demouveau**, G. Lacroix, H. Valque, F. Gottrand, J.-L. Desseyn
Biochemical and Biophysical Research Communications **506** (4) p 812–818

Prix

- 2019** Bourse de voyage pour les congrès YSF & FEBS
Federation of European Biochemical Societies
- 2019** Bourse de voyage pour la conférence Gordon (Cil, Mucus et Interactions
Mucociliaires)
École Doctorale Biologie-Santé de Lille
- 2018** Meilleur résumé en anglais
Selon un jury interne au LIRIC
- 2016** Allocation de recherche
Concours de l'École Doctorale Biologie-Santé de Lille

Résumé

Le mucus est un gel conservé chez les vertébrés et les invertébrés. Ses fonctions majeures sont la protection et l'hydratation des épithéliums non kératinisés. Les mucines gélifiantes sont des protéines multi-domaines qui s'associent en polymères linéaires et enchevêtrés pour former la matrice glycoprotéique du mucus. Les interactions covalentes bien caractérisées des mucines, mais aussi les associations non covalentes (réversibles), sont responsables du caractère viscoélastique du mucus. Le domaine CYS des mucines est retrouvé dans le mucus à la surface de toutes les muqueuses sécrétoires humaines. Il est très conservé chez les vertébrés et très hydrophobe. De ce fait, il est l'un des meilleurs candidats pour l'établissement de liaisons hydrophobes réversibles.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'impact d'un enrichissement en domaine CYS sur les propriétés des gels de mucus. Pour cela, un modèle murin transgénique (Tg222) et une lignée cellulaire muco-sécrétante (HT29-MTX E12), sécrétant constitutivement une molécule recombinante composée de 12 domaines CYS consécutifs (rCYS \times 12), ont été développés. L'effet de la délivrance endogène de rCYS \times 12 sur la perméabilité du gel de mucus, la motilité cellulaire et les propriétés rhéologiques du gel ont été étudiés. Des modèles cellulaires sécrétant des molécules constituées de domaines CYS (poly-CYS) ont aussi été développés afin d'envisager la délivrance exogène de cette molécule, et d'étudier son effet dans un contexte pathologique.

La délivrance endogène de rCYS \times 12 dans le mucus de la lignée cellulaire HT29-MTX E12 diminue la perméabilité du gel de mucus. La sécrétion de rCYS \times 12 est également associée à une diminution de la motilité bactérienne (vitesse et linéarité

du déplacement) dans les mucus des modèles cellulaire et murin. Les propriétés rhéologiques du mucus colique murin ont été déterminées à plusieurs échelles. La délivrance de rCYS×12 entraîne un remodelage de la matrice protéique du mucus en réduisant la taille des mailles que forment les mucines gélifiantes. La production d'une molécule poly-CYS a été développée chez la levure *Pichia pastoris* et dans la lignée cellulaire d'origine humaine HEK293. Contrairement à *P. pastoris*, la lignée HEK293 produit et sécrète la molécule poly-CYS sans modifications importantes apparentes.

La molécule rCYS×12 revêt un grand intérêt thérapeutique pour renforcer les gels de mucus dans des contextes pathologiques, comme la rectocolite hémorragique ou les infections intra-utérines. Le développement de modèles sécrétant stablement une molécule poly-CYS permettra de réaliser des tests de délivrance exogène, et ainsi déterminer le potentiel thérapeutique de cette molécule.

Mots clés : mucus ; mucines ; domaine CYS ; motilité ; rhéologie ; molécule recombinante

Abstract

Mucus is a gel conserved among vertebrates and invertebrates. Its major functions are the protection and hydration of non-keratinized epithelia. Gel-forming mucins are multi-domain proteins, which self-associate together to form linear and entangled polymers to form the mucus glycoprotein matrix. The well-characterized covalent interactions, but also non-covalent (reversible) links, are responsible for the viscoelastic character of mucus. The mucin CYS domain is found in mucus on the surface of all secretory human mucosae. It is very well conserved in vertebrates and very hydrophobic. Thus, it is one of the best candidates for establishing reversible hydrophobic bonds.

The aim of this work is to study the impact of CYS domain enrichment on properties of mucus gels. For this, a transgenic mouse model (Tg222) and a mucus-secreting cell line (HT29-MTX E12), constitutively secreting a recombinant molecule made of 12 consecutive CYS domains (rCYS \times 12), were developed. The effect of endogenous delivery of rCYS \times 12 on mucus gel permeability, cellular motility and rheological properties was studied (micro- and macro-scale). Cellular models secreting a molecule made up of CYS domains (poly-CYS) have also been developed in order to consider the exogenous delivery of this molecule, and to study its effect in a pathological context.

Endogenous delivery of rCYS \times 12 into the mucus of the HT29-MTX E12 cell line decreased the permeability of the mucus gel. The secretion of rCYS \times 12 was also associated with a decrease in bacterial motility (velocity and linearity of displacement) in the mucus of the cellular and mouse models. The rheological properties of the colonic mucus were determined at multi-scale levels. The delivery of rCYS \times 12 leads to a remodeling of the

mucus protein matrix by reducing its mesh size. The production of a poly-CYS molecule was developed in the yeast *Pichia pastoris* and in the human cell line HEK293. Unlike *P. pastoris*, the HEK293 cell line produced and secreted the poly-CYS molecule without apparent modifications.

The rCYS \times 12 is of great therapeutic interest for strengthening mucus gels in pathological contexts such as ulcerative colitis or intrauterine infections. The development of models stably secreting the poly-CYS molecule will make it possible to carry out exogenous delivery tests, and thus to evaluate the therapeutic potential of this molecule.

Keywords: mucus; mucins; CYS domain; motility; rheology; recombinant molecule

Sommaire

Remerciements	i
Communications scientifiques	iv
Prix	x
Résumé	xi
Abstract	xiii
Sommaire	xv
Liste des abréviations	xxii
Liste des figures	xxiv
Liste des tableaux	xxvii
Avant-propos	2
1 Introduction	6
1.1 Mucines et mucus	6
1.1.1 Les mucines	6
1.1.1.1 Les mucines membranaires	6

1.1.1.2	Les mucines sécrétées	7
1.1.1.2.1	Organisation génomique	7
1.1.1.2.1.1	Le cluster 11p15.5	7
1.1.1.2.1.2	<i>MUC19</i> et <i>Muc19</i>	10
1.1.1.2.1.3	<i>MUC7</i>	10
1.1.1.2.2	Structure de l'apomucine	11
1.1.1.2.2.1	La région amino-terminale	13
1.1.1.2.2.2	La région centrale	14
1.1.1.2.2.3	La région carboxy-terminale	15
1.1.1.2.3	Évolution phylogénétique	15
1.1.1.2.4	Profil d'expression des mucines gélifiantes	17
1.1.1.2.4.1	Au cours du développement	17
1.1.1.2.4.2	Chez l'adulte sain	18
1.1.1.2.5	Modifications co- et post-traductionnelles	20
1.1.1.2.5.1	<i>N</i> -glycosylation	20
1.1.1.2.5.2	<i>C</i> -mannosylation	22
1.1.1.2.5.3	<i>O</i> -glycosylation	23
1.1.1.2.5.4	<i>S</i> -palmitoylation	24
1.1.1.2.6	Biosynthèse et exocytose	25
1.1.2	Le mucus	27
1.1.2.1	Composition	27
1.1.2.1.1	Peptides en trèfle	28
1.1.2.1.2	Lipides	28
1.1.2.1.3	Immunoglobulines	29
1.1.2.1.4	Protéine liant le fragment Fc des IgG	30
1.1.2.1.5	Transglutaminases	31

1.1.2.1.6	Protéases endogènes	31
1.1.2.1.7	ADN	33
1.1.2.2	Propriétés	33
1.1.2.2.1	Hydratation et lubrification	34
1.1.2.2.2	Barrière	34
1.1.2.2.3	Adaptabilité	37
1.1.2.2.3.1	Modulation du <i>O</i> -glycome	37
1.1.2.2.3.2	Maturation fonctionnelle par le microbiote	38
1.1.2.3	Motilité cellulaire	39
1.2	Propriétés rhéologiques des gels de mucus	42
1.2.1	Méthodes d'investigation	42
1.2.1.1	Microfluidique	42
1.2.1.2	Rhéométrie	43
1.2.1.3	Micro-rhéologie	46
1.2.1.4	Sédimentation de particules	53
1.2.2	Rhéologie des gels de mucus	55
1.2.2.1	Applications de la micro-rhéologie à l'étude des gels de mucus	55
1.2.2.2	Applications de la macro-rhéologie à l'étude des gels de mucus	60
1.2.3	Modulation de la rhéologie du mucus	64
1.2.3.1	Par des facteurs physico-chimiques	64
1.2.3.1.1	pH	64
1.2.3.1.2	Environnement ionique	67
1.2.3.1.2.1	Osmolarité	67
1.2.3.1.2.2	Cas des ions calcium	67

1.2.3.1.3	Oxydation	68
1.2.3.2	Par des facteurs biologiques, pharmacologiques et environ- nementaux	69
1.2.3.2.1	Concentration des mucines	69
1.2.3.2.2	Cycle hormonal	71
1.2.3.2.3	Agents mucolytiques	72
1.2.3.2.4	Exposome	73
1.2.3.2.5	Domaine CYS	74
1.2.3.2.5.1	Structure	74
1.2.3.2.5.2	Phylogénie et conservation	79
1.2.3.2.5.3	Fonctions	80
1.2.3.2.5.4	Modèle Transgénique 222	81
1.3	Stratégie de l'étude et intérêt du travail	86
2	Matériel et Méthodes	89
2.1	Biologie moléculaire	89
2.1.1	Génération du modèle HT29-MTX E12 sécrétant la molécule rCYS×12	89
2.1.2	Génération du modèle <i>Pichia pastoris</i> sécrétant rCYS×3	92
2.1.2.1	Préparation du vecteur pPICZ-ΔFSS-rCYS×3	92
2.1.2.2	Transformation de <i>Pichia pastoris</i>	98
2.1.2.3	Sélection des clones recombinants	99
2.1.3	Génération du modèle cellulaire HEK293 sécrétant la molécule rCYS×3	99
2.1.3.1	Préparation du vecteur pcMG-GST-rCYS×3-IRES-Luc	99
2.1.3.2	Transfection des cellules HEK293	104

2.1.4	PCR quantitative	105
2.2	Culture cellulaire	106
2.2.1	<i>Pichia pastoris</i>	106
2.2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	107
2.2.3	Lignée cellulaire HT29-MTX E12	108
2.2.4	Lignée cellulaire HEK293	110
2.3	Prélèvement de mucus colique murin	110
2.3.1	Élevage et génotypage des animaux	110
2.3.2	Prélèvement du mucus	110
2.4	Biochimie	113
2.4.1	Purification de rCYS×3	113
2.4.1.1	Dans le modèle <i>Pichia pastoris</i>	113
2.4.1.2	Dans la lignée HEK293	114
2.4.2	Western blot	114
2.4.3	Coloration à l'argent	115
2.4.4	Ultra-centrifugation sur gradient de saccharose	116
2.5	Motilité cellulaire	116
2.5.1	Motilité de bactéries	116
2.5.2	Motilité de spermatozoïdes	118
2.6	Micro-rhéologie	119
2.6.1	Tests de perméabilité	119
2.6.2	Préparation des nanoparticules	119
2.6.3	Suivi de particules	121
2.7	Immunohistochimie	122

3 Résultats	124
3.1 Étude de la délivrance endogène de la molécule rCYS×12 dans la lignée cellulaire HT29-MTX E12	124
3.1.1 Caractérisation des co-cultures	124
3.1.2 Étude de la perméabilité des co-cultures MTX:MTX-rCYS×12 . . .	132
3.1.3 Motilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> à la surface des co-cultures MTX:MTX-rCYS×12	134
3.2 Étude de la délivrance endogène de la molécule rCYS×12 dans le modèle murin Tg222	136
3.2.1 Motilité de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium dans le mucus colique	136
3.2.2 Motilité de spermatozoïdes murins dans du mucus enrichi par rCYS×12	138
3.2.3 Propriétés macro- et micro-rhéologiques du mucus colique	140
3.2.3.1 Caractérisation des particules	140
3.2.3.2 Propriétés micro-rhéologiques du mucus à l'échelle nanométrique	142
3.2.3.3 Propriétés micro-rhéologiques du mucus à l'échelle micro-métrique	145
3.3 Développement de modèles produisant rCYS×3	147
3.3.1 Production de rCYS×3 dans le modèle <i>Pichia pastoris</i>	147
3.3.1.1 Transformée par le vecteur pPICZ- α -rCYS×3	148
3.3.1.1.1 Production	148
3.3.1.1.2 Purification	150
3.3.1.2 Transformée par le vecteur pPICZ- Δ FSS-rCYS×3	150
3.3.2 Production de rCYS×3 dans la lignée cellulaire HEK293	152

3.3.2.1	Production et purification de GST-rCYS×3	152
3.3.2.1.1	Production	152
3.3.2.1.2	Purification	154
3.3.2.2	Caractérisation de GST-rCYS×3 par spectrométrie de masse	155
4	Discussion et perspectives	156
4.1	Modifications du gel de mucus par la co-sécrétion de rCYS×12 avec les mucines gélifiantes	156
4.1.1	Perméabilité des gels de mucus	156
4.1.2	Motilité de bactéries dans le mucus	157
4.1.3	Motilité de spermatozoïdes dans le mucus	160
4.1.4	Analyse des propriétés micro-rhéologiques des gels de mucus	162
4.2	Production de rCYS×3 par des modèles cellulaires	165
4.2.1	Par la levure <i>Pichia pastoris</i>	165
4.2.2	Par la lignée HEK293	169
4.2.3	Applications potentielles de rCYS×3 en contexte pathologique . . .	171
5	Conclusion	173
	Bibliographie	176
	Annexe 1	221
	Annexe 2	236
	Annexe 3	244
	Annexe 4	256

Liste des abréviations

aa	acide aminé
ARNm	acide ribonucléique messenger
CK	<i>cystine knot</i>
DNMT1	<i>DNA methyltransferase 1</i>
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>
F-actine	actine fibrillaire
FcGBP	<i>Fc fragment of IgG Binding Protein</i>
GalNac	N-acétylgalactosamine
IgX	Immunoglobuline de type X
LPC	liquide périciliaire
LPS	lipopolysaccharide
MEB	Microscopie électronique à balayage
MSD	<i>Mean square displacement</i>
N9	nonoxynol-9
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>

PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PEG	Polyéthylène glycol
ppGalNac	polypeptide <i>N</i> -acétylgalactosaminyltransférase
RE	réticulum endoplasmique
rpm	rotations par minute
RT-PCR	réaction en chaîne par polymérase après rétro-transcription de l'ARN
Smgc	<i>Submandibular gland protein C</i>
TG	Transglutaminase
Tg222	modèle murin transgénique 222
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VNTR	<i>Variable number of tandem repeat</i>
vWB	domaine B du facteur de von Willebrand
vWC	domaine C du facteur de von Willebrand
vWD	domaine D du facteur de von Willebrand

Liste des figures

1	Observation du mucus de cellules HT29-MTX E12 par microscopie électronique à balayage	3
2	Représentation schématique du locus chromosomique 11p15.5 et du gène <i>MUC5B</i> humain	8
3	Structure des mucines gélifiantes humaines	12
4	Schéma d'évolution des mucines gélifiantes du locus 11p15	16
5	Profil d'expression des mucines gélifiantes chez l'Homme sain	19
6	Représentation schématique des types de chaînes glycaniques portées par les mucines gélifiantes	21
7	Schéma de la biosynthèse des mucines gélifiantes	26
8	Migration de spermatozoïdes dans le mucus cervical observée par MEB	41
9	Effet du diamètre des particules sur leur diffusion dans le mucus	48
10	Courbes représentatives du déplacement quadratique moyen en fonction du retard et des propriétés rhéologiques du fluide étudié	51
11	Paramètres régissant la sédimentation d'une particule dans un fluide au repos	54
12	Des propriétés physico-chimiques des virus à la synthèse de nanoparticules muco-pénétrantes	59

13	Viscosité dynamique du mucus en fonction du tissu muco-sécrétant chez l'Homme sain	62
14	Relation entre le pH du mucus et la conformation des mucines gélifiantes .	65
15	Impact de la concentration des mucines gélifiantes sur l'ultrastructure du mucus	70
16	Propriétés physico-chimiques des séquences primaires des domaines CYS humains	76
17	Similitudes structurales entre la protéine recombinante rCYS×12 et l'oïkosine 1	83
18	Élaboration du modèle murin Tg222 et résultats acquis	84
19	Schéma du vecteur permettant la production de rCYS×12 par les cellules HT29-MTX E12	91
20	Excision du facteur de sécrétion α -FSS du vecteur pPICZ- α -rCYS×3 . . .	93
21	Préparation du vecteur pcMG-GST-rCYS×3-IRES-Luc pour la transfection en cellules HEK293	101
22	Schéma du dispositif expérimental pour l'étude de rCYS×12 dans le modèle cellulaire HT29-MTX E12	109
23	Observation de biopsies d'iléon frais de souris de type sauvage et transgénique par microscopie à épifluorescence	112
24	Expression et production des mucines gélifiantes dans les co-cultures MTX:MTX-rCYS×12	126
25	Caractérisation des co-cultures MTX:MTX-rCYS×12	128
26	Perméabilité du mucus de co-cultures MTX:MTX-rCYS×12 à des particules de 3 μ m de diamètre	133
27	Motilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> à la surface des co-cultures MTX:MTX-rCYS×12	135

28	Motilité de <i>Salmonella enterica</i> dans le mucus colique de souris WT et Tg222137	
29	Motilité de spermatozoïdes dans le mucus colique de souris WT et Tg222	139
30	PEGylation des nano- et microparticules	141
31	Diffusion de nanoparticules de 200 nm de diamètre dans le mucus colique de souris WT et Tg222	143
32	Diffusion de nanoparticules de 1 μ m dans le mucus colique de souris WT et Tg222	146
33	Production et purification de rCYS \times 3 par <i>Pichia pastoris</i> transformée par le vecteur pPICZ- α -rCYS \times 3	149
34	Production et purification de rCYS \times 3 par la levure <i>Pichia pastoris</i> transformée par le vecteur pPICZ- Δ FSS-rCYS \times 3	151
35	Production et purification de GST-rCYS \times 3 par la lignée cellulaire HEK293	153
36	Mise en évidence de l'hétérogénéité du mucus par micro-rhéologie	164
37	Sites de glycosylation potentiels de la molécule rCYS \times 3 produite par <i>Pichia pastoris</i>	168
38	La délivrance endogène de rCYS \times 12 piège les bactéries dans le réseau de mucines gélifiantes	175

Liste des tableaux

1	Caractéristiques des gènes <i>MUC2</i> , <i>MUC5AC</i> , <i>MUC5B</i> et <i>MUC6</i>	9
2	Variabilité de la taille des mailles du mucus	57
3	Analyse des séquences des domaines CYS humains	77
4	Exemples de mucines avec des domaines CYS dans le règne animal	79
5	Tailles théoriques des fragments attendus après digestion des vecteurs pcMG-IRES-Luc, pcMG-GST-rCYS×3-IRES-Luc et pMOS-GST-rCYS×3 par les enzymes de restriction <i>ClaI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>EcoRV</i> ou <i>SspI</i>	104
6	Séquences des amorces et des sondes utilisées pour la quantification de l'expression des mucines gélifiantes dans les cellules MTX et MTX-rCYS×12106	
7	Caractéristiques des anticorps primaires	115
8	Détermination du profil de <i>O</i> -glycosylation des mucines gélifiantes sécrétées par les cellules MTX et MTX-rCYS×12	131
9	Caractérisation des particules par diffusion dynamique de la lumière	142

Mucus :

*«Sécrétion visqueuse contenant des protéines et des glucides sous forme de mucines,
produite par les cellules des muqueuses et jouant un rôle de protection.»*

Dictionnaire Larousse

Avant-propos

Le mucus n'a pas nécessairement une image très séduisante dans l'imaginaire collectif. Cependant, il constitue un intérêt grandissant pour la communauté scientifique. À titre d'exemple, 522 publications contenaient le mot mucus en 1998 selon la base de données Pubmed. Le nombre de publications n'a cessé de s'accroître pour doubler 20 ans plus tard. La définition de mucus dans le dictionnaire Larousse ne reflète pas la complexité et la dynamique des gels de mucus. Si les mucines sont en effet le support organique majeur de la viscosité des gels de mucus, d'autres protéines sont également impliquées dans cette propriété. Dans la première partie de ce travail, nous décrirons les structures génomique et protéique des mucines et nous verrons qu'elles ne sont pas toutes impliquées dans la formation des gels de mucus. Les caractéristiques structurales et biochimiques des mucines gélifiantes rendent l'étude du mucus dans sa forme native complexe. La formation d'un gel de mucus dépend étroitement de la capacité des mucines gélifiantes à former des polymères linéaires assemblés en un réseau enchevêtré hydrophile (Figure 1). Nous nous intéresserons également aux composés non-mucine impliqués dans la formation du mucus. Une fois la composition des gels de mucus décrite, nous pourrions alors nous intéresser aux fonctions du mucus chez l'Homme, qui ne sont pas restreintes à la protection des épithéliums. Ensuite, nous nous focaliserons sur les propriétés rhéologiques des gels de mucus et comment les étudier. Nous verrons qu'en plus du caractère visqueux, le mucus est également élastique. Cette viscoélasticité dépend étroitement des échelles spatiale et

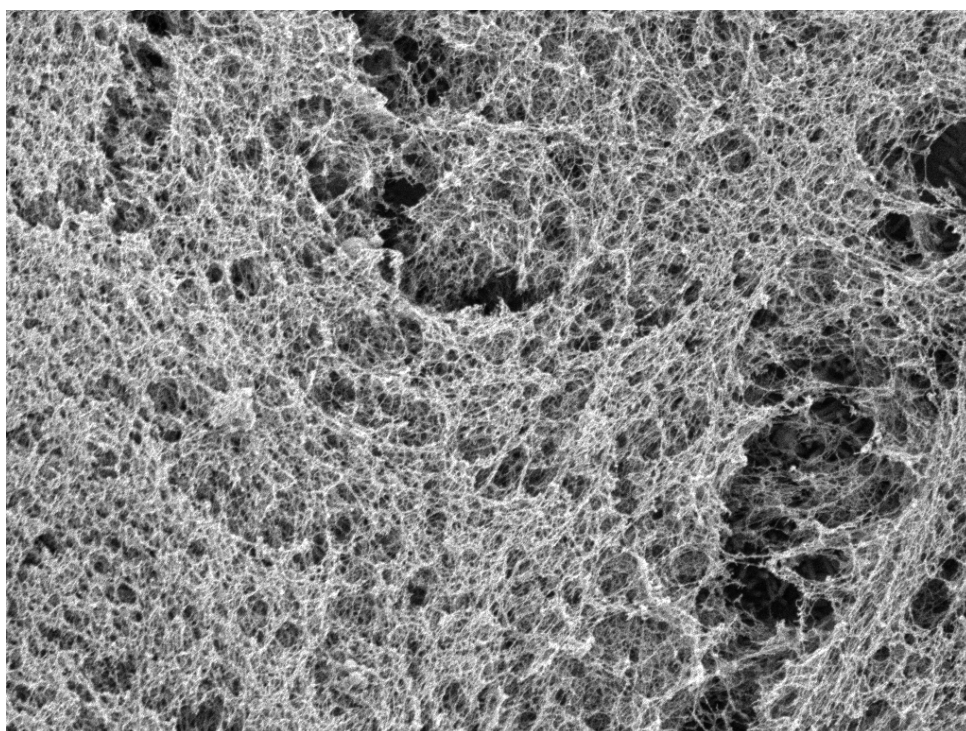


FIGURE 1 – Observation du mucus de cellules HT29-MTX E12 par microscopie électronique à balayage

La lignée cellulaire HT29-MTX E12 sécrète un gel de mucus à sa surface dont la structure en réseau peut être observée par microscopie électronique à balayage (MEB). Grossissement $\times 7000$. Données du laboratoire non publiées.

temporelle. La viscoélasticité du mucus n'est pas statique, car de nombreux facteurs, biologiques ou non, peuvent la moduler, notamment en modifiant l'interactome des mucines gélifiantes.

Notre équipe de recherche s'intéresse de longue date aux mucines gélifiantes et à leur rôle dans la physiologie et la pathophysiologie des muqueuses sécrétoires. C'est le séquençage nucléotidique de *MUC5B* au cours des travaux du Dr. Jean-Luc Desseyn qui a mis en exergue le domaine CYS des mucines gélifiantes. Ce travail de thèse a pour objectif de mieux comprendre la fonction de ce domaine en situation physiologique, par l'étude de l'effet d'un enrichissement du mucus par une protéine composée de domaines CYS. L'étude bibliographique présentée dans la première partie de ce travail a fait l'objet de publications dans la revue de langue française *médecine/sciences* et dans la revue internationale *Advances in Colloid and Interface Science* (voir Annexes 1 et 2).

La seconde partie de ce manuscrit concerne les résultats obtenus durant ces trois années. Dans un premier temps, nous avons complété les données publiées sur le modèle murin transgénique Tg222 qui a un mucus intestinal renforcé par la sécrétion d'une molécule constituée de 12 domaines CYS. Dans ce travail de thèse, le renforcement du gel a été évalué en déterminant ses propriétés rhéologiques et la motilité de bactéries et spermatozoïdes. Ces résultats ont ensuite été confrontés à ceux obtenus avec un modèle cellulaire muco-sécrétant produisant une molécule similaire. Nous avons ensuite développé des modèles cellulaires eucaryotes produisant une molécule constituée de trois domaines CYS afin de déterminer leur dynamique d'association ainsi que l'effet de leur délivrance sur la viscoélasticité des gels de mucus.

La dernière partie de ce mémoire est une conclusion et une discussion des résultats

obtenus au regard de leur potentiel intérêt dans les pathologies des muqueuses sécrétoires.

1 Introduction

1.1 Mucines et mucus

1.1.1 Les mucines

Les mucines forment une famille protéique qui comporte 21 membres indexés selon l'ordre de leur découverte (<http://www.genenames.org>). Les mucines sont classées en deux catégories en fonction de leurs propriétés structurales et fonctionnelles. Il y a, d'une part, les mucines membranaires qui participent à la formation du glycocalyx, et d'autre part les mucines sécrétées qui, hormis pour MUC7, sont essentielles à la formation des gels de mucus. Un gel est défini comme un ensemble comprenant deux milieux dispersés l'un dans l'autre. Le premier est constitué de polymères interconnectés par des points de réticulation qui forment alors une structure tridimensionnelle en réseau. Le second est un solvant qui, dans le cas des gels de mucus, est majoritairement constitué d'eau. C'est donc le caractère hydrophile, couplé à leur capacité de former des polymères, qui permet aux mucines gélifiantes de former un gel au contact de l'eau.

1.1.1.1 Les mucines membranaires

Les mucines membranaires sont exprimées à la surface de tous les épithéliums non-keratinisés et forment une interface glycannique avec le milieu extracellulaire. La contri-

bution des mucines membranaires dans la formation des gels de mucus est négligeable à cause de leur incapacité à former des polymères. C'est pourquoi nous focaliserons notre propos sur les mucines sécrétées dans la suite de cette composition.

1.1.1.2 Les mucines sécrétées

Parmi les 21 mucines répertoriées, six sont sécrétées à la surface des épithéliums. Ces mucines sont produites par les cellules caliciformes, les glandes sous-muqueuses et les cellules séreuses chez l'Homme [Ma et al., 2018]. Ces mucines peuvent être subdivisées en deux sous-catégories selon leur capacité à former un gel de mucus ou non. Les mucines MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC19 sont gélifiantes, tandis que la mucine MUC7 ne l'est pas.

1.1.1.2.1 Organisation génomique

1.1.1.2.1.1 Le cluster 11p15.5

Par convention, les gènes de mucines humaines s'écrivent en lettres majuscules et italiques tandis que les protéines qu'ils codent sont notées en lettres majuscules. Seule la première lettre de leurs orthologues murins est notée en lettre majuscule. Comme chez l'Homme, le nom des gènes s'écrit en italique (ex : le gène *Muc5b* code la protéine Muc5b). Les gènes codant les mucines *MUC6*, *MUC2*, *MUC5AC* et *MUC5B* sont groupés en un cluster de 400 kilo-bases (kb) situé au locus 11p15.5 chez l'Homme (7F5 chez la souris). Les gènes *MUC2*, *MUC5AC* et *MUC5B* sont orientés du télomère vers le centromère tandis que *MUC6* est dans le sens opposé (Figure 2).

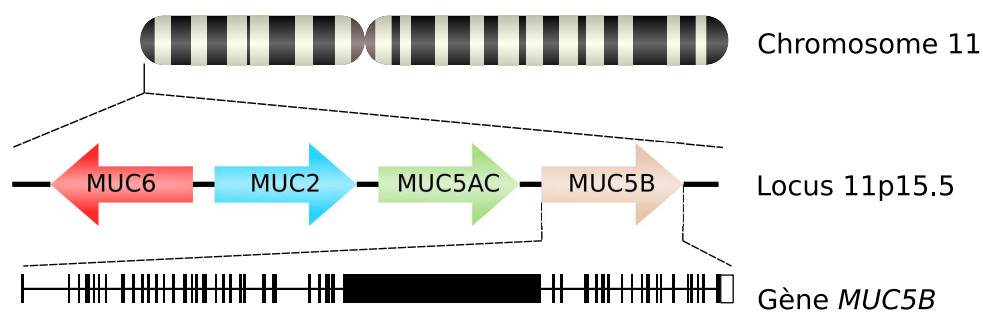


FIGURE 2 – Représentation schématique du locus chromosomique 11p15.5 et du gène *MUC5B* humain

Les gènes *MUC6*, *MUC2*, *MUC5AC* et *MUC5B* sont groupés en un cluster situé sur la bande 15 du chromosome 11.

Les principales caractéristiques structurales de ces gènes sont présentées dans le Tableau 1. Les mucines gélifiantes comportent toutes un large exon, de taille supérieure

Tableau 1 – Caractéristiques des gènes *MUC2*, *MUC5AC*, *MUC5B* et *MUC6*
 Pour chaque mucine gélifiante, la taille du gène en kb, le nombre d'exons et l'exon qui code la région centrale répétée en tandem sont indiqués. Étant donné l'existence de polymorphismes de type VNTR, la taille des gènes *MUC2*, *MUC5AC* et *MUC6* est mentionnée à titre indicatif.

Gène	Taille du gène (kb)	Nombre d'exons	Exon répété en tandem
<i>MUC2</i>	≈ 36	49	n°30
<i>MUC5AC</i>	≈ 43	49	n°31
<i>MUC5B</i>	39	49	n°31
<i>MUC6</i>	≈ 30	33	n°31

à 10 kb chez l'Homme, qui code leur région centrale. Hormis pour *MUC5B*, la région centrale des mucines présente un polymorphisme de type VNTR (*Variable number of tandem repeat*) intra- et inter-individuel, rendant le séquençage de ces gènes complexe [Vinall et al., 1998, Desseyn et al., 1997, Desseyn et al., 1998, Buisine et al., 1998a, Desseyn and Laine, 2003, Rousseau et al., 2004]. La structure des gènes *MUCs*, ainsi que leur organisation en cluster, sont très conservés entre l'Homme et la souris, soulignant l'intérêt du modèle murin pour l'étude des mucines gélifiantes [Escande et al., 2004, Desseyn and Laine, 2003]. Les promoteurs des gènes *MUCs* sont particulièrement riches en îlots CpG (55 à 80 %), ce qui suggère une régulation épigénétique de leur expression. Il a été démontré que l'expression de *MUC2* et *MUC5B*, dans des lignées cellulaires, est réprimée par la méthylation de leur promoteur par la méthyltransférase DNMT1, empêchant l'activation du facteur de transcription Sp1. La dé-acétylation des histones du promoteur de *MUC2* est également impliquée dans la répression de son expression. Ces modifications ont des effets mineurs sur l'expression de *MUC5AC* et sont complètement indépendantes de l'expression de *MUC6* [Vincent et al., 2007]. Les modifications épigénétiques pourraient être impliquées dans la formation de tumeurs en favorisant la dédifférenciation des

cellules épithéliales. Des études complémentaires sont cependant nécessaires afin d'avoir une compréhension exhaustive des régulations génétique et épigénétique de l'expression des mucines gélifiantes.

1.1.1.2.1.2 *MUC19 et Muc19*

Les gènes *MUC19/Muc19* ont été identifiés par une approche *in silico* en cherchant des séquences homologues à la région 3' des mucines gélifiantes dans les génomes humain et murin, respectivement [Chen et al., 2004]. De cette manière, les gènes *MUC19/Muc19* ont été mis en évidence aux *loci* 12q12 et 15E3, respectivement, chez l'Homme et la souris (*Mus musculus*). La séquence du gène *MUC19* couvre plus de 180 kb d'ADN génomique (80–100 kb chez la souris) et possède jusqu'à 182 exons (43 chez la souris). *MUC19* code plusieurs transcrits par épissage alternatif de la région de haute variabilité située à l'extrémité 5' du gène [Zhu et al., 2011]. Cette région a des similitudes avec la région 5' de *Muc19* qui code un transcrit alternatif, *Smgc*, dont l'expression transitoire serait impliquée dans la cytodifférenciation des cellules muco-sécrétantes chez le rongeur [Das et al., 2009, Culp et al., 2004].

1.1.1.2.1.3 *MUC7*

Le gène *MUC7* est exprimé chez les mammifères placentaires. Il est constitué d'une région 5' homologue aux gènes des histatines, d'un domaine central formé par la répétition en tandem d'une séquence de 69 paires de bases codant de nombreux résidus sérine, thréonine et proline, et d'une région 3' codant un motif en doigt de zinc. La région centrale de *MUC7* possède un nombre variable de répétitions qui est fonction de l'espèce [Xu et al., 2016]. Contrairement aux autres mucines sécrétées, la protéine codée par *MUC7* n'a pas la capacité de former un polymère, bien que des associations entre les régions amino-terminales aient été mises en évidence [Mehrotra et al., 1998]. Par conséquent, elle ne possède pas

de propriétés gélifiantes mais participe plutôt à l'immunité innée des muqueuses grâce à ses propriétés bactéricides et fongicides [Liu et al., 2000, Bobek and Situ, 2003].

1.1.1.2.2 Structure de l'apomucine

Le terme apomucine désigne la séquence peptidique des mucines gélifiantes qui comporte, hormis pour MUC6, environ 5000 acides aminés, respectivement 5130 et 5762 pour MUC2 et MUC5B. Le poids moléculaire de l'apomucine est compris entre 100 et 500 kDa. Ces protéines sont appelées protéines mosaïque du fait de leur structure composée d'une succession de domaines protéiques. La séquence peptidique des mucines gélifiantes humaines et murines est divisée en 3 régions (Figure 3). D'une part les régions amino- et carboxy-terminales, impliquées dans la polymérisation des mucines gélifiantes, et d'autre part la région centrale, riche en résidus sérine, thréonine et proline, qui porte les nombreuses chaînes glycaniques. Cette organisation explique la dénomination « *protéine en écouvillon* », parfois donnée aux mucines gélifiantes.

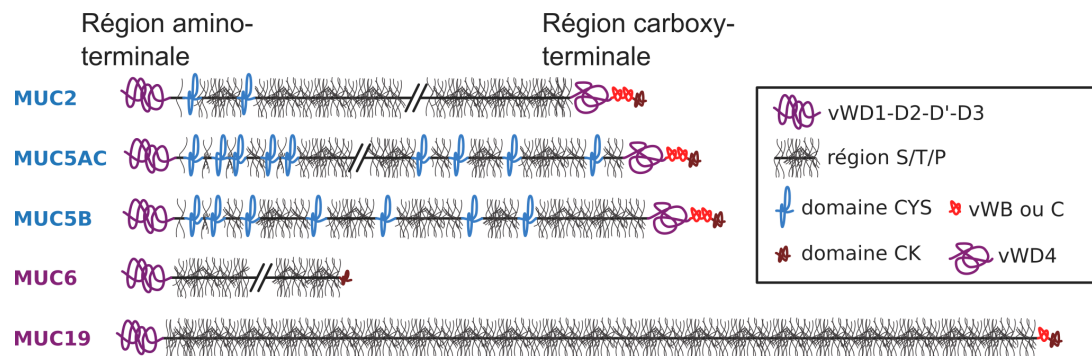


FIGURE 3 – Structure des mucines gélifiantes humaines

La région amino-terminale des mucines gélifiantes comprend les domaines vWD1–D2–D'–D3 (violet). Les domaines CYS sont représentés en bleu et les chaînes glycaniques en gris. La région carboxy-terminale comporte les domaines vWD4 (violet), vWB, vWC (rouge) et CK (bordeaux). Hormis pour MUC5B et MUC19, les mucines gélifiantes présentent des polymorphismes de type VNTR, représentés ici par une interruption dans l'axe peptidique. Adapté de Demouveau *et coll.*, 2018.

1.1.1.2.2.1 La région amino-terminale

La région amino-terminale des mucines gélifiantes comporte des domaines homologues aux domaines D1, D2 et D3 du pré-pro-facteur de von Willebrand (notés vWD1, vWD2 et vWD3). Il y a un quatrième domaine appelé D', incomplet (noté vWD') situé entre les domaines vWD2 et vWD3. La comparaison des séquences amino-terminales de MUC5B, MUC5AC et MUC2 révèle une identité supérieure à 45 %. Les résidus cystéine sont particulièrement conservés (105 des 124 résidus Cys de la région amino-terminale de MUC5B sont présents dans celles de MUC2 et MUC5AC) car ils sont impliqués dans des liaisons intra- et inter-moléculaires, nécessaires aux propriétés gélifiantes des mucines. Les liaisons intra-moléculaires rendent la région amino-terminale moins accessible aux protéases par l'acquisition d'une structure secondaire globulaire [Offner et al., 1998].

La production de différents domaines des mucines gélifiantes a permis de comprendre leur polymérisation. L'environnement physico-chimique du réseau trans-golgien, au pH acide (pH = 5–6) et riche en ions calcium, permet l'association des régions amino-terminales des mucines gélifiantes par des ponts disulfure entre les domaines vWD3. Le profil de multimérisation de la région amino-terminale semble dépendant de la mucine car MUC5B et MUC5AC forment des homodimères tandis que MUC2 forme des homotrimères [Ridley et al., 2014, Sheehan et al., 2004, Godl et al., 2002]. Plus récemment, des associations non-covalentes entre les dimères formés par les régions amino-terminales de MUC5B ont été mises en évidence. Ces tétramères se forment spontanément sous l'effet synergique du pH acide et du calcium et s'assembleraient potentiellement en structures linéaires qui optimisent la compaction des mucines dans le granule de sécrétion [Trillo-Muyo et al., 2018]. Il semble que les unités trimériques covalentes de MUC2 s'associent en hexamères pour former une structure supramoléculaire annulaire stabilisée par des

liaisons de faible énergie impliquant les domaines vWD1 et vWD2 [Ambort et al., 2012].

1.1.1.2.2.2 La région centrale

La région centrale des mucines gélifiantes, aussi appelée région S/T/P, est une région d'environ 3000 acides aminés (2929 acides aminés pour MUC2 et 3570 acides aminés pour MUC5B [Svensson et al., 2018, Desseyn et al., 1997]), particulièrement riche en résidus sérine, thréonine et proline (respectivement 15,3 et 37,2 et 14,2 % pour MUC5B) qui sont répétés en tandem ou non. À l'exception de MUC5B, le nombre de répétitions ainsi que leurs séquences diffèrent d'une espèce à l'autre et entre les deux allèles pour chaque individu [Vinall et al., 1998]. À titre d'exemple, la région centrale de MUC2 comprend entre 51 et 115 répétitions [Desseyn et al., 2008]. Il existe une variabilité inter-individuelle de séquences dans la région S/T/P. La conservation des séquences tend à diminuer chez les organismes à temps de génération court suggérant des taux de substitution élevés [Desseyn and Laine, 2003]. Les résidus sérine et thréonine de la région centrale portent les nombreuses chaînes *O*-glycanniques hydrophiles nécessaires au phénomène de gélification.

Certaines mucines ont une région centrale interrompue par d'autres domaines :

- MUC5B est interrompue à 4 reprises par un domaine de 111 acides aminés non répété en tandem, riche en résidus sérine, thréonine et proline (respectivement 18,2, 30,4 et 14,2 %) appelé domaine *R-end* [Desseyn et al., 1997]. Hormis le port de *O*-glycannes, le rôle de ce domaine est encore inconnu.
- Le domaine CYS est un domaine pas ou peu glycosylé de 110 acides aminés qui est présent en de multiples copies dans la région centrale de 3 des 5 mucines gélifiantes chez l'Homme. Ce domaine étant l'objet de ce travail de thèse il sera décrit plus loin (paragraphe 1.2.3.2.5).

1.1.1.2.2.3 La région carboxy-terminale

En comparaison avec la région amino-terminale, la région carboxy-terminale des mucines gélifiantes a une plus grande diversité structurale (Figure 3). MUC2, MUC5AC et MUC5B possèdent un quatrième domaine vWD (vWD4) suivi par les domaines vWB et vWC. MUC19 ne possède pas de domaine vWB tandis que MUC6 ne possède ni vWB ni vWC [Demouveau et al., 2018]. Toutes les mucines gélifiantes possèdent un domaine carboxy-terminal appelé *cystine knot* (CK) d'environ 80 acides aminés, dont la conformation tridimensionnelle est superposable à la super-famille des TGF- β , à la norrine et à la gonadotropine. La structure secondaire du domaine CK est maintenue par 3 ponts disulfure, ce qui permet l'alignement correct des résidus cystéine impliqués dans la dimérisation [Sadasivan et al., 2011].

1.1.1.2.3 Évolution phylogénétique

L'analyse de la séquence nucléotidique des mucines gélifiantes humaines a permis de proposer un modèle d'évolution du cluster 11p15.5 (Figure 4). Les mucines gélifiantes humaines dérivent d'un progéniteur commun, lui-même issu d'un gène ancestral partagé avec le facteur de von Willebrand. La séquence nucléotidique du progéniteur des mucines gélifiantes (Progéniteur 11p15) code les domaines vWD1, vWD2, vWD', vWD3, vWD4, vWB, vWC et CK. La duplication de ce progéniteur a entraîné la formation de deux gènes, d'une part le gène *MUC6* et d'autre part le progéniteur des mucines *MUC2*, *MUC5AC* et *MUC5B* (Progéniteur *MUC2-5AC-5B*). Le progéniteur *MUC2-5AC-5B* contient la séquence initiale codant le domaine CYS. Le gène *MUC6* possède une région 3' tronquée qui ne contient que deux exons contre 18 pour *MUC5B*, aboutissant à la perte des domaines vWD4, vWB et vWC. Ce sont deux événements de duplication génique successifs qui ont entraîné la divergence entre *MUC2* et le progéniteur de *MUC5AC* et *MUC5B*

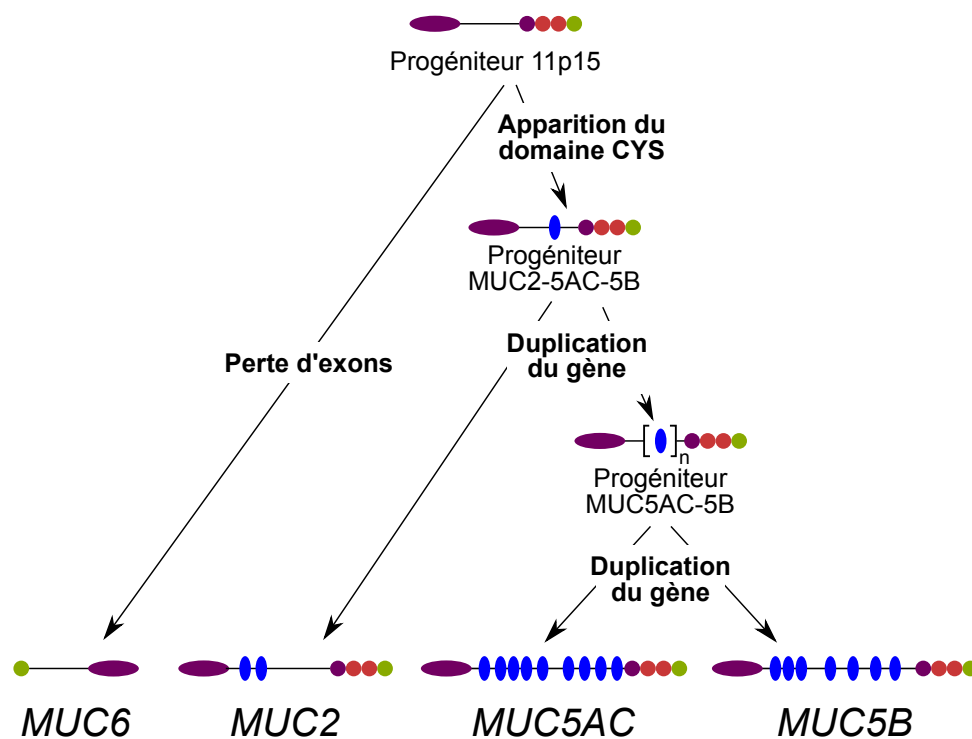


FIGURE 4 – Schéma d'évolution des mucines gélifiantes du locus 11p15

Les domaines vWD1–D2–D'–D3 et le domaine vWD4 sont schématisés, respectivement par un ovale et un cercle violet, les domaines vWB et vWC par des cercles rouges, le domaine CK par un cercle vert et les domaines CYS par des ovales bleus. Les différents événements évolutifs concourant à la formation du locus 11p15.5 sont indiqués en gras. Adapté de Desseyn et al., 2000.

(Progéniteur *MUC5AC-5B*) d'une part, puis entre *MUC5AC* et *MUC5B* d'autre part [Desseyn et al., 2000]. L'utilisation des bases de données protéiques, et notamment la recherche de séquences comportant des domaines vWD, a permis de mettre en évidence la présence d'orthologues des mucines gélifiantes humaines chez tous les organismes vertébrés [Lang et al., 2007].

Des molécules possédant des similitudes structurales avec les mucines gélifiantes humaines sont également produites par les organismes invertébrés. Le nombre de ces molécules tend à décroître quand la distance phylogénétique avec les mammifères augmente. Les premiers organismes qui produisent des molécules comportant des domaines similaires à ceux des mucines gélifiantes humaines appartiennent à la famille des Cténophores, ce qui permet d'estimer l'apparition des molécules apparentées aux mucines gélifiantes à plus de 600 millions d'années [Lang et al., 2016].

1.1.1.2.4 Profil d'expression des mucines gélifiantes

1.1.1.2.4.1 Au cours du développement

La rareté des échantillons biologiques humains explique la parcimonie des données en ce qui concerne l'expression des mucines au cours du développement. Dans chaque tissu étudié on constate que certaines mucines gélifiantes sont exprimées de manière stable jusqu'à l'âge adulte, tandis que d'autres ont une expression transitoire dont le rôle exact reste à déterminer. Les mucines gélifiantes sont exprimées très précocement durant l'ontogénèse, dès la 8^{ème} semaine de gestation, ou avant, dans l'estomac, et la 9^{ème} semaine de gestation dans le poumon et l'intestin [Buisine et al., 1998b, Buisine et al., 2000, Buisine et al., 1999]. L'expression de *MUC2* dans l'intestin, de *MUC5AC* et *MUC5B* dans les voies aériennes, et de *MUC6* dans l'estomac, coïncide avec le début de la cytodifférenciation de l'épithé-

lium sécrétoire. Ces éléments suggèrent que les mucines gélifiantes pourraient participer activement à l'ontogenèse et à la différenciation des tissus muco-sécrétants.

1.1.1.2.4.2 Chez l'adulte sain

Le profil d'expression des mucines gélifiantes chez l'adulte sain est résumé dans la Figure 5 [Demouveau et al., 2018]. À l'exception du côlon, tous les tissus muco-sécrétants produisent au moins deux mucines gélifiantes dont une comporte des domaines CYS. L'ubiquité du domaine CYS dans les muqueuses sécrétoires humaines corrobore un rôle important dans les propriétés biologiques du mucus. Dans certaines situations pathologiques, des changements quantitatifs et qualitatifs du profil d'expression des mucines gélifiantes sont observés. À titre d'exemple, on peut citer les voies aériennes mucoviscidiques qui présentent une hyperplasie et une métaplasie des cellules caliciformes et une hypertrophie et/ou hyperplasie des glandes sous-muqueuses. Cela entraîne une hypersécrétion de mucines gélifiantes qui forment alors un mucus anormalement viscoélastique [Rose, 2006].

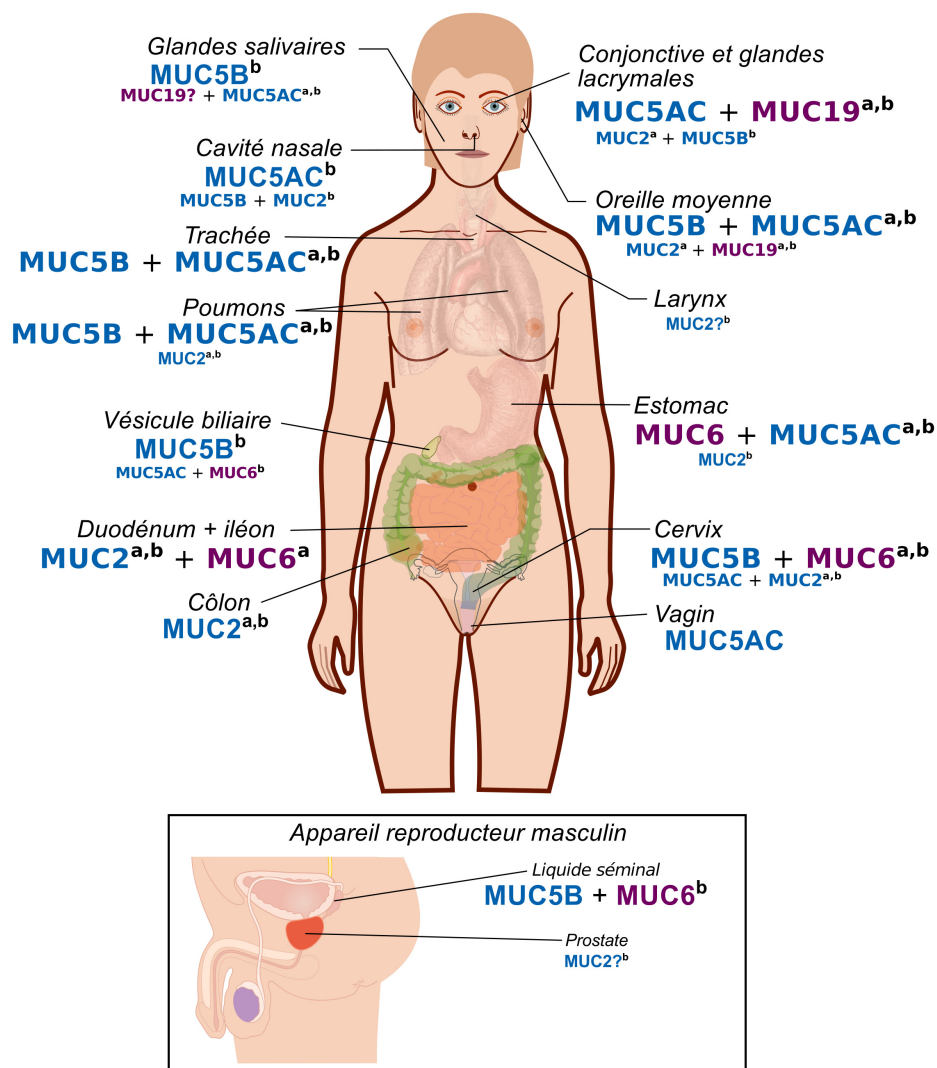


FIGURE 5 – Profil d’expression des mucines gélifiantes chez l’Homme sain

Pour chaque tissu muco-sécrétant, les mucines gélifiantes exprimées sont indiquées en différenciant celles qui possèdent des domaines CYS (bleu) ou non (violet). La taille de la police reflète l’expression relative des mucines gélifiantes au sein du tissu. **a** : Exprimé au niveau ARNm, **b** : Exprimé au niveau protéique, **?** : Expression à confirmer. Adapté de Demouveau *et coll.*, 2018.

1.1.1.2.5 Modifications co- et post-traductionnelles

Au cours de leur biosynthèse, les mucines gélifiantes subissent de nombreuses modifications co- et post-traductionnelles qui leurs confèrent leurs propriétés fonctionnelles. Ces modifications sont principalement des glycosylations. Les nombreuses chaînes glycaniques représentent environ 80 % de la masse moléculaire d'un monomère de mucine gélifiante.

1.1.1.2.5.1 *N*-glycosylation

La *N*-glycosylation est une modification co-traductionnelle qui implique la liaison covalente de glycanes sur des résidus asparagine de la séquence consensus N-X-S/T (où N représente un résidu asparagine, X un acide aminé quelconque sauf un résidu proline et S/T un résidu sérine ou thréonine, voir Figure 6). L'axe peptidique des mucines gélifiantes possède de nombreux sites potentiels de *N*-glycosylation (31 sites au total pour MUC5B d'après la base de données Ensembl), notamment dans les régions amino- et carboxy-terminales. La *N*-glycosylation a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE) granuleux et permet un adressage efficace des mucines gélifiantes vers l'appareil de Golgi [Asker et al., 1998a, Asker et al., 1998b]. Elle facilite également l'oligomérisation des mucines gélifiantes, mais n'est toutefois pas indispensable à celle-ci [Dekker and Strous, 1990]. La présence de *N*-glycanes pourrait permettre aux mucines gélifiantes d'adopter la conformation requise pour la formation et l'adressage de dimères [Van Klinken et al., 1998]. Les séquences du domaine CYS #2 de MUC2 et du domaine CYS #2 de MUC5B possèdent des sites de *N*-glycosylation potentielle. Ces domaines ont été étudiés avec des molécules recombinantes produites mais non sécrétées par la lignée CHO (MUC2) et sécrétées par la lignée COS-7 (MUC5B). Le domaine CYS, produit par les cellules CHO, semble être *N*-glycosylé alors qu'aucune glycosylation n'a été rapportée

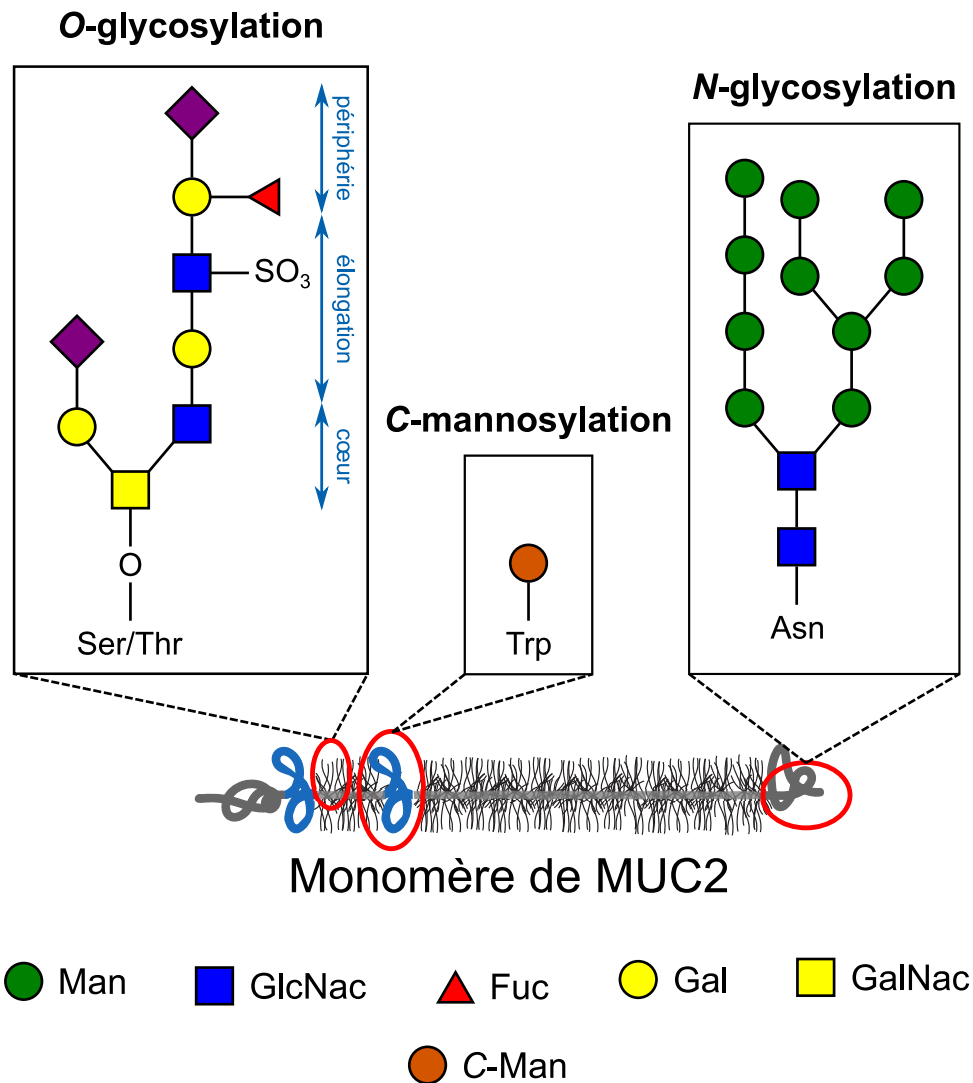


FIGURE 6 – Représentation schématique des types de chaînes glycaniques portées par les mucines gélifiantes

Les monosaccharides sont représentés selon le consortium de la glycomique fonctionnelle (*Consortium for Functional Glycomics*). Man : D-mannose, GlcNac : N-acétyl-D-glucosamine, NeuAc : acide sialique ou acide N-acétyl-D-neuraminique, GalNac : N-acétyl-D-galactosamine, Fuc : L-fucose, Gal : D-galactose, SO₃ : sulfate. Les étapes de la biosynthèse des O-glycannes sont représentées en bleu. D'après Corfield, 2015, Corfield, 2017. Le C-mannose est représenté d'une couleur différente pour distinguer la liaison carbone-carbone des liaisons osidiques conventionnelles.

pour ceux produits par la lignée COS-7 [Ambort et al., 2011, Perez-Vilar et al., 2004].

1.1.1.2.5.2 *C*-mannosylation

La *C*-mannosylation est une réaction enzymatique identifiée en 1996 sur la RNaseII. Elle est catalysée par la *C*-mannosyltransférase dans le RE granuleux [Niwa et al., 2016, Shcherbakova et al., 2017]. Elle consiste en la formation d'une liaison covalente entre le carbone anomérique d'un α -D-mannose et le carbone C2 du groupement indole du premier tryptophane de la séquence consensus W-X-X-W (où W représente un résidu tryptophane et X un acide aminé quelconque, voir Figure 6) [Vliegthart and Casset, 1998, Krieg et al., 1998a]. De nombreuses protéines, incluant la RNaseII, la lipoprotéine lipase C ou l'interleukine 12, sont *C*-mannosylées. Cette modification co-translationnelle est impliquée dans l'adressage des protéines, l'acquisition d'une structure tertiaire fonctionnelle, l'activité enzymatique ou certaines voies de signalisation.

La *C*-mannosylation des mucines gélifiantes est controversée. Les domaines CYS possèdent tous la séquence consensus W-O-X-W (où O représente un résidu sérine ou thréonine) dans leur partie amino-terminale. Cette caractéristique est spécifique des mucines gélifiantes. Perez-Vilar *et coll.* ont montré que les domaines CYS de MUC5AC et MUC5B sont *C*-mannosylés en utilisant des lectines [Perez-Vilar et al., 2004]. L'étude du profil de glycosylation de MUC2 purifiée conclut également que la protéine, et donc les domaines CYS, sont *C*-mannosylés [Zanetta et al., 2004]. A l'inverse, le domaine CYS produit par génie génétique ou étudié dans la protéine MUC5AC grâce aux lignées cellulaires CHO et Calu-3 respectivement ne semble pas être *C*-mannosylé [Ambort et al., 2011, Cao et al., 2012]. Des données acquises au laboratoire montrent que le domaine CYS produit par la lignée COS-7 est effectivement *C*-mannosylé et que cette glycosylation est indispensable pour le trafic intracellulaire des mucines gélifiantes. Cela

a pu être mis en évidence en modifiant la séquence W-X-X-W en A-X-X-W (où A est un résidu alanine) par mutagenèse dirigée, ce qui abolit la sécrétion du domaine CYS et entraîne sa rétention dans le RE [Gouyer et al., 2018].

1.1.1.2.5.3 O-glycosylation

La O-glycosylation est une liaison covalente entre une chaîne glycanique et le groupement hydroxyle de la chaîne latérale des résidus sérine et thréonine (Figure 6). Les domaines S/T/P de la région centrale des mucines gélifiantes sont le support majeur des O-glycannes. La O-glycosylation est initiée, dans le réseau *cis*-Golgien, par la liaison d'un N-acétylgalactosamine (GalNac) sur les sérines et thréonines, ce qui forme l'antigène Tn. Chez l'Homme, cette réaction est catalysée par une famille de 20 enzymes appelées polypeptide N-acétylgalactosaminyltransférases (ppGalNac). Ces enzymes possèdent un domaine catalytique et un domaine lectine qui conditionnent leur tropisme pour des régions glycosylées ou non glycosylées de l'apomucine [Revoredo et al., 2016]. Les isoformes 1 à 3 sont impliquées dans la biosynthèse de la majeure partie des O-glycannes des mucines gélifiantes, tandis que les autres isoformes confèrent sa spécificité tissulaire au O-glycome [Kong et al., 2015]. Des galactoses et N-acétylglucosamines sont ensuite greffés sur l'antigène Tn, via des liaisons $\beta(1-3)$ et parfois $\beta(1-6)$, pour former la glycosylation de cœur, principalement de type 1 à 4 dans le cas des mucines gélifiantes. Ces structures peuvent ensuite être élongées par des lactosamines de type 1 et 2 et sont terminées par des déterminants variés incluant l'acide sialique, le fucose, le sulfate, l'acétyle et le méthyle qui sont responsables de la grande diversité des structures glycaniques des mucines gélifiantes [Corfield, 2015, Corfield, 2017]. Les nombreux acides sialiques et sulfates portés par les mucines gélifiantes sont responsables de la nature poly-anionique de ces molécules. Des modifications du profil de O-glycosylation des mucines gélifiantes sont observées dans différents contextes pathologiques. Les patients atteints de sèche-

resses buccales ou du syndrome de l'œil sec ont un déficit de sialylation des mucines gélifiantes qui est associé à une diminution des propriétés lubrifiantes et hydratantes du mucus [Chaudhury et al., 2015, Nakamura et al., 2004]. Des tumeurs coliques spontanées se forment dans un modèle murin déficient pour les galactosyltransférases impliquées dans la glycosylation de cœur de type 1 et 3. Le mécanisme sous-jacent implique une activation de l'inflammasome par le microbiote dû à un mucus moins protecteur, ce qui souligne le rôle primordial des *O*-glycannes dans les propriétés de barrière du mucus [Bergstrom et al., 2016]. Il y a une augmentation de la fraction glycanique totale des mucines gélifiantes chez les individus atteints de mucoviscidose. Les *O*-glycannes sont également plus sulfatés et sialylés [Xia et al., 2005]. Bien que cela pourrait être une réponse de l'hôte à l'état inflammatoire chronique [Delmotte et al., 2002], certains microorganismes, comme *Pseudomonas aeruginosa*, possèdent une très grande affinité pour les antigènes sialyl-Lewis^x, ce qui démontre un rôle clé du profil *O*-glycanique dans l'étiologie de la mucoviscidose [Jeffries et al., 2016]. Tous ces éléments indiquent que les *O*-glycannes jouent un rôle primordial dans la physiologie des muqueuses sécrétoires. Cependant, leur diversité intra- et inter-individuelle et leur dynamique rendent leur étude complexe.

1.1.1.2.5.4 *S*-palmitoylation

La *S*-palmitoylation est une modification enzymatique covalente et réversible qui consiste en la liaison d'acide palmitique sur les résidus cystéine internes d'une protéine. La *S*-palmitoylation est catalysée par la palmitoyl *S*-acyltransférase tandis que la dépalmitoylation implique des protéases de la famille des hydrolases à sérine [Ko and Dixon, 2018]. Une seule étude a décrit la *S*-palmitoylation de la mucine Muc2. L'inhibition de la *S*-palmitoylation, par délétion de l'enzyme FAS (*Fatty acid synthase*), est alors associée à un défaut de sécrétion et de protection du mucus colique [Wei et al., 2012]. Ces anomalies du mucus ont également été observées dans un modèle murin de diabète où les

niveaux de production de la FAS sont anormalement bas. Cela suggère que des anomalies du mucus pourraient être observées chez le sujet diabétique humain.

1.1.1.2.6 Biosynthèse et exocytose

La biosynthèse des mucines gélifiantes se déroule en 5 étapes (Figure 7) [Bansil and Turner, 2018].

1. La synthèse de l'apomucine est initiée par la liaison de l'ARNm sur les ribosomes membranaires du RE granuleux. Le peptide néosynthétisé est alors transloqué dans la lumière du RE via le complexe de translocation ou translocon. C'est au cours de la synthèse de l'apomucine que les régions amino- et carboxy-terminales acquièrent leur structure secondaire et que les premières modifications co-traductionnelles, incluant la *N*-glycosylation et la *C*-mannosylation, ont lieu.
2. Les apomucines synthétisées forment ensuite des dimères maintenus par un pont disulfure entre leur parties carboxy-terminales, puis sont adressées à l'appareil de Golgi [Asker et al., 1998b, Asker et al., 1998a, Ridley et al., 2016].
3. La *O*-glycosylation a lieu de manière séquentielle au cours du transit des dimères de mucines gélifiantes dans l'appareil de Golgi. Elle est initiée par la formation de l'antigène Tn dans le réseau *cis*-golgien.
4. Les *O*-glycannes sont ensuite élongés dans l'appareil de Golgi médian.
5. Les multimères, maintenus par des ponts disulfure entre les régions amino-terminales, sont formés dans le réseau *trans*-Golgien. Les polymères de mucines sont alors stockés sous forme compactée dans des granules de sécrétion, localisés en région sous-apicale des cellules muco-sécrétantes.

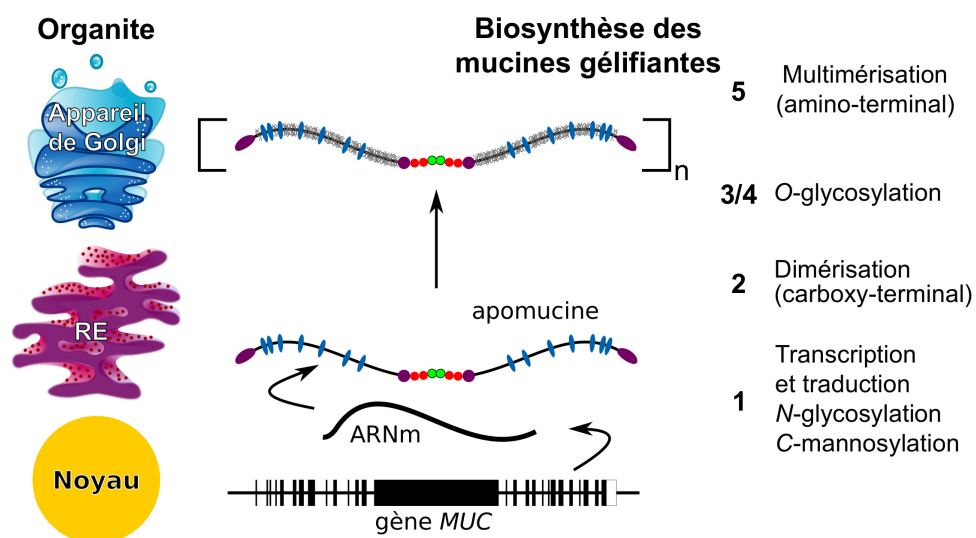


FIGURE 7 – Schéma de la biosynthèse des mucines gélifiantes

Pour chaque compartiment intracellulaire, l'assemblage et les modifications co- et post-traductionnelles des mucines gélifiantes sont représentés. Les domaines vWD, vWB ou vWC, CYS et CK sont respectivement illustrés en violet, rouge, bleu et vert. RE : réticulum endoplasmique. D'après Demouveau et al., 2018.

1.1.2 Le mucus

Le mucus est un gel dont la fraction organique est principalement représentée par les mucines gélifiantes. Néanmoins, la composition du mucus ne peut se résumer aux mucines gélifiantes, car d'autres composés sont également impliqués dans l'ultrastructure et les propriétés fonctionnelles de ces gels. Ces composés seront revus dans une première partie, avant de développer les propriétés du mucus chez les mammifères. Enfin, nous aborderons la motilité cellulaire dans le mucus dans une troisième et dernière partie.

1.1.2.1 Composition

Le mucus est composé par 90–98 % d'eau, ce qui le classe parmi les hydrogels. La fraction organique du mucus est très hétérogène et dépend du tissu étudié, mais aussi de l'état physiologique de l'individu. Les composés majeurs de cette fraction organique sont les mucines gélifiantes (2–5 %), les lipides (1–2 %) et l'ADN (0,02 % chez un individu sain). De nombreuses protéines entrent dans la composition du mucus. À titre d'exemple, 43 à 81 protéines ont pu être identifiées dans le mucus cervical au cours du cycle ovarien, dont certaines sont spécifiques d'une phase du cycle [Grande et al., 2015]. Dans le mucus colique, ce sont 44 protéines qui ont pu être identifiées comme constituants du mucus [Johansson et al., 2009]. Enfin, le mucus est composé d'environ 1 % d'ions, principalement les ions Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- et Ca^{2+} [Leal et al., 2017, Lai et al., 2009b]. Certains composés du mucus ont un intérêt particulier car ils sont capables de s'associer aux mucines gélifiantes. De cette manière, ils exercent une fonction importante dans la physiologie des muqueuses sécrétoires. En voici quelques exemples :

1.1.2.1.1 Peptides en trèfle

Il existe trois peptides en trèfle chez l'Homme (notés TFF1, TFF2 et TFF3). Leur nom vient de leur structure secondaire, aussi appelée domaine en trèfle qui, avec six résidus cystéine, contient trois boucles maintenues par trois ponts disulfure. TFF1 et TFF3 possèdent un domaine en trèfle tandis que TFF2 en possède deux. Il y a un 7^{ème} résidu cystéine libre dans la région carboxy-terminale de TFF1 et TFF3 qui leur permet de former des dimères ou de s'associer avec d'autres protéines [Aihara et al., 2017]. Les peptides en trèfle sont co-sécrétés avec les mucines gélifiantes par les cellules épithéliales du tractus digestif et, dans une moindre mesure, par celles des voies aériennes et de l'appareil reproducteur [Thim et al., 2002, Madsen et al., 2007]. Les peptides en trèfle s'associent avec les mucines gélifiantes par des interactions ioniques, hydrophobes, ou encore par un type d'interaction qui n'a pas encore pu être identifié [Hanisch et al., 2014, Muskett et al., 2003, Ruchaud-Sparagano et al., 2004, Tomasetto et al., 2000]. Cela permet de stabiliser les interactions entre les mucines gélifiantes, et donc de moduler les propriétés viscoélastiques des gels de mucus [Thim et al., 2002, Bastholm et al., 2017]. La fonction biologique des peptides en trèfle n'est pas totalement déterminée, mais certaines études montrent leur implication dans la protection et la réparation de la barrière muqueuse [Lüdeking et al., 1998, Xian et al., 1999, McKenzie et al., 2000, Shi et al., 2014].

1.1.2.1.2 Lipides

Les études qui ont déterminé la composition lipidique du mucus sont discordantes. Les mucus cervical et gastrique, provenant respectivement de femmes et de porcs, analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, semblent être dépourvus de lipides. Seuls des acides gras, associés aux mucines par des interactions faibles, ont pu être détectés [Hansson et al., 1988]. D'autres études menées par le groupe

de Slomiany *et coll.* sur du mucus de rat provenant de différents tissus ont mis en évidence la présence de lipides neutres (50 % de la fraction lipidique) ainsi que de glycolipides et phospholipides associés de manière covalente et non-covalente sur les régions nues des mucines gélifiantes [Slomiany et al., 1978, Slomiany et al., 1988, Witas et al., 1983]. Cette fraction lipidique contribue à l'existence de patchs hydrophobes au sein de la matrice de mucines gélifiantes et participe donc à la structure du mucus [Carlson et al., 2018]. La délipidation des mucines gélifiantes réduit grandement la viscosité des gels de mucus et élimine même leur caractère non-Newtonien (ou viscoélastique) [Gouveia and Tiffany, 2005]. Ce phénomène est amplifié par l'élimination des acides gras suggérant un rôle important des lipides dans la gélification [Murty et al., 1984]. Cependant, la présence de lipides tensioactifs, comme la phosphatidylcholine ou le phosphatidylglycérol, est associée à une augmentation des capacités de mouillage et de clairance du mucus pulmonaire [Girod et al., 1992a, Zahm et al., 1998]. Dans l'intestin, les lipides forment une barrière hydrophobe protectrice entre le mucus aqueux et la lumière intestinale [Lugea et al., 2000, Lichtenberger, 1995]. Une diminution des concentrations de phosphatidylcholine et de lysophosphatidylcholine a été rapportée dans le mucus colique, anormalement perméable, de patients atteints de rectocolite hémorragique [Ehehalt et al., 2004]. À la surface de l'œil, les lipides forment une barrière qui limite l'évaporation du film lacrymal sous-jacent, ce qui justifie leur emploi dans le contexte du syndrome de l'œil sec [Rantamäki et al., 2012, Johnson and Murphy, 2004].

1.1.2.1.3 Immunoglobulines

La fonction des immunoglobulines (Ig) dans le mucus a principalement été étudiée dans la sphère cervico-vaginale. Les IgG et les IgA, principales Ig produites dans le tractus génital femelle, forment des interactions faibles et transitoires avec les mucines gélifiantes, ce qui leur permet de diffuser aisément dans le gel [Fahrbach et al., 2013, Wang et al., 2016].

Contrairement aux bactéries, les virus ont généralement une taille inférieure aux mailles formées par les mucines gélifiantes du mucus. Ainsi, certains d'entre eux, comme le papillomavirus ou le virus de Norwalk, diffusent dans le mucus aussi facilement que dans une solution saline [Olmsted et al., 2001, Saltzman et al., 1994]. La multiplication des interactions entre les immunoglobulines complexées aux virus et les mucines gélifiantes réduit drastiquement la diffusivité des virions dans le gel et fournit donc une protection antivirale efficace [Chen et al., 2014, Schroeder et al., 2018].

Les Ig contribuent aussi à la viscoélasticité du mucus comme démontré par l'addition d'IgA ou d'IgM exogènes dans le mucus respiratoire. De ce fait, la concentration importante d'IgM ($> 1,5$ g/L) dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose pourrait être un facteur aggravant de viscoélasticité élevée du mucus [Girod et al., 1992b].

1.1.2.1.4 Protéine liant le fragment Fc des IgG

La protéine liant le fragment Fc des IgG (FcGBP) est produite dans le tube digestif des mammifères, le placenta et le tractus génital femelle. La séquence peptidique de la FcGBP est constituée d'une répétition en tandem de 13 domaines, riches en résidus cystéine (8,1 %) et sérine/thréonine (12,3 %), homologues aux domaines D du pré-pro-facteur de von Willebrand et des mucines gélifiantes [Harada et al., 1997]. Onze des 13 domaines vWD de la FcGBP humaine comportent une séquence GDPH dont le clivage autocatalytique génère une extrémité aspartate réactive avec les groupements hydroxyles ou les amines primaires. C'est ce mécanisme qui expliquerait les associations covalentes trouvées entre la mucine gélifiante MUC2 et la FcGBP [Johansson et al., 2009]. La FcGBP peut donc avoir un rôle d'agent de couplage entre les mucines gélifiantes, notamment dans le granule de sécrétion qui impose une proximité entre les groupements réactifs. D'autres types d'associations covalentes ont été rapportés comme des liaisons disulfure avec le TFF3 [Albert et al., 2010].

La proportion importante d'acides aminés hydrophobes ou neutres (78,6 %) de la FcGBP est compatible avec la formation de liaisons hydrophobes spontanées avec segments hydrophobes des mucines gélifiantes tels que les régions amino- et carboxy-terminales et les domaines CYS [Brunelli et al., 2007]. La fonction précise de la FcGBP n'est pas totalement élucidée mais des études lui prêtent un rôle dans la réparation intestinale post-résection ou dans le piégeage des virions du VIH [Rubin et al., 2000, Schwartz, 2014]. La FcGBP exerce donc à la fois une fonction structurale, en modifiant la structure du réseau de mucines gélifiantes, et immune en fournissant un point d'ancrage pour les immunoglobulines.

1.1.2.1.5 Transglutaminases

Les transglutaminases sont une famille de 9 enzymes ubiquitaires (www.genenames.org) qui catalysent plusieurs types de réactions post-traductionnelles [Lorand and Graham, 2003]. Parmi elles, le couplage protéique pourrait former des liaisons supplémentaires entre les parties accessibles des mucines. Cette réaction implique la formation de liaisons $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{-lysines}$ entre un résidu lysine donneur et un résidu glutamine accepteur. La transglutaminase 2 (TG2) est une enzyme ubiquitaire exprimée dans le cytoplasme et à la surface des cellules [Thomázy and Fésüs, 1989]. Les transglutaminases pourraient être impliquées dans le remodelage post-sécrétion du réseau de mucines gélifiantes, comme montré récemment *in vitro* avec la TG2 qui catalyse des liaisons isopeptidiques entre les domaines CYS de MUC2 [Recktenwald and Hansson, 2016].

1.1.2.1.6 Protéases endogènes

La co-expression des protéases et des mucines gélifiantes favorise le renouvellement de la couche de mucus. Le profil d'expression des protéases semble être tissu-spécifique. La

pro-méprine β est une métalloprotéase exprimée à la surface de l'épithélium intestinal. Le clivage de la pro-méprine β par la métalloprotéase ADAM10 libère la protéase dans le gel. Ce clivage est dépendant du microbiote, car la protéine ADAM10 est activée par l'acide lipotéichoïque, une endotoxine produite par les bactéries Gram positif. Une fois soluble, la pro-méprine β est convertie en méprine β par un clivage catalysé par les enzymes tryptiques. La méprine β clive alors MUC2 entre les domaines vWD2 et vWD3 pour permettre le détachement du mucus de l'épithélium. Chez les patients mucoviscidosiques, le masquage du site de clivage de la méprine β , causé par le défaut de sécrétion des ions bicarbonate par le canal CFTR, pourrait contribuer à la stase du mucus intestinal [Schütte et al., 2014, Wichert et al., 2017].

Comme chez les souris colonisées, le mucus colique des souris axéniques forme deux couches pluristratifiées, l'une adhérente à l'épithélium, et l'autre, non-adhérente, au contact de la lumière colique. Cela confirme l'implication d'un facteur endogène dans la formation de cette double couche de mucus [Gouyer et al., 2011]. CLCA1 est une protéine abondante dans le mucus colique [Johansson et al., 2009]. Le clivage autocatalytique de CLCA1 libère un domaine métalloprotéase impliqué dans la transformation de la couche interne du mucus colique, dense et imperméable aux bactéries, en une couche externe plus lâche qui constitue le substrat énergétique du microbiote commensal [Johansson et al., 2011, Nyström et al., 2018]. Cette dégradation contrôlée du mucus, qui permet l'expansion des mucines gélifiantes et le maintien d'une flore bénéfique, est finement régulée par des mécanismes de compensation *via* des protéases à sérine. Cela suggère que la dégradation endogène du mucus est nécessaire à la physiologie des muqueuses sécrétoires. La muco-obstruction générée par instillation d'élastase dans un modèle murin de broncho-pneumopathie chronique obstructive régule positivement la sécrétion de CLCA1 dans les voies aériennes confirmant sa fonction de mucolytique endogène

[Fernández-Blanco et al., 2018].

1.1.2.1.7 ADN

Le renouvellement permanent des épithéliums sécrétoires libère de l'ADN dans le mucus. L'ADN s'associe alors avec les mucines gélifiantes et contribue aux propriétés viscoélastiques du mucus [Macierzanka et al., 2014]. La concentration d'ADN dans le mucus humain sain est relativement basse (0,02 %) [Lai et al., 2009b]. Cependant, un état pro-inflammatoire chronique, comme observé dans la mucoviscidose, entraîne une libération substantielle d'ADN provenant des tissus inflammatoires, du recrutement de lymphocytes polynucléaires neutrophiles et, dans une moindre mesure, de l'élimination de bactéries [Lethem et al., 1990]. Afin de palier ce problème, l'aérosolthérapie avec de la DNase I est fréquemment employée. En plus de diminuer la viscoélasticité du mucus, la DNase I diminue la taille des fragments d'ADN, ce qui leur confère des propriétés bactéricides [Shak et al., 1990, Bhongir et al., 2017].

1.1.2.2 Propriétés

Le mucus est un gel ubiquitaire dont les fonctions dépendent largement du mode de vie de l'espèce animale qui le produit. Dans le paragraphe qui suit, nous nous focaliserons sur les propriétés du mucus chez les mammifères. La compréhension de ces propriétés permettra, à terme, d'optimiser la délivrance de molécules thérapeutiques ou de modifier à façon les gels de mucus dans un contexte pathologique. Ainsi, les mucines gélifiantes sont un sujet d'étude en recherche appliquée et permettent de concevoir des biomatériaux novateurs qui exploitent leurs caractéristiques [Petrou and Crouzier, 2018].

1.1.2.2.1 Hydratation et lubrification

Les mucines gélifiantes s'associent avec les molécules d'eau par des liaisons hydrogènes. Ce phénomène, combiné avec leur conformation en réseau enchevêtré, optimise la rétention d'eau dans le gel et garantit l'hydratation de l'épithélium sous-jacent [Lousinian et al., 2018]. L'alternance de régions hydrophiles glycosylées et de régions hydrophobes nues permet aux mucines gélifiantes de s'adsorber sur de nombreuses surfaces indépendamment de leur nature chimique. Cela réduit les frictions à la surface de la muqueuse [Cone, 2009]. Ce pouvoir lubrifiant est positivement corrélé à la concentration des mucines selon l'équation suivante [Wang et al., 2015a, Coles et al., 2010] :

$$\mu \simeq c^{-0,7} \quad (1.1)$$

où μ représente le coefficient de friction et c la concentration de mucines gélifiantes. L'épaisseur du mucus est également un facteur positivement corrélé à la lubrification de l'épithélium. À l'échelle d'un organisme, les mucines gélifiantes maintiennent l'intégrité des tissus muco-sécrétants dans de nombreux contextes incluant la toux, le transit intestinal, la copulation ou encore le battement des paupières.

1.1.2.2.2 Barrière

Le mucus est une barrière semi-perméable sélective. Cette sélectivité est basée sur quatre propriétés fondamentales communes à tous les gels de mucus [Petrou and Crouzier, 2018] :

1. **Filtre moléculaire** : Le mucus est qualifié de filtre moléculaire, car il est en premier lieu une barrière physique. Les mucines gélifiantes forment des mailles dont la taille varie de 100 à 2000 nm en fonction du tissu. Le passage d'éléments

de taille micrométrique au travers du mucus est donc fortement entravé du fait de leur encombrement stérique [Witten and Ribbeck, 2017]. De cette manière, il a été proposé dans une étude récente que le mucus colique permettait de confiner les bactéries au contact des fèces afin de limiter leur contact avec l'épithélium [Kamphuis et al., 2017].

2. **Filtre chimique** : Les propriétés intrinsèques des mucines gélifiantes telles que la coexistence de régions anioniques et cationiques, mais aussi de régions hydrophiles et hydrophobes, permettent le filtrage des molécules en fonction de leurs propriétés physico-chimiques [Witten et al., 2019]. Par exemple, les peptides anti-microbiens, principalement cationiques, ont une forte affinité pour les mucines gélifiantes électronégatives, ce qui permet leur rétention dans le mucus [Fukui et al., 2018]. Ce filtrage semble s'exercer sur l'agencement des charges à la surface des molécules plutôt que sur leur charge globale [Li et al., 2013].
3. **Filtre biologique** : Les mucines gélifiantes ont une activité immuno-modulatrice intrinsèque mais constituent également un réservoir pour d'autres molécules ayant une activité biologique. Les déterminants glycaniques terminaux, comme l'acide sialique, peuvent induire un signal tolérogène lors de leur liaison avec les récepteurs siglec portés par les cellules immunitaires innées [Crocker and Varki, 2001]. Les nombreux acides sialiques et sulfates portés par les glycanes des mucines gélifiantes retiennent les peptides antimicrobiens, majoritairement cationiques, par des interactions électrostatiques, et confèrent donc des propriétés bactéricides au mucus. Les mucines gélifiantes constituent également une matrice d'ancrage pour les immunoglobulines sécrétées [Chen et al., 2014, Wang et al., 2016] et les molécules anti-inflammatoires comme la phosphatase alcaline ou le peptide liant le polysaccharide [Dupont et al., 2014].

4. **Dynamacité** : Les éléments indésirables piégés dans le mucus sont éliminés lors de son renouvellement continu. Celui-ci est estimé à environ 24 h d'après des modèles cellulaires et murins [Schneider et al., 2018, Zhu et al., 2015]. Certains tissus possèdent des mécanismes d'épuration actifs tels que la clairance mucociliaire ou le péristaltisme qui adaptent la vitesse de renouvellement du gel en fonction du contexte physiologique. Afin de maintenir l'intégrité de la barrière muqueuse, la sécrétion du mucus est donc modulée par des signaux endogènes et exogènes. Parmi eux, la déformation physique de la muqueuse [Zhu et al., 2015] et la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes par les *Toll-like receptor* et les *NOD-like receptor* régulent positivement la sécrétion des mucines gélifiantes [McGuckin et al., 2011]. La coévolution entre les mucines gélifiantes et certaines bactéries pathogènes est à l'origine de stratégies d'échappement efficaces. C'est le cas d'*Helicobacter pylori* qui modifie localement le pH et la viscoélasticité du mucus en métabolisant l'urée en ammonium, et dont le lipopolysaccharide (LPS) régule négativement la sécrétion des mucines gélifiantes [Celli et al., 2009, Slomiany and Slomiany, 2006].

Il existe des spécificités tissulaires dans les fonctions protectrices du mucus. À la surface des épithéliums colique et gastrique, le mucus a une apparence pluristratifiée causée par une alternance entre type de mucine et/ou profil de glycosylation dont la signification physiologique reste à déterminer [Gouyer et al., 2011, Ho et al., 2004]. Cette apparence a également été observée à la surface du tissu pulmonaire d'un modèle murin de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) suggérant que ces structures se forment par accumulation des mucines gélifiantes [Fernández-Blanco et al., 2018]. Dans l'estomac, le mucus remplit la fonction de tampon en maintenant un gradient croissant de pH de la lumière vers le tissu prévenant ainsi l'auto-digestion acide du tissu [Bahari et al., 1982].

Durant la gestation, un bouchon de mucus est sécrété par les pseudo-glandes du canal endocervical chez les mammifères. La fonction de ce gel particulier est de séparer physiquement les compartiments vaginal et utérin pour protéger le fœtus des infections intra-utérines qui constituent un facteur de risque de naissance prématurée. Il existe un gradient décroissant de bactéries de la partie vaginale vers la partie utérine du bouchon de mucus. Celui-ci est principalement dû aux concentrations très élevées de peptides antimicrobiens (lactoferrine, lysozyme, inhibiteur de la leucoprotéase, défensines) et d'immunoglobulines (principalement IgA et IgM) [Hansen et al., 2014, Hein et al., 2002]. Dans ce contexte, la présence d'une flore lactobacillaire pourrait participer à la formation d'un mucus protecteur en créant un micro-environnement acide nécessaire à la formation d'un gel viscoélastique (voir 1.2.3.1.1).

1.1.2.2.3 Adaptabilité

1.1.2.2.3.1 Modulation du *O*-glycome

L'implantation durable des bactéries dans la sphère muqueuse dépend de leur capacité à reconnaître et à métaboliser les *O*-glycannes des mucines gélifiantes [Corfield, 2018]. Pour cela, les bactéries expriment un large répertoire enzymatique incluant les sialidases, fucosidases, α - et β -*N*-acétylglucosaminidases, β -galactosidases et α -*N*-acétylgalactosaminidases [Tailford et al., 2015]. Certaines souches bactériennes qui n'utilisent pas les mucines gélifiantes comme substrat énergétique peuvent néanmoins se maintenir dans le mucus par alimentation croisée [Belenguer et al., 2006]. De part l'absence d'un gradient de *O*-glycannes acides de l'intestin proximal vers l'intestin distal, le *O*-glycome fœtal est moins complexe que celui de l'adulte [Robbe-Masselot et al., 2003, Robbe-Masselot et al., 2009]. Cela suggère que la colonisation post-natale de la muqueuse digestive induit une réponse glycanique de l'hôte. La comparaison du mucus de souris

axéniques et de souris avec une flore a permis d'élucider l'impact du microbiote sur le *O*-glycome des mucines gélifiantes. La colonisation du mucus intestinal par les bactéries régule positivement l'expression des Galnt (orthologues murins des ppGalNac) qui initient la glycosylation des mucines gélifiantes. Les *O*-glycannes sont également constitués d'un nombre plus important de sucres résultant d'une activité glycosyltransférase plus élevée chez les animaux colonisés [Arike et al., 2017]. On observe une régulation positive de la sulfation et de la fucosylation des *O*-glycannes, respectivement dans le côlon et l'intestin grêle. La fucosylation est dépendante des cellules lymphoïdes innées de type 3 stimulées par la flore commensale [Goto et al., 2014]. La colonisation du mucus augmente le degré de sialylation des mucines gélifiantes. Ces mécanismes concourent à la complexification du profil de *O*-glycosylation des mucines gélifiantes qui permettrait de ralentir la dégradation des *O*-glycannes afin de protéger l'apomucine.

1.1.2.2.3.2 Maturation fonctionnelle par le microbiote

Le mucus intestinal subit une maturation fonctionnelle lors de sa colonisation par les bactéries à la naissance. Les souris axéniques ont une couche de mucus intestinal plus fine et totalement perméable à la sédimentation passive de micro-billes de taille comparable à celle de bactéries [Johansson et al., 2015]. La temporalité de cette maturation a été déterminée par la colonisation de souris axéniques par le microbiote de souris élevées en animalerie conventionnelle. Dès la seconde semaine post-colonisation, l'épaisseur de la couche interne du mucus colique s'accroît et devient imperméable à la 6^{ème} semaine post-colonisation. À partir de la 8^{ème} semaine, il n'y a plus de différence observable entre le mucus de souris axéniques colonisées *a posteriori* et celui de souris contrôles. La maturation du mucus est étroitement liée à la composition du microbiote. Une prévalence du genre *Allobaculum* est associée à un mucus protecteur alors, qu'au contraire, les protéobactéries sont plus abondantes chez les animaux ayant un mucus immature [Jakobsson et al., 2015].

L'alimentation intervient également dans la composition du microbiote et, *in fine*, dans les propriétés du mucus intestinal. La consommation de fibres alimentaires permet de limiter le développement de bactéries qui métabolisent les glycannes des mucines gélifiantes, ce qui conduit à la formation d'un mucus protecteur [Desai et al., 2016]. Le mécanisme exact impliqué dans la maturation du mucus n'est pas encore élucidé mais certaines études suggèrent un rôle du LPS et des peptidoglycannes bactériens [Petersson et al., 2011].

En conclusion, l'utilisation d'animaux axéniques a permis de mettre en évidence l'impact de la composition du microbiote sur le profil de *O*-glycosylation des mucines gélifiantes, qui est lui même impliqué dans les propriétés fonctionnelles des gels de mucus. Ainsi, des modifications de la composition du microbiote pourraient être impliquées dans la pathogénèse des tissus muco-sécrétants.

1.1.2.3 Motilité cellulaire

Les bactéries et spermatozoïdes ont développé des machineries cellulaires perfectionnées pour se propulser dans les fluides complexes tel que le mucus.

De manière générale, une augmentation modérée de la viscosité permet aux bactéries de se déplacer plus rapidement [Schneider and Doetsch, 1974]. Des adaptations morphologiques optimisent le déplacement des bactéries dans les fluides viscoélastiques. Par exemple, *Helicobacter pylori* augmente le nombre de ses flagelles et adopte une morphologie hélicoïdale afin de traverser le mucus couvrant l'épithélium gastrique [Martínez et al., 2016]. Le tissu muco-sécrétant et son état physiologique semblent être des éléments déterminants dans la motilité des microorganismes [Su et al., 2018]. Les surfaces revêtues d'un film de mucines gélifiantes entraînent l'agrégation de *Pseudomonas aeruginosa* en biofilms [Landry et al., 2006] alors, qu'en suspension dans un milieu

de culture, les mucines gélifiantes maintiennent cette bactérie sous forme planctonique [Caldara et al., 2012]. Le maintien de la structure native des mucines pourrait donc être un élément déterminant de leur effet sur le mode de croissance bactérienne.

Au cours de la fécondation, les spermatozoïdes subissent un changement drastique d'environnement en passant du liquide séminal au mucus cervico-vaginal. Les données expérimentales sont discordantes concernant l'impact de la viscosité sur la motilité des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes compensent la résistance due à la viscosité du milieu en réduisant les oscillations de la tête et en augmentant leurs dépenses énergétiques [Kirkman-Brown and Smith, 2011]. De cette manière, la motilité des spermatozoïdes n'est pas impactée par la viscosité du milieu, voire est augmentée si le milieu est viscoélastique [Tung et al., 2017]. D'autres études ont montré que la motilité des spermatozoïdes est inversement corrélée à la viscosité du milieu [Hyun et al., 2012, Rizvi et al., 2009]. Ces résultats sont difficilement transposables au mucus cervico-vaginal qui, comme beaucoup de fluides biologiques, possède une composante élastique.

Au delà des aspects mécaniques, les propriétés structurales du mucus vont conditionner la capacité des spermatozoïdes à atteindre l'ovule. La structure du mucus forme de larges mailles permettant le passage des spermatozoïdes en phase ovulatoire (Figure 8 A) tandis qu'elle oppose un encombrement stérique important en période péri-ovulatoire (Figure 8 B). Durant la grossesse les compartiments vaginal et utérin sont également séparés par un mucus très compact empêchant le passage des spermatozoïdes (Figure 8 C). Ces changements structuraux du mucus ovulatoire coïncident avec une surexpression de MUC5B permettant d'envisager un rôle majeur de cette mucine dans la fertilité humaine [Gipson et al., 2001].

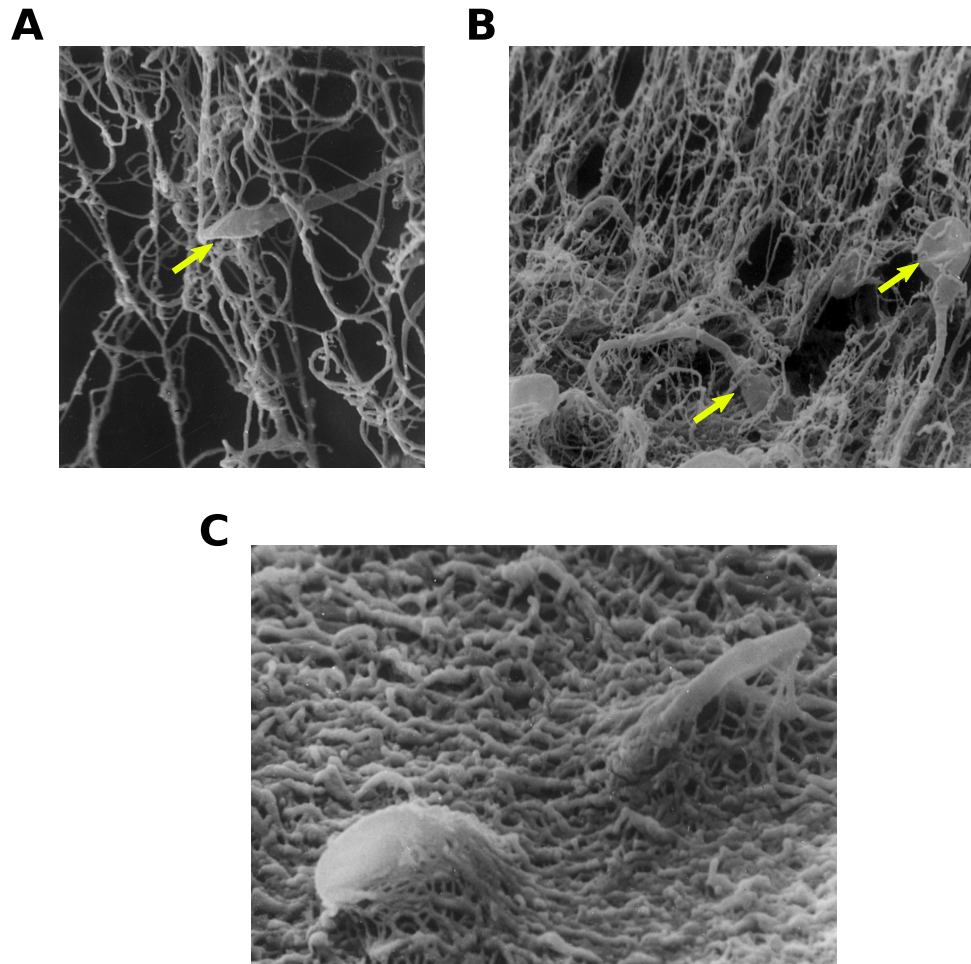


FIGURE 8 – Migration de spermatozoïdes dans le mucus cervical observée par MEB

A. Spermatozoïde évoluant dans le mucus cervical au cours de la phase ovulatoire (flèche ; $\times 3800$). **B.** Spermatozoïdes piégés dans le gel de mucus cervical en phase péri-ovulatoire (flèches ; $\times 3800$). **C.** Spermatozoïde piégé par la structure du bouchon de mucus cervical au cours de la grossesse ($\times 7000$). Adapté de Chrétien, 2003.

Les propriétés des gels de mucus décrites dans cette partie sont largement attribuées à leur caractère viscoélastique conféré par les mucines gélifiantes. La viscoélasticité des gels de mucus est extrêmement dynamique car toute variation de la physiologie des mucines gélifiantes, et plus largement des muqueuses sécrétoires, entraîne des changements des propriétés rhéologiques des gels de mucus. La partie suivante a pour but de décrire ces propriétés.

1.2 Propriétés rhéologiques des gels de mucus

La rhéologie est la science qui s'intéresse aux écoulements de matériaux. À l'origine développée par les physiciens, cette discipline trouve aujourd'hui de nombreuses applications en biologie, notamment pour l'étude des gels de mucus. Dans une première partie, nous développerons les techniques couramment utilisées pour caractériser les gels de mucus et les informations qu'elles apportent. L'hétérogénéité des propriétés viscoélastiques des gels de mucus sera abordée, au cours d'une seconde partie, avant de nous intéresser aux facteurs endogènes et exogènes qui en modifient la viscoélasticité.

1.2.1 Méthodes d'investigation

1.2.1.1 Microfluidique

À l'origine développée par l'industrie des semi-conducteurs dans les années 1950, la microfluidique consiste à manipuler des fluides à l'aide de dispositifs sub-millimétriques. La microfluidique connaît un essor au début du 21^{ème} siècle où elle commence à trouver des applications biomédicales comme le diagnostic, l'étude du chimiotactisme ou les essais pharmacologiques [Chin et al., 2011]. Au delà de la rapidité d'exécution et des volumes réduits d'échantillons, la microfluidique possède plusieurs avantages intrinsèques à l'échelle

à laquelle les expériences sont réalisées. À l'échelle micrométrique, les écoulements se font majoritairement en régime laminaire, ce qui permet de modéliser plus facilement la dynamique des fluides. La convection est inexistante dans ces dispositifs, contrairement à la tension de surface qui domine la force de gravité et permet donc de manipuler les fluides dans des micro-canaux grâce à la capillarité [Sackmann et al., 2014].

Les dispositifs micro-fluidiques permettent d'étudier les aspects dynamiques du mucus en reproduisant des phénomènes actifs observés *in vivo* comme la sécrétion continue du gel de mucus ou la clairance mucociliaire. C'est grâce à ces dispositifs que la pénétration des sucs gastriques dans un mucus sécrété en continu a été investiguée. Ceci a permis de mettre en évidence le pouvoir tampon des mucines gélifiantes qui lient les protons à des concentrations de l'ordre du millimolaire [Li et al., 2012]. La microfluidique est utilisée en nanomédecine pour déterminer le pouvoir muco-pénétrant de nanoparticules [Bhattacharjee et al., 2017] ou de peptides [Li et al., 2013] et leur éventuel impact sur les propriétés rhéologiques des gels de mucus. Ces dispositifs détectent des changements structuraux et biochimiques du mucus cervical et montrent une certaine efficacité pour diagnostiquer un risque de naissance prématurée [Smith-Dupont et al., 2017].

1.2.1.2 Rhéométrie

La rhéométrie permet de mesurer les propriétés rhéologiques d'un matériau dans son ensemble, on parle alors de propriétés macro-rhéologiques. Pour cela, on mesure la réponse d'un matériau à une contrainte d'intensité et de fréquence contrôlées par un dispositif appelé rhéomètre. Deux modes de mesure sont utilisés. La mesure peut être effectuée en déformation contrôlée. Dans ce cas, une déformation γ de fréquence contrôlée par ordinateur est appliquée sur un échantillon et un transducteur mesure la force σ , aussi appelée contrainte, avec laquelle l'échantillon répond à cette déformation. Cette mesure est re-

présentative de la réponse du mucus durant un phénomène biologique actif tel que le péristaltisme. La contrainte est exprimée en $N.m^{-2}$ ou en Pa . Le second mode de mesure, dit de contrainte contrôlée, consiste à faire la démarche inverse, c'est à dire à apposer une contrainte donnée sur un échantillon et à mesurer la déformation résultante qui ne possède pas d'unité. Contrairement au premier mode de mesure, les mesures en contrainte contrôlée produisent généralement de faibles déformations de fréquence contrôlée qui reflètent alors la réponse du mucus en situation basale. Pour réaliser la mesure, l'échantillon est placé dans une cellule dont la géométrie varie en fonction de la nature de l'échantillon. L'échantillon peut être placé entre deux plaques (solide ou solide mou), une plaque et un cône tronqué ou deux cylindres concentriques (échantillons liquides). Dans chaque configuration, il y a un élément fixe et un élément mobile qui effectue soit un mouvement de rotation autour d'un axe, soit un mouvement de cisaillement. La contrainte et la déformation de l'échantillon sont alors calculées à partir du couple et de la position angulaire de l'élément mobile [Janmey et al., 2007].

Dans le cas d'un rhéomètre qui applique une contrainte ou une déformation par oscillations de faible amplitude, la déformation engendrée sur le matériau est définie par la formule :

$$\gamma = \gamma_0 \sin \omega t \quad (1.2)$$

Où γ_0 représente l'amplitude de la déformation générée par le rhéomètre, ω la fréquence angulaire et t la durée. La contrainte générée sur l'échantillon σ s'écrira alors :

$$\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (1.3)$$

Où σ_0 est la contrainte appliquée par le rhéomètre. Notons qu'il y a un décalage de phase δ entre la contrainte générée par le rhéomètre et la réponse de l'échantillon. Ce décalage

de phase témoigne des propriétés viscoélastiques de l'échantillon. Le décalage de phase est toujours compris entre 0 et 90°. Si $\delta = 0^\circ$, le fluide est purement élastique et, à l'inverse, si $\delta = 90^\circ$, le fluide est Newtonien (ou purement visqueux). L'obtention d'une valeur de décalage de phase intermédiaire signifie que le fluide est viscoélastique. Il est alors possible de quantifier la part visqueuse ou module de perte G'' et la part élastique ou module de conservation G' par la relation :

$$\sigma(t) = \gamma_0(G' \sin \omega t + G'' \cos \omega t) \quad (1.4)$$

Le rhéomètre mesure donc la contrainte résultant de la déformation appliquée au cours du temps afin que les modules de perte et de conservation soient déterminés.

Dans certains cas, une contrainte d'amplitude constante est appliquée sur un échantillon et la déformation engendrée est mesurée en fonction du temps. Cela permet de mimer une situation biologique (pression sanguine, péristaltisme, clairance). On parle alors de mesure du fluage :

$$J(t) = \frac{\gamma(t)}{\sigma_0} \quad (1.5)$$

Où $J(t)$ représente la fonction de fluage en fonction du temps, $\gamma(t)$ la déformation de l'échantillon au cours du temps et σ_0 la contrainte appliquée. Ces données permettent de prévoir le comportement d'un fluide *in vivo*. L'efficacité d'un agent mucolytique peut être testée en mesurant le fluage d'un gel de mucus avant et après traitement en le soumettant à une contrainte équivalente à la clairance mucociliaire (la contrainte de cisaillement est estimée à environ 0,2 Pa dans l'arbre pulmonaire [Tarran et al., 2006]). Cette technique est également employée pour comparer le caractère élastique des gels de mucus en observant le recouvrement partiel de leur structure après une déformation [Celli et al., 2007].

L'une des principales limites de l'étude des gels de mucus est la quantité d'échantillon disponible. Le rhéomètre à oscillations nécessite des volumes d'échantillon importants (de l'ordre de la centaine de microlitres). Pour palier ce problème, King *et coll.* ont développé le rhéomètre magnétique dont le principe est de soumettre un échantillon contenant des micro-billes d'acier à un champ magnétique sinusoïdal [King and Macklem, 1977]. Un vidéomicroscope mesure les mouvements des billes soumises à ce champ magnétique. De cette manière, il est possible de mesurer le décalage de phase entre le champ magnétique (déformation) et le mouvement des billes (contrainte) afin de déterminer les modules de perte et de conservation du fluide. La réalisation de cette mesure ne nécessite que deux à cinq μL d'échantillon.

1.2.1.3 Micro-rhéologie

La micro-rhéologie présente un grand intérêt en biologie car elle permet la caractérisation de matériel précieux disponible en quantité limitée. Dans notre étude, chaque groupe est composé de 3 à 5 souris ce qui ne permet pas d'obtenir plus d'une centaine de μL de mucus colique. Cela justifie l'emploi de la micro-rhéologie pour mettre en évidence des modifications du gel. Contrairement à la rhéométrie conventionnelle, l'analyse du mouvement de particules permet de déterminer les propriétés rhéologiques locales d'un fluide. La micro-rhéologie traduit donc les hétérogénéités au sein d'un fluide. Alternativement, la micro-rhéologie peut être définie comme l'étude des propriétés viscoélastiques d'un fluide à l'échelle du micro-litre. Si les particules sont inférieures à $1 \mu m$ alors, à l'équilibre, leur mouvement est Brownien car les forces inertielles sont négligeables. Dans ce cas, 3 types de forces s'opèrent sur la particule [Wirtz, 2009] :

- L'énergie thermique $k_b T$ due au bombardement des atomes du fluide à la surface de la particule.
- Les forces de frictions qui s'opposent à l'énergie thermique. Ces forces sont propor-

tionnelles à la vitesse de la particule et à son diamètre.

- Les forces élastiques qui tendent à ramener la particule à sa position initiale à chaque déplacement.

Ces deux dernières forces sont directement dépendantes des propriétés viscoélastiques du fluide dans lequel les billes diffusent. L'étude du déplacement de particules de taille connue permet alors de calculer la viscoélasticité du fluide en question. On distingue la micro-rhéologie active de la micro-rhéologie passive. En micro-rhéologie active, le déplacement des particules est entraîné par une contrainte transmise au fluide (une oscillation par exemple), alors qu'en micro-rhéologie passive, ce sont les fluctuations thermiques du fluide à l'équilibre qui entraînent le mouvement des particules. La mesure est donc effectuée en régime linéaire. La taille et la chimie de surface des particules sont particulièrement importantes dans l'interprétation des mesures de diffusion. La surface des particules doit être neutre et hydrophile afin de limiter toute interaction avec les parties chargées et hydrophobes des mucines gélifiantes. Si les particules ont un diamètre inférieur aux mailles formées par les polymères, alors la viscoélasticité mesurée correspond à celle du fluide interstitiel. Alors qu'au contraire, une particule de taille supérieure aux mailles évoluera en interactions étroites avec les polymères et permettra de mesurer leurs propriétés mécaniques locales (Figure 9).

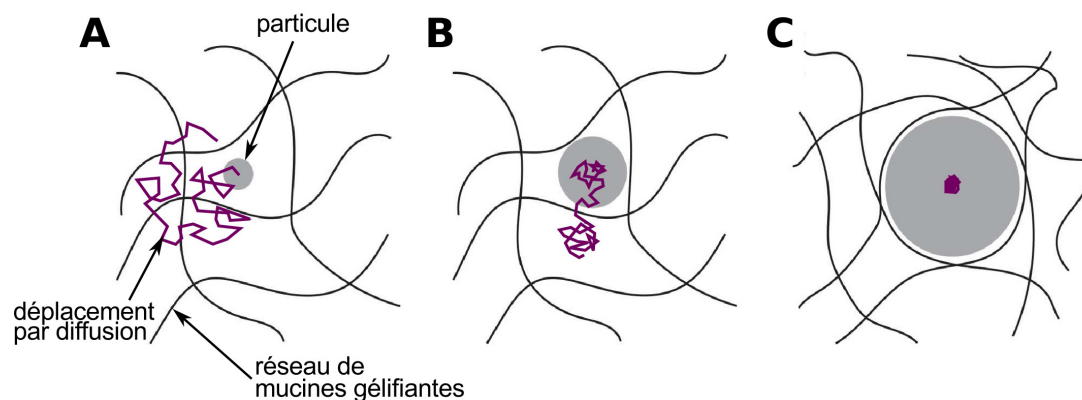


FIGURE 9 – Effet du diamètre des particules sur leur diffusion dans le mucus
A. Les particules dont le diamètre est inférieur à la porosité du mucus diffusent librement dans le fluide interstitiel. **B.** Lorsque le diamètre de la particule approche celui de la porosité du gel, l'obstruction stérique, et donc la viscoélasticité locale, sont plus importantes. **C.** Les particules dont la taille est supérieure à la porosité du gel sont piégées par la structure du mucus. Adapté de Witten and Ribbeck, 2017.

Les particules utilisées sont généralement des sphères de diamètre et de chimie de surface connus. Dans certains cas, la diffusion d'autres sondes, tels que les phages, permet de trouver des molécules candidates capables de traverser les barrières de mucus [Leal et al., 2018]. Dans le cas de particules, les micro-sphères sont placées dans l'échantillon biologique à une concentration suffisamment faible pour ne pas interagir entre elles. En biologie, la diffusion des particules est le plus souvent enregistrée par un vidéomicroscope couplé à une caméra CCD (*Charged Coupled Device*) [Selvaggi et al., 2010]. L'inconvénient de cette méthode est que la fréquence d'acquisition impose un suivi des particules en 2 dimensions. Les vidéos enregistrées sont analysées informatiquement afin de déterminer les coordonnées des particules au cours du temps et de reconstituer leurs trajectoires grâce à divers algorithmes [Tinevez et al., 2017, Schindelin et al., 2012]. Les coordonnées des particules sont alors transformées en déplacement quadratique moyen ou *mean square displacement* (noté *MSD* ou Δr^2) par la formule :

$$\Delta r^2(\tau) = [x(t + \tau) - x(t)]^2 + [y(t + \tau) - y(t)]^2 \quad (1.6)$$

Où $x(t)$, $y(t)$ représentent les coordonnées d'une particule à un temps t et τ le retard. Le coefficient de diffusion D_{eff} des particules en fonction de τ peut alors être calculé selon la formule :

$$D_{eff}(\tau) = \frac{\Delta r^2(\tau)}{4\tau} \quad (1.7)$$

Cette équation est valable pour un suivi des particules en 2 dimensions. En régime linéaire, le déplacement quadratique suit une loi de puissance selon l'équation :

$$\Delta r^2(\tau) = 4D_0\tau^\alpha \quad (1.8)$$

Où D_0 représente le coefficient de diffusion indépendant du retard et α la loi de puissance

locale du déplacement quadratique moyen. La loi de puissance locale du déplacement quadratique moyen permet de caractériser le mouvement de particule. Si $\alpha = 1$, alors la diffusion est dépendante du retard, ce qui traduit la présence d'un fluide Newtonien. Une valeur $\alpha < 1$ signifie que le régime est subdiffusif, et donc que le fluide étudié est viscoélastique (Figure 10). Le module complexe, ou module viscoélastique, peut alors être déterminé analytiquement en résolvant l'équation généralisée de Stokes-Einstein :

$$G^*(\omega) = \frac{k_b T}{6\pi a i \omega \Delta r^2(s)} \quad (1.9)$$

Où $k_b T$ représente l'énergie thermique, a le rayon de la particule et $\Delta r^2(s)$ la transformée de Fourier de $\Delta r^2(\tau)$. Une méthode algébrique a été développée par Mason *et coll.* afin d'éviter les erreurs de troncature associées à la transformée de Fourier [Mason et al., 1997] :

$$G^*(\omega) = \frac{k_b T}{6\pi a \Delta r^2(\omega) \Gamma(1 + \alpha(\omega))} \quad (1.10)$$

Avec :

$$\alpha(\omega) = \frac{d \ln \Delta r^2(\tau)}{d \ln t} \text{ et } \tau = \frac{1}{\omega} \quad (1.11)$$

Les modules visqueux G'' et élastique G' peuvent être calculés en fonction de la fréquence ω et de la loi locale de puissance du déplacement quadratique moyen $\alpha(\omega)$:

$$G'(\omega) = G^*(\omega) \cos\left(\frac{\alpha(\omega)\pi}{2}\right) \quad (1.12)$$

$$G''(\omega) = G^*(\omega) \sin\left(\frac{\alpha(\omega)\pi}{2}\right) \quad (1.13)$$

Les mesures des propriétés micro-rhéologiques d'un échantillon peuvent également

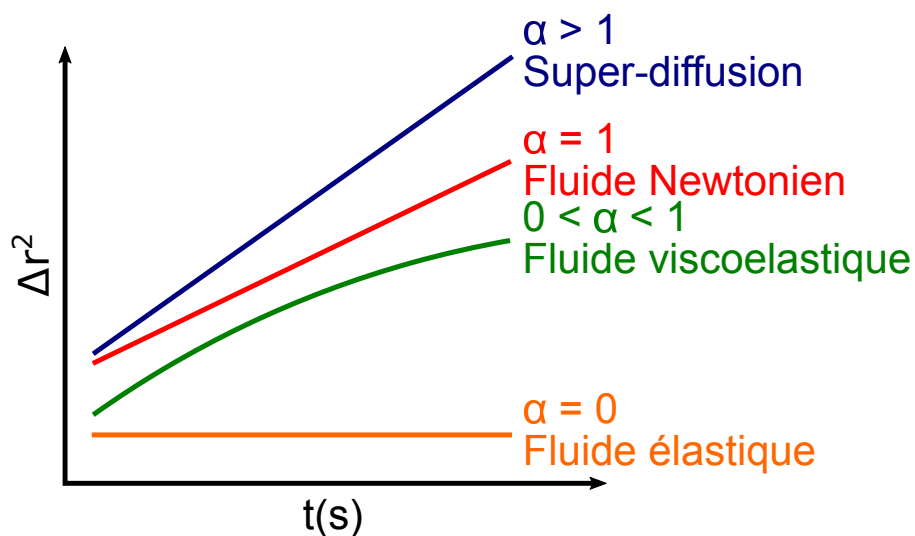


FIGURE 10 – Courbes représentatives du déplacement quadratique moyen en fonction du retard et des propriétés rhéologiques du fluide étudié

La diffusion de particules dans un fluide Newtonien est dite normale, car le déplacement quadratique moyen varie linéairement avec le retard ($\alpha = 1$). À l'inverse, les fluides élastiques ont une diffusion indépendante du retard ($\alpha = 0$). Toute autre valeur de la loi de puissance du déplacement quadratique moyen signifie que le fluide possède à la fois une composante visqueuse et une composante élastique. Il existe un cas particulier où la loi de puissance du déplacement quadratique moyen est supérieure à 1. Cela traduit soit un fluide qui n'est pas à l'état d'équilibre, soit un mécanisme de transport actif au sein de l'échantillon.

être effectuées par diffusion dynamique de la lumière (DLS, de l'anglais *Dynamic light scattering*). La technique de la DLS consiste à mesurer la dispersion d'un faisceau laser par les macromolécules ou les particules contenues dans un échantillon. Les ondes issues de la dispersion du faisceau laser peuvent être en phase ou non, entraînant respectivement un signal détectable ou l'absence de signal. Un auto-correlateur digital enregistre les fluctuations de l'intensité de la lumière dispersée en fonction du temps. L'intensité du signal dépend du rayon hydrodynamique (soit le rayon d'une sphère ayant le même coefficient de diffusion que la macromolécule étudiée) des macromolécules en suspension, tandis que les fluctuations du signal dépendent du mouvement brownien des macromolécules [Stetefeld et al., 2016]. Les fluctuations du rayonnement diffusé peuvent être reliées à la diffusion des macromolécules en suspension par la formule :

$$g_2(\tau) = 1 + \beta e^{-2D_\tau q^2 \tau} \quad (1.14)$$

Où β représente le facteur de cohérence qui est dépendant de l'appareil utilisé. $g_2(\tau)$ est la fonction de corrélation d'intensité. Le vecteur d'onde q se calcule grâce à la formule

$$q = \frac{4\pi\eta}{\lambda} \sin(\theta/2) \quad (1.15)$$

Où η est la viscosité du solvant, λ la longueur d'onde du laser incident et θ l'angle auquel est placé le détecteur. Une fois le coefficient de diffusion déterminé, le rayon hydrodynamique R_h peut être calculé par la loi de Stokes-Einstein :

$$R_h = \frac{k_b T}{6\pi\eta D_\tau} \quad (1.16)$$

Afin d'étudier le mucus, la DLS peut permettre d'estimer la maille moyenne ou maille caractéristique ξ formée par les polymères de mucines gélifiantes via la formule

[Raynal et al., 2003] :

$$\xi = \frac{-d}{\ln \frac{D}{D_0}} \quad (1.17)$$

Avec d , le diamètre de la sonde.

1.2.1.4 Sédimentation de particules

Le phénomène de sédimentation est étroitement lié à la taille des particules en suspension (Figure 11 A). À partir de 100 nm de diamètre, l'inertie des particules est suffisante pour entraîner le transport par sédimentation. En dessous de cette taille, les mouvements particuliers ont lieu par diffusion (voir 1.2.1.3). Des charges positives et négatives coexistent au sein du mucus. De ce fait, la charge nette, mais aussi l'arrangement spatial des charges à la surface de la particule, vont définir sa capacité à traverser le gel [Li et al., 2013]. Les tests de sédimentation sont utilisés couramment pour évaluer la perméabilité relative du mucus. L'utilisation de particules de 0,5 à 2 μm de diamètre a permis de mettre en évidence une perméabilité anormale du mucus colique chez des patients atteints de rectocolite hémorragique [Johansson et al., 2014] ou, à l'inverse, de montrer, dans un travail du laboratoire, le renforcement du mucus colique par la délivrance d'une molécule constituée de domaines CYS dans un modèle murin transgénique [Desseyn et al., 2016]. La principale limite de cette technique est l'impossibilité de mesurer la viscosité absolue du mucus car sa nature non-Newtonienne rend complexe la modélisation du déplacement de particules. Cependant, la viscosité du fluide interstitiel du mucus peut être mesurée en utilisant des particules possédant certaines caractéristiques. Ces particules doivent avoir une surface muco-inerte et un diamètre inférieur à la taille des mailles que forment les mucines (mais supérieur à 100 nm ; Figure 11 A). Ces particules doivent être suffisamment diluées pour ne pas interagir entre elles ou avec une paroi. Dans cette configuration, trois forces régissent le déplacement de ces particules

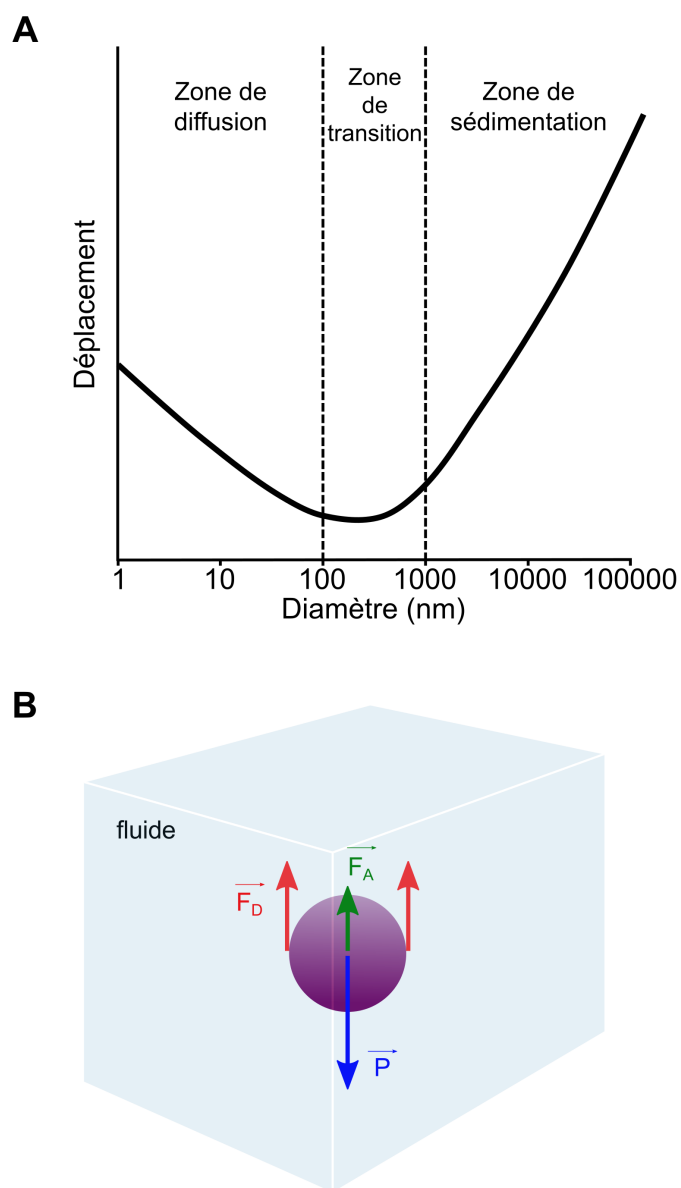


FIGURE 11 – Paramètres régissant la sédimentation d'une particule dans un fluide au repos

A. Graphe représentant le type de déplacement en fonction du diamètre des particules en suspension. Les particules dont le diamètre est supérieur à 100 nm sédimentent. Sous cette limite, les déplacements particuliers se font par diffusion moléculaire. **B.** Bilan des forces s'exerçant sur une particule en suspension. La force de pesanteur \vec{P} corrigée par la poussée d'Archimède \vec{F}_A entraîne la sédimentation de la particule. Le fluide exerce une force de frottement visqueux ou force de traînée \vec{F}_D à la surface de la particule qui est opposée à la force de pesanteur.

(Figure 11 B). D'une part, la force de pesanteur corrigée par la poussée d'Archimède qui s'écrit :

$$\vec{P}_A = V \cdot (\varphi_p - \varphi_f) \cdot \vec{g} \quad (1.18)$$

Avec V le volume de la particule, φ_p et φ_f les masses volumiques de la particule et du fluide, respectivement et $g = 9,81 \text{ m.s}^{-2}$. À cette force de gravitation s'oppose la force de traînée qui représente le frottement du fluide interstitiel à la surface de la particule :

$$\vec{F}_D = 3 \cdot \pi \cdot \mu_f \cdot d \cdot v \quad (1.19)$$

Avec μ_f la viscosité dynamique du fluide, d le diamètre de la particule et v la vitesse de déplacement de la particule. La vitesse de sédimentation atteindra un plateau v_s témoignant de l'équilibre entre les forces de pesanteur et de traînée on obtient alors :

$$v_s = \frac{d^2 \cdot (\varphi_p - \varphi_f)}{18 \cdot \mu_f} \cdot \vec{g} \quad (1.20)$$

Cette équation permet donc de relier la vitesse de sédimentation v_s des particules à la viscosité dynamique μ_f du fluide dans lequel elles sédimentent.

1.2.2 Rhéologie des gels de mucus

1.2.2.1 Applications de la micro-rhéologie à l'étude des gels de mucus

La micro-rhéologie est utilisée pour déterminer l'ultrastructure du mucus. Si elles n'interagissent pas avec les mucines gélifiantes, les sondes de taille inférieure à 100 nm, des protéines par exemple, diffusent librement dans le mucus car leur diamètre est inférieur aux mailles formées par les mucines gélifiantes. C'est pourquoi le papillomavirus (48 nm de

diamètre) diffuse aisément dans le mucus, contrairement au virus herpes simplex (180 nm de diamètre) [Olmsted et al., 2001]. À partir de 200 nm, l’obstruction stérique due au réseau de polymères de mucines gélifiantes entraîne une augmentation du module viscoélastique que rencontre la sonde [Schuster et al., 2013]. La nature physique des gels de mucus implique une dynamique d’associations et dissociations des polymères de mucines gélifiantes qui permet le passage de sondes supérieures à la maille caractéristique du gel sur de longues échelles de temps [Narita and Indei, 2016]. De même le réarrangement transitoire de la structure du gel par une sonde capable d’interférer avec les sites d’interactions entre les mucines gélifiantes améliore sa capacité à diffuser dans le mucus [Goodrich et al., 2018]. Les propriétés rhéologiques locales rencontrées par les particules dans le mucus sont donc étroitement liées à leurs caractéristiques (taille, chimie de surface). De ce fait un même gel de mucus peut avoir une plage de micro-viscosités allant de celle de l’eau à celle d’un gel aux propriétés viscoélastiques.

Des modèles mathématiques, comme l’*obstruction scaling model* développé par Amsden *et coll.*, permettent d’estimer la maille caractéristique des hydrogels ou des solutions de polymères avec une précision acceptable [Amsden, 1999, Hadjiev and Amsden, 2015]. C’est pourquoi ce modèle est utilisé pour l’étude des gels de mucus [Wang et al., 2013, Wang et al., 2011, Lai et al., 2010]. Le tableau 2 met en évidence la variabilité structurale des gels de mucus en fonction des organismes et des tissus muco-sécrétants. Notons que certains gels de mucus ont une grande hétérogénéité de taille de mailles qui pourrait être la conséquence de l’existence de zones plus ou moins riches en mucines gélifiantes [Wagner et al., 2017].

En nanomédecine, la micro-rhéologie est un outil permettant d’évaluer la capacité de nanoparticules à franchir ou, au contraire, à adhérer aux gels de mucus. Les nanoparti-

Tableau 2 – Variabilité de la taille des mailles du mucus

Tissu	Organisme	Méthode de mesure	Taille des mailles (nm)	Référence
Cervix	Homme	Suivi de particules	50–1000	[Lai et al., 2010]
Nez	Homme	Suivi de particules	100–200	[Lai et al., 2011a]
Trachée	Homme	Microscopie électronique	500–600	[Duncan et al., 2016]
Côlon	Souris	Suivi de particules	< 200	[Ensign et al., 2013]
Œil	Bovin	Suivi de particules	500–600	[Xu et al., 2013]

cules potentialisent la biodisponibilité de composés actifs par diverses stratégies (muco-adhésion, muco-pénétration) qui dépendent de leurs propriétés physico-chimiques. L'augmentation du temps de rétention des nanoparticules dans le mucus implique la formation de liaisons avec les mucines gélifiantes. Une des stratégies couramment utilisées consiste à couvrir la surface des nanoparticules de chitosan, un polysaccharide cationique, qui s'adsorbe naturellement sur les mucines gélifiantes anioniques [Kootala et al., 2018]. Ces interactions électrostatiques provoquent une réduction de la diffusion des particules d'un facteur 100 en comparaison avec une particule neutre de diamètre similaire [Abdulkarim et al., 2015]. Une autre stratégie consiste à coupler les particules avec les mucines gélifiantes par des liaisons covalentes comme des ponts disulfure. Les nanoparticules sont alors couvertes de résidus cystéine ou de groupements thiol réactifs avec les résidus cystéine exposés des mucines gélifiantes [Dünnhaupt et al., 2011, Partenhauser et al., 2015]. Pour augmenter l'efficacité de la délivrance des composés actifs, des sondes possédant une adhésion spécifique aux mucines gélifiantes ont été développées en s'inspirant de phénomènes biologiques. Par exemple, le couplage de la lectine *Tomato* avec des nanoparticules augmente leur temps de résidence et leur absorption dans l'intestin grêle [Ponchel and Irache, 1998]. De la même manière, la couverture des nanoparticules par des IgA a montré une augmentation spécifique de l'absorption des nanoparticules par les cellules M de la muqueuse colique [Zhou et al., 1995]. La limite de l'utilisation des nanoparticules muco-adhésives est leur effet sur la structure du mucus. À des concentrations supérieures à 0,24 %, ces nanoparticules modifient la micro-structure du mucus et favorisent la diffusion de particules de

diamètre supérieur à 1 μm . Cela suggère un éventuel effet délétère en réduisant l'encombrement stérique que le mucus exerce sur les pathogènes et particules [Wang et al., 2011].

Les barrières de mucus constituent un frein à la délivrance de composés thérapeutiques, ce qui réduit sévèrement leur efficacité. Le développement de nanoparticules capables de délivrer un composé de manière contrôlée et efficace constitue un challenge pour l'industrie pharmaceutique. La recherche de sondes capables de franchir les gels de mucus s'est inspirée des propriétés des protéines composant la capsidie des virus dont la diffusion n'est quasiment pas impactée par la présence du mucus [Olmsted et al., 2001]. Les capsides sont suffisamment petites pour ne pas être ralenties par le mucus à cause de leur encombrement stérique. De plus, la composition protéique de la capsidie est un assemblage de charges positives et négatives résultant en une charge nette nulle (Figure 12 A). Cela confère des propriétés hydrophiles aux capsides tout en limitant les interactions électrostatiques avec les mucines gélifiantes. L'une des stratégies les plus efficaces pour permettre à une sonde de franchir les barrières de mucus consiste à lui greffer une couronne de polyéthylène glycol (PEG) qui est un polymère neutre et hydrophile. Pour être efficace, la densité des chaînes de PEG doit être suffisamment importante pour ne pas entraîner d'interpénétration avec les mucines gélifiantes [Huang et al., 2000] et les chaînes de PEG doivent avoir un poids moléculaire inférieur à 10 kDa (Figure 12 B) [Cu and Saltzman, 2009]. Dans ces conditions et en l'absence d'encombrement stérique, ces particules ont montré une certaine efficacité à franchir les barrières de mucus de plusieurs tissus comme le vagin [Lai et al., 2007, Lai et al., 2010, Maisel et al., 2016], l'intestin [Ensign et al., 2013], l'œil [Xu et al., 2013] ou le poumon [Schuster et al., 2013]. Cet effet a également été observé pour des échantillons de mucus provenant de sujets atteints de mucoviscidose [Suk et al., 2009] ou de sinusite [Lai et al., 2011b]. À l'instar des

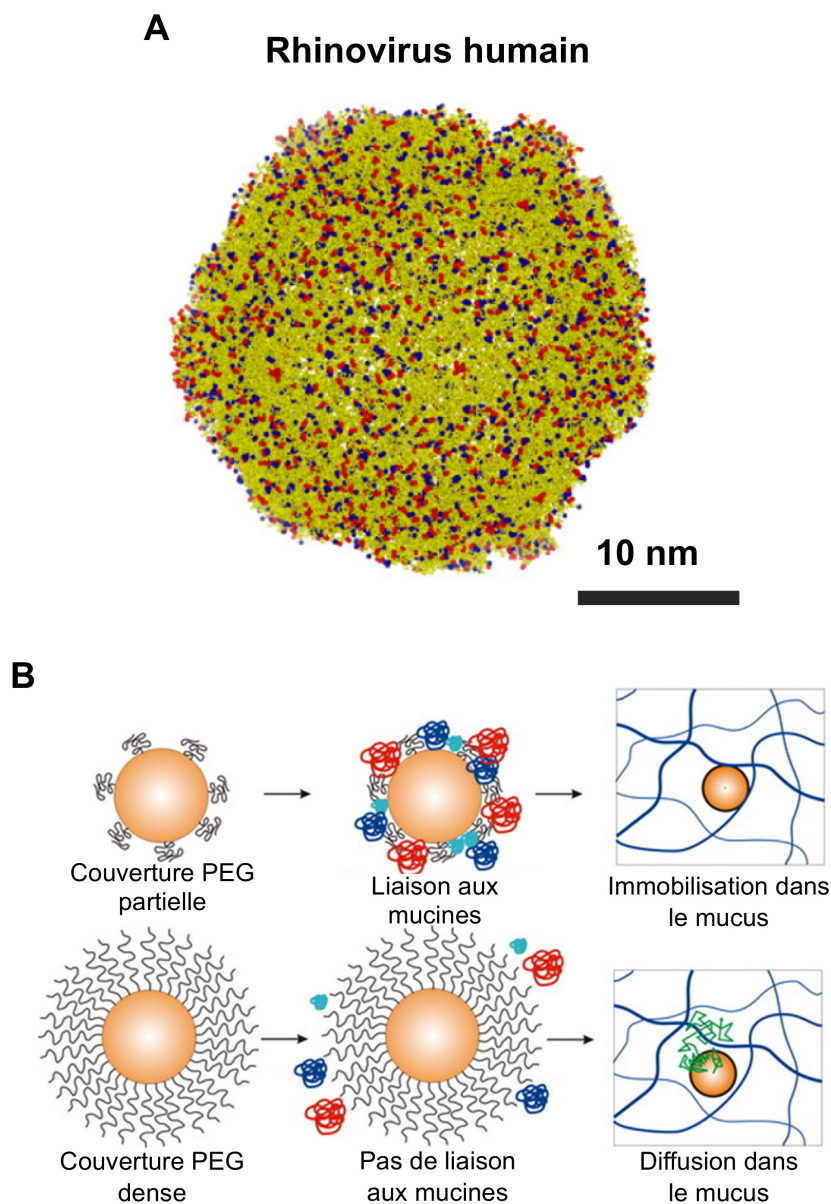


FIGURE 12 – Des propriétés physico-chimiques des virus à la synthèse de nanoparticules muco-pénétrantes

A. La capsid du rhinovirus possède une densité de charges importante. Les charges positives et négatives sont respectivement représentées en rouge et en bleu, ce qui illustre la répartition égale des charges à la surface de la capsid des virus. Cette structure provient de la base de données *Human Rhinovirus 2rm2*. **B.** La densité et le poids moléculaire des chaînes de PEG sont les deux facteurs qui conditionnent les interactions avec les mucines gélifiantes, et donc la diffusion des nanoparticules dans le mucus. Adapté de Cone, 2009, Huckaby and Lai, 2017.

virus, le recouvrement des particules par des composés zwitterioniques permet d'améliorer leur passage à travers le mucus (Figure 12 A) [Shan et al., 2016]. Leur absorption par les cellules est également meilleure que celle obtenue par recouvrement avec le PEG qui a un effet négatif sur celle-ci [Pozzi et al., 2014]. Le développement de sondes capables de franchir les barrières de mucus a permis d'améliorer les outils de thérapie génique comme le système CRISPR/Cas9 [Zhang et al., 2018] ou les nanoparticules vecteur d'ADN [Osman et al., 2018, Suk et al., 2014], mais aussi d'augmenter la biodisponibilité des antibiotiques [Ernst et al., 2018] et des agents mucolytiques [Guichard et al., 2018].

La micro-rhéologie est donc un outil indispensable pour déterminer les propriétés rhéologiques des gels de mucus. Cependant l'utilisation de sondes muco-inertes supérieures à la taille des mailles du mucus ne permet pas de retrouver les propriétés viscoélastiques mesurées à l'échelle du fluide dans son ensemble. Par exemple la viscosité de crachats de patients atteints de mucoviscidose est respectivement 1600 (diamètre de la sonde : 500 nm) et 30 000 fois supérieure à celle de l'eau selon qu'elle soit mesurée par micro- ou macro-rhéométrie. La détermination des propriétés rhéologiques à l'échelle macroscopique est donc indispensable pour avoir une vision globale du comportement physique des gels de mucus [Wagner et al., 2017].

1.2.2.2 Applications de la macro-rhéologie à l'étude des gels de mucus

À l'échelle macroscopique, la nature visqueuse du mucus permet son écoulement tandis que son élasticité lui confère un certain degré de déformabilité. Le mucus est un fluide thixotrope car ses propriétés viscoélastiques sont dépendantes de la contrainte à laquelle il est soumis. Une augmentation de la fréquence et/ou de l'amplitude de la contrainte entraîne une diminution des modules visqueux et élastique du mucus. La viscosité dynamique des gels est comprise entre 10^{-2} et $10^3 Pa.s$ pour des fréquences de cisaillement

allant de 10^{-4} à 10^2 Hz (se référer à Lai et al., 2009b pour revue). Pour de faibles contraintes, le mucus est dominé par des forces élastiques permettant l'adhésion de ces gels aux épithéliums et le recouvrement de leur structure. Cette caractéristique est cruciale pour limiter les écoulements du mucus sous l'effet de la gravité par exemple. En revanche, une augmentation de l'amplitude et/ou de la fréquence de cette contrainte entraîne une désorganisation du réseau de mucines gélifiantes. Ce phénomène change les propriétés viscoélastiques du mucus qui sont alors dominées par des forces visqueuses caractérisant un système qui s'écoule. De plus, pour des contraintes intenses évaluées à 10^3 à 10^4 Hz en contexte biologique, comme durant la toux, la copulation ou le battement de paupière, la viscosité du mucus est très faible et s'approche de celle de l'eau. Cela permet à la fois la lubrification des épithéliums mais aussi l'évacuation efficace des gels de mucus.

L'obtention d'échantillons de mucus provenant d'individus sains est difficile à cause, en partie, du caractère invasif des procédures expérimentales. Cela explique la rareté des données dans la littérature. La Figure 13 met en évidence l'extrême variabilité des propriétés rhéologiques des gels de mucus [Park et al., 2007, Hattori et al., 1993, Schuster et al., 2013, Lai et al., 2009a, Curt and Pringle, 1969, Gouveia and Tiffany, 2005]. En revanche, les études cliniques donnent accès à des échantillons de mucus issus de patients, particulièrement dans le cadre des BPCO et de la mucoviscidose, afin de développer des thérapeutiques capables de restaurer les propriétés de ces gels.

L'une des caractéristiques principales des sécrétions de patients atteints de mucoviscidose est un mucus trois fois plus concentré en mucines gélifiantes qu'un sujet sain ($\simeq 5-8$ mg/mL). Button *et coll.* ont proposé un modèle élégant qui explique en quoi une augmentation de la concentration de mucines gélifiantes aboutit à la muco-stase dans

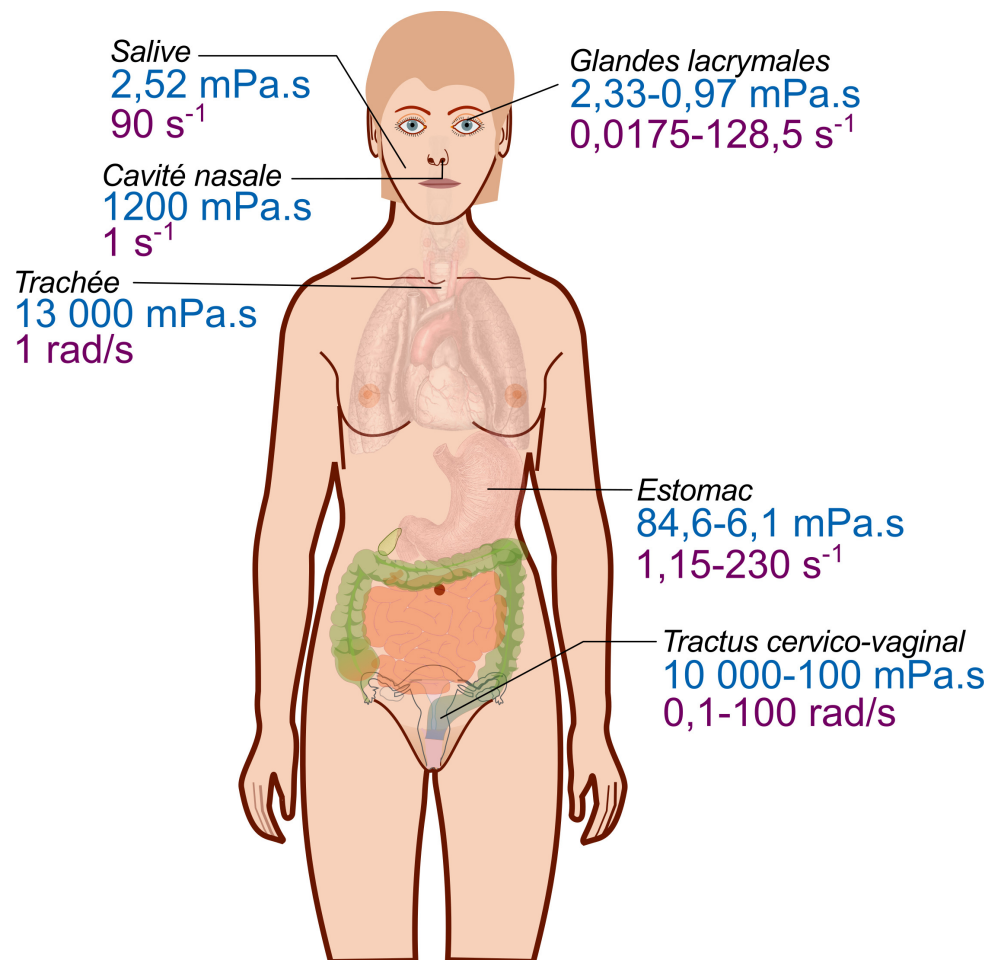


FIGURE 13 – Viscosité dynamique du mucus en fonction du tissu muco-sécrétant chez l'Homme sain

Pour chaque tissu, la viscosité dynamique (bleu) est indiquée en fonction de la plage ou de la valeur de la fréquence (violet) à laquelle a été effectuée la mesure.

les voies respiratoires. Les auteurs démontrent que le liquide périliciliaire (LPC) et le mucus sont deux compartiments non miscibles et que leurs modules osmotiques respectifs permettent des échanges d'eau jusqu'à l'équilibre. Dans le mucus d'individus atteints de mucoviscidose, le module osmotique du mucus est largement supérieur à celui de sujets sains (respectivement 3000 et 200 Pa). Cela entraîne une compression du LPC qui met les cils au contact du mucus et empêche leurs battements efficaces aboutissant, *in fine*, à l'obstruction des voies aériennes par défaut de clairance. La macro-rhéologie a mis en évidence que le crachat de patients atteints de mucoviscidose est largement dominé par des forces élastiques ($\delta = 16,2^\circ$ à $\omega = 1 \text{ rad/s}$) sur tout le spectre de fréquences biologiquement plausibles (10^{-2} – 10^2 rad/s). De plus, les modules visqueux et élastique de ces échantillons sont constants pour des amplitudes de déformation allant jusqu'à 10 %. À l'équilibre, la viscosité dynamique du crachat atteint 7 Pa à $0,2 \text{ s}^{-1}$ [Dawson et al., 2003]. Tous ces éléments expliquent en quoi la toux est la seule alternative biologique capable d'exercer une contrainte suffisamment importante pour éliminer ce mucus anormal des voies respiratoires. La rhéologie est un outil de plus en plus utilisé pour le diagnostic. Une corrélation positive a été établie entre l'élasticité du mucus et la colonisation bactérienne (discrimination des infections par *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *B. cepacia/S. maltophilia*) ou les capacités respiratoires (FEV_1) [Tomaiuolo et al., 2014]. Elle permet également de tester l'efficacité des agents mucolytiques tels que la dornase alpha [Guichard et al., 2018], la N-acétyl-cystéine [Vukosavljevic et al., 2017] ou le P3001 [Ehre et al., 2019].

La compréhension des bases moléculaires qui permettent la formation d'un gel aux propriétés viscoélastiques est nécessaire pour concevoir de nouvelles thérapeutiques capables de modifier le mucus en contexte pathologique. Cependant, une fois sécrété, le mucus est soumis à des environnements variables en fonction du tissu et il apparaît maintenant de plus en plus clair que cela a un réel impact sur leurs propriétés rhéologiques. Le chapitre

qui suit a pour objectif d'en faire la synthèse.

1.2.3 Modulation de la rhéologie du mucus

1.2.3.1 Par des facteurs physico-chimiques

L'environnement physico-chimique permet la régulation fine des propriétés des gels de mucus en agissant sur la structure du réseau de mucines gélifiantes. Plusieurs facteurs physico-chimiques sont impliqués dans ce phénomène.

1.2.3.1.1 pH

Le pH est essentiel à la conformation des mucines gélifiantes dès leur stockage dans les granules de sécrétion. L'apport de protons permet de neutraliser les segments électro-négatifs des mucines gélifiantes afin de compacter leur structure sous l'effet de forces hydrophobes [Perez-Vilar et al., 2005]. Une fois les mucines sécrétées, les gels de mucus sont soumis à un spectre large de pH allant de 1,5 pour la muqueuse gastrique durant la digestion à 7,7 pour le tissu oculaire (Figure 14 A). Le rôle du pH dans la physiologie des mucines gélifiantes a été particulièrement étudié dans le cas du mucus gastrique. Au cours de la digestion, la valeur du pH de la lumière gastrique va atteindre des valeurs extrêmes. Néanmoins, l'intégrité de l'épithélium digestif est maintenue, ce qui suppose un mécanisme de protection dont le mucus est un acteur clé. Les mucines gélifiantes maintiennent un pH neutre au niveau de l'épithélium gastrique en séquestrant les protons sécrétés par les cellules pariétales des glandes fundiques dans la lumière gastrique [Li et al., 2012, Bahari et al., 1982]. De plus, des modifications des propriétés rhéologiques du mucus, lorsque le pH est inférieur à 4, le rendent plus protecteur. Ce changement de l'état sol vers un état gel est entraîné par une modification de la conformation des mucines gélifiantes (Figure 14 B). La rupture des ponts salins entre les résidus chargés des mucines

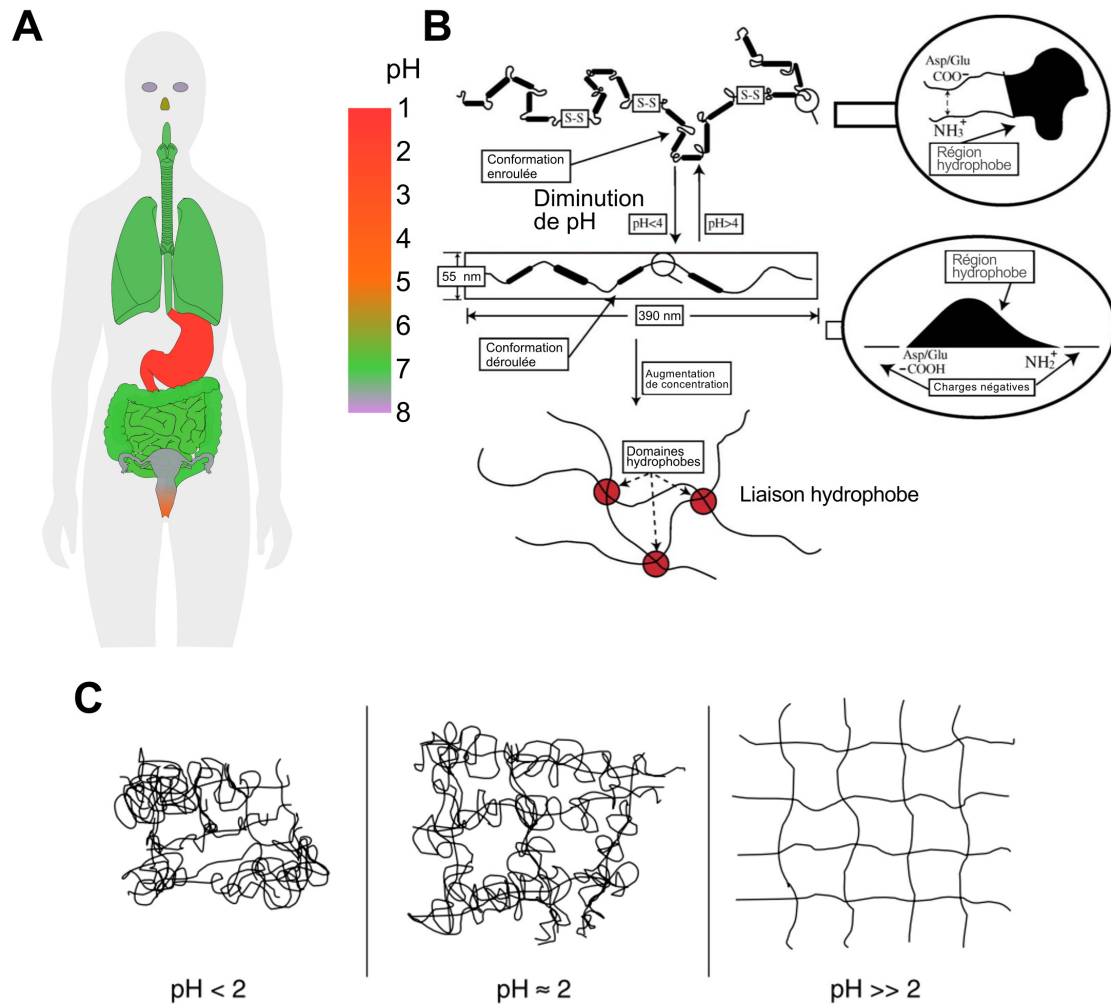


FIGURE 14 – Relation entre le pH du mucus et la conformation des mucines gélifiantes

A. Le pH du mucus des principaux tissus muco-sécrétants est indiqué par l'échelle colorimétrique. Notons que certains tissus, comme l'estomac durant la digestion, et le cervix durant le cycle ovulatoire (phase péri-ovulatoire représentée), ont des variations de pH au cours du temps. **B.** La rupture des interactions électrostatiques lorsque le pH est inférieur à 4 entraîne l'exposition de régions hydrophobes des mucines gélifiantes qui peuvent alors former des liaisons supplémentaires au sein de la matrice de mucus. Adapté de Bansil and Turner, 2006. **C.** Ces liaisons ont des conséquences sur la structure du réseau de mucus qui s'aggrave à pH acide. D'après Maleki *et coll.*, 2008.

gélifiantes expose leurs parties hydrophobes, les domaines CYS par exemple, qui sont alors disponibles pour former de nouvelles interactions si la concentration en mucines gélifiantes est suffisante [Cao et al., 1999, Celli et al., 2007, Wagner et al., 2017]. Des résultats similaires ont été obtenus en combinant des mesures de diffusion dynamique de la lumière avec la rhéologie (Rheo-SALS). Les auteurs démontrent qu'à pH 2–4, les polymères de mucines gélifiantes sont neutres et s'associent en agglomérats maintenus par des interactions hydrophobes. Cela contribue à l'anisotropie du réseau de mucines. Ce phénomène est concomitant avec le pic de viscosité mesuré (η_0 est > 100 fois supérieure à pH 2 qu'à pH 7). Un phénomène de rhéofluidification est observé à pH 1, ce qui suggère une fragmentation des cluster de mucines gélifiantes stabilisés par des protons. Ce phénomène contribue à un retour vers un état isotrope (Figure 14 C) [Maleki et al., 2008]. Ces résultats sont cohérents avec l'étude menée par Wagner *et coll.* qui emploie la micro-rhéologie par suivi de particules pour déterminer la structure du réseau de mucines gélifiantes [Wagner et al., 2017]. Contrairement au mucus reconstitué à partir de mucines gélifiantes d'estomacs de cochons, les propriétés macro et micro-rhéologiques du mucus cervico-vaginal humain semblent indépendantes du pH malgré des changements structuraux importants (Figure 8) [Wang et al., 2013, Brunelli et al., 2007]. Une des explications possibles est la conservation de l'interactome des mucines gélifiantes cervicales, ce qui souligne son rôle prépondérant dans les propriétés structuro-fonctionnelles du mucus [Demouveau et al., 2018]. Dans un modèle porcin de mucoviscidose, il a été observé que le défaut de *CFTR* cause une acidose du LPC, ce qui participe à sa viscosité élevée et à la réduction de ses propriétés microbicides [Tang et al., 2016, Pezzulo et al., 2012, Simonin et al., 2019]. Ces données sont cependant discordantes avec une étude réalisée chez l'enfant atteint de mucoviscidose où aucun changement de pH n'a été observé [Schultz et al., 2017]. Bien que les données chez l'Homme ne soient pas cohérentes, l'absence de sécrétion d'ions bicarbonates par le canal CFTR pourrait avoir un impact sur le phénotype de la mucoviscidose.

1.2.3.1.2 Environnement ionique

1.2.3.1.2.1 Osmolarité

L'osmolarité contribue à la viscoélasticité des gels de mucus en modifiant la charge des mucines gélifiantes, particulièrement dans la région centrale contenant les *O*-glycannes [Davies et al., 2016]. Cela entraîne des changements de conformation du réseau de mucines gélifiantes. Expérimentalement, une augmentation du module osmotique, par ajout de sel (NaCl), neutralise les mucines gélifiantes, ce qui réduit les répulsions électrostatiques et augmente la durée de vie des autres types d'interactions faibles comme les forces hydrophobes ou les liaisons hydrogène. Cela produit un gel plus enchevêtré et donc plus viscoélastique [Wagner et al., 2017]. D'autres travaux ont montré qu'au contraire, une augmentation du module osmotique réduit la viscoélasticité du gel par diminution de la stabilité des liaisons ioniques entre les mucines gélifiantes. Ce phénomène a pour conséquence de réduire la densité des interactions mucine/mucine [Celli et al., 2007, McCullagh et al., 1995]. Ces discordances peuvent être expliquées par les concentrations de mucines gélifiantes utilisées, qui forment des gels aux propriétés structurales différentes (voir 1.2.3.2.1). L'augmentation du module osmotique du mucus a un réel intérêt thérapeutique dans le cas de la mucoviscidose. Au delà du rôle du module osmotique sur l'interactome des mucines gélifiantes, l'utilisation d'une solution hypertonique engendre des mouvements d'eau qui diminuent la concentration des mucines gélifiantes, et donc la viscoélasticité du gel de mucus. Cette stratégie est encore couramment utilisée pour traiter les patients atteints de mucoviscidose [Donaldson et al., 2006].

1.2.3.1.2.2 Cas des ions calcium

Le calcium est étroitement lié à la structure et aux fonctions des mucines gélifiantes. L'environnement physico-chimique du granule de sécrétion est riche en ions calcium

(> 10 mM [Verdugo, 2012]). La présence d'ions calcium permet la compaction de la région amino-terminale de MUC5B [Trillo-Muyo et al., 2018, Ridley et al., 2014]. À des concentrations physiologiques de mucines gélifiantes, les ions Ca^{2+} modulent le caractère élastique du mucus en participant à la formation d'un réseau protéique enchevêtré. Ces associations mucine/mucine dépendent de protéines partenaires capables de lier le calcium [Meldrum et al., 2018, Raynal et al., 2002]. Dans le cas de la salive, le mucus passe d'une maille caractéristique de 130 nm en présence de calcium à 2600 nm si celui-ci est chélaté, ce qui illustre l'importance de cet ion dans l'interactome des mucines gélifiantes [Raynal et al., 2003]. La concentration calcique est également corrélée à la viscosité du LPC dans un modèle porcin de mucoviscidose [Tang et al., 2016]. Par conséquent, la chélation des ions calcium est une piste thérapeutique intéressante pour restaurer le renouvellement du mucus. Un effet synergique avec l'utilisation de solutions hypertoniques a même été mis en évidence dans un modèle murin de mucoviscidose [Ermund et al., 2015].

1.2.3.1.3 Oxydation

Une dérégulation de la balance oxydation/réduction du mucus peut modifier la structure du réseau de mucines gélifiantes. Les régions amino- et carboxy-terminales, ainsi que les domaines CYS, sont des domaines exposés et riches en résidus cystéine, lysine, arginine et tyrosine qui, dans un environnement oxydant, peuvent être le support de liaisons inter-mucines. Dans certaines pathologies respiratoires comme la mucoviscidose [Yuan et al., 2015] ou l'asthme [Dunican et al., 2018], la sécrétion accrue de myéloperoxydase transforme le peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux qui catalyse l'oxydation des résidus cystéine entre eux pour former des ponts disulfure ou avec des résidus lysine ou arginine pour former des liaisons sulfénamide (-S-NH-), sulfonamide (-SO₂-NH-) ou sulfinamide (-SO-NH-) [Perez-Vilar and Boucher, 2004]. L'oxydation de résidus tyrosines situés dans un environnement suffisamment proche peut former des liaisons dity-

rosines. Dans le cas de la mucoviscidose, il a été montré que le stress oxydant chronique, engendré par des niveaux réduits de glutathion (un agent anti-oxydant) et une activité myéloperoxydase élevée, aboutit à la formation de liaisons disulfure et dityrosine *de novo* qui entraînent une augmentation significative de la viscoélasticité du mucus [Dickerhof et al., 2017, Yuan et al., 2015]. Pour palier ce problème, l'utilisation d'anti-oxydants comme la N-acétyl-cystéine est une pratique courante qui permet de diminuer la viscoélasticité des gels de mucus (voir 1.2.3.2.3).

1.2.3.2 Par des facteurs biologiques, pharmacologiques et environnementaux

1.2.3.2.1 Concentration des mucines

L'étude de la diffusion de particules de 500 nm a permis à Georgiades *et coll.* d'établir le lien existant entre la concentration de mucines gélifiantes et les propriétés viscoélastiques des gels de mucus. Il existe deux concentrations critiques de mucines gélifiantes, la première, notée c^* , est la concentration à partir de laquelle il y a chevauchement entre les mucines gélifiantes. La seconde, notée c^e , est définie comme la concentration d'enchevêtrement (voir Figure 15) [Georgiades et al., 2014]. À des concentrations comprises entre c^* et c^e , la viscosité des gels de mucus suit la loi de Fuoss ($\eta \simeq c^{0,53}$), ce qui est compatible avec un régime semi-dilué de polymères polyelectrolytiques flexibles [Dobrynin et al., 1995]. Au delà de la concentration c^e , il y a une augmentation de la relation de puissance qui lie la viscosité et la concentration des mucines gélifiantes ($\eta \simeq c^{5,10}$ et $\eta \simeq c^{3,91}$ pour des gels constitués respectivement de MUC2 et MUC5AC). Cela indique un phénomène de reptation de l'apomucine et des *O*-glycannes qu'elle porte. La viscosité du mucus reconstitué à partir de la fraction organique totale est systématiquement supérieure à celle de solution de mucines gélifiantes purifiées. Cela confirme un rôle important des protéines partenaires dans la rhéologie des gels de mucus. Une transition sol-gel s'opère

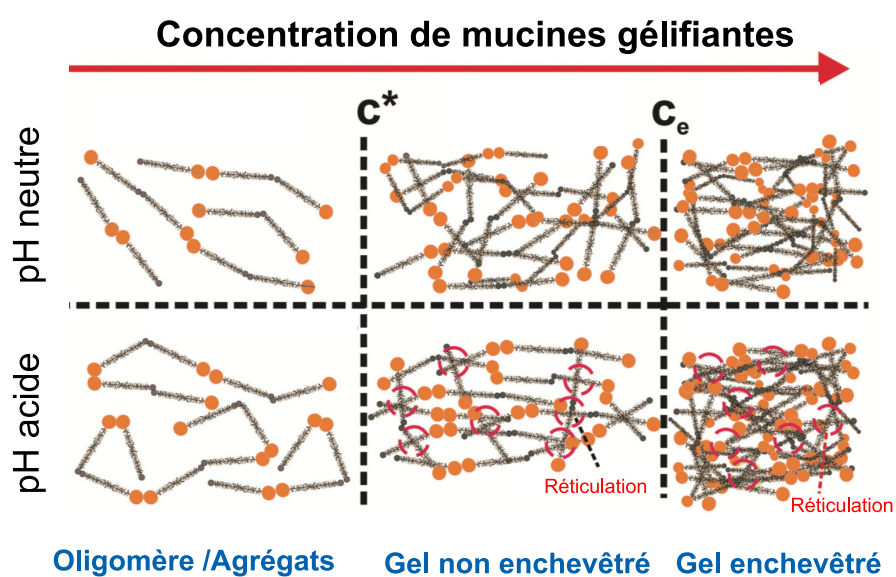


FIGURE 15 – Impact de la concentration des mucines gélifiantes sur l’ultra-structure du mucus

À des concentrations inférieures à c^* , les mucines gélifiantes sont présentes sous forme d’oligomères. Elles forment un gel non enchevêtré entre c^* et c^e tandis qu’elles s’associent en un réseau enchevêtré à des concentrations supérieures à c^e . Une diminution du pH augmente la réticulation du gel. D’après Georgiades *et coll.*, 2014.

pour des concentrations de mucus supérieures à 4 %. Cette concentration est inférieure à celle observée dans des situations pathologiques comme la mucoviscidose, expliquant pourquoi le mucus de ces patients est difficilement éliminé par la clairance mucociliaire [Hill et al., 2014, Meldrum et al., 2018]. Cette hyper-concentration de mucines gélifiantes est antérieure à la survenue d'épisodes infectieux montrant la prévalence des anomalies mucosales dans l'étiologie de la mucoviscidose [Esther et al., 2019]. La relation entre la concentration de mucines gélifiantes et la viscosité des gels de mucus semble également être dépendante du type de mucine gélifiante. Cela pourrait expliquer qu'une hyper-concentration de MUC5B est plus délétère que MUC5AC dans des modèles murins transgéniques reproduisant le phénotype pulmonaire des BPCO [Livraghi-Butrico et al., 2017]. Néanmoins, une meilleure compréhension de la régulation génétique des mucines gélifiantes est nécessaire afin de proposer des solutions thérapeutiques ciblant leur expression.

1.2.3.2.2 Cycle hormonal

Le cervix est un canal de 3 à 4 cm de longueur constitué d'invaginations qui forment des pseudo-glandes. Les changements structuraux et cycliques du mucus cervical suggèrent un mécanisme de régulation hormonale [Chrétien, 2003]. La composition du mucus cervical est soumise à des variations qui dépendent de la phase du cycle ovulatoire (d'après des études par spectrométrie de masse (43 à 81 protéines sont spécifiquement exprimées durant une phase du cycle ovulatoire) [Grande et al., 2015]. La mucine gélifiante MUC5B est à son niveau de production maximum durant l'ovulation. Ce pic de sécrétion est induit par une augmentation progressive de la transcription de *MUC5B* durant la phase pré-ovulatoire [Gipson et al., 2001]. L'expression hormone-dépendante des mucines est concomitante avec une diminution du contenu protéique et une augmentation du contenu en eau au pic ovulatoire. Cela entraîne donc une dilution du contenu en mucines gélifiantes qui, comme décrit au 1.2.3.2.1, diminue la viscosité du gel de

mucus [Viergiver and Pommerenke, 1946]. Ce critère conditionne le passage des spermatozoïdes au travers de la glaire cervicale, et a donc un réel impact sur la fertilité humaine [Hyun et al., 2012]. Des modifications de l'interactome des mucines gélifiantes sont donc tout à fait pertinentes pour développer de nouvelles stratégies contraceptives non-hormonales [Kootala et al., 2018].

1.2.3.2.3 Agents mucolytiques

Une substance mucolytique est un agent pharmacologique capable de fluidifier le mucus et donc de diminuer sa viscoélasticité. Cette classe de médicament est fréquemment utilisée dans les pathologies chroniques (mucoviscidose, BPCO) ou dans des contextes plus bénins (rhume, toux). À l'heure actuelle, les agents mucolytiques agissent en clivant les polymères qui constituent le mucus [Henke and Ratjen, 2007].

Le mucolytique le plus utilisé est la N-acétylcystéine. Cette molécule possède un groupement thiol libre qui se substitue aux groupements thiol des mucines gélifiantes engagés dans la formation de ponts disulfure, ce qui lui confère une activité réductrice. De plus, la N-acétylcystéine a une activité anti-oxydante en piégeant les agents oxydants comme le monoxyde d'azote et en entrant dans la voie de biosynthèse du glutathion [Aldini et al., 2018]. Il en résulte une dépolymérisation des mucines gélifiantes couplée à une réduction du stress oxydant, tout deux permettant la réduction de la viscoélasticité du gel de mucus [Vukosavljevic et al., 2017]. D'autres mucolytiques dérivés de la structure de la N-acétylcystéine ont été développés et montrent une activité mucolytique renforcée et aux effets irritants indésirables plus faibles [Ehre et al., 2019].

L'ADN contribue de manière substantielle à la viscoélasticité du mucus. Ces polymères d'ADN s'enchevêtrent avec les mucines gélifiantes et contribuent aux propriétés rhéolo-

giques anormales du mucus purulent [Lethem et al., 1990, Macierzanka et al., 2014]. La dornase alpha est une désoxyribonucléase similaire à l'enzyme endogène humaine. Elle est obtenue par génie génétique et est administrée aux patients par aérosolthérapie afin de diminuer la taille des fragments d'ADN. Cela provoque une diminution de la viscoélasticité des gels de mucus [Hardcastle et al., 2017]. L'activité désoxyribonucléase peut être prolongée (d'un facteur 20) en greffant une double chaîne de PEG sur la structure de l'enzyme [Guichard et al., 2018]. La formation de larges fibres d'ADN semble être dépendante de la présence d'actine fibrillaire (actine-F) [Sheils et al., 1996].

Un état inflammatoire chronique entraîne également une augmentation de la concentration en actine-F dans le mucus suite à la nécrose des tissus et à la mort des cellules inflammatoires. La gelsoline est une molécule qui clive l'actine-F permettant ainsi de réduire la viscosité de crachats de patients atteints de mucoviscidose [Vasconcellos et al., 1994]. Cependant, la présence d'actine-F semble réduire l'activité de la N-acétylcystéine probablement en entrant en compétition avec les mucines gélifiantes pour la réduction des ponts disulfure [Broughton-Head et al., 2007, Tang et al., 1999].

1.2.3.2.4 Exposome

L'exposome est défini comme l'ensemble des paramètres environnementaux auxquels un organisme est soumis. Un nombre croissant d'études met en évidence un effet de composés chimiques et alimentaires sur la structure et les propriétés viscoélastiques du mucus. Comme décrit en 1.1.2.1.2, les lipides sont impliqués dans le comportement viscoélastique du mucus. Une supplémentation en lipides alimentaires réduit la diffusivité de particules de 200 nm d'un facteur 10 à 142 en fonction de leur chimie de surface [Yildiz et al., 2015c]. De plus, l'élimination des lipides du mucus aboutit à la perte de son caractère non-Newtonien [Gouveia and Tiffany, 2005]. Les détergents alimentaires (em-

ployés comme agents émulsifiants par l'industrie agroalimentaire) réduisent la maille caractéristique du mucus intestinal de cochon qui passe de 109 nm à 59 nm lorsqu'il est traité par 1 % de carboxyméthylcellulose et de 109 nm à 88 nm lorsqu'il est traité par 1 % Tween 80 [Lock et al., 2018]. Ces modifications augmentent le module viscoélastique du mucus intestinal mesuré par suivi de particules (diamètre 200 nm) couplées au PEG. Le détergent nonoxynol-9 (N9) est fréquemment employé comme agent bactéricide et spermicide dans la fabrication de lubrifiants et préservatifs. Le N9 modifie la structure du réseau de mucines gélifiantes en réduisant la maille caractéristique du mucus par rupture des mucines gélifiantes en paquet. Ce changement de structure du mucus n'a cependant aucune incidence sur les propriétés macro-rhéologiques du gel [Lai et al., 2009a]. Tous les détergents n'ont pas le même effet sur la structure du mucus cervico-vaginal, car l'utilisation du F127 ne modifie pas les propriétés d'adhésivité ou de structure du mucus mais permet le passage de nanoparticules hydrophobes normalement entravées par le mucus. Ce type de détergent est donc potentiellement intéressant dans la formulation de nanoparticules hydrophobes en nanomédecine [Ensign et al., 2014]. Les polyphénols contenus dans le thé vert induisent une agrégation des polymères de MUC5B contenus dans la salive, ce qui provoque une augmentation significative de la viscosité du gel [Davies et al., 2014]. Certains additifs alimentaires, comme l'oxyde de titane, s'associent spécifiquement avec le mucus et pourraient donc potentiellement modifier la comportement rhéologique du gel [Talbot et al., 2018].

1.2.3.2.5 Domaine CYS

1.2.3.2.5.1 Structure

— Séquences primaire et secondaire

Chez l'Homme, les mucines MUC2, MUC5AC et MUC5B possèdent respective-

ment 2, 9 et 7 domaines CYS (Figure 3). Le domaine CYS est un domaine de $\simeq 110$ acides aminés contenant environ 10 % de résidus cystéine aux positions parfaitement conservées [Desseyn et al., 1997]. Le domaine CYS, sous forme native, a une diminution de la vitesse de migration en comparaison avec sa forme réduite. Cela suggère que la structure tertiaire du domaine CYS est globulaire, probablement maintenue par des ponts disulfure entre les résidus cystéine. Une structure du second domaine CYS recombinant de MUC2, produit par la lignée cellulaire CHO, a été déterminée par spectrométrie de masse. La présence de ponts disulfure a été démontrée entre les résidus Cys¹ et Cys⁵, Cys³² et Cys⁴² et Cys⁶¹ et Cys⁶⁹ (voir Figure 16). Les quatre résidus cystéine restants (Cys⁸⁵, Cys⁹⁴, Cys⁹⁵ et Cys⁹⁷) forment des ponts disulfure dont le profil exact n'a pas pu être déterminé. Le pont disulfure Cys⁶¹-Cys⁶⁹ pourrait avoir une fonction clé dans l'interactome du mucus intestinal en créant une boucle hydrophobe (CDVSVGLIC). L'analyse des séquences des domaines CYS humains révèle que 37,6 % des acides aminés sont hydrophobes et très conservés dans toutes les mucines gélifiantes (voir Tableau 3, Figure 16 A).

Environ un quart des acides aminés (24,6 %) sont chargés, ce qui n'exclut pas un rôle du domaine CYS dans l'enchevêtrement des mucines gélifiantes par établissement d'interactions ioniques, notamment avec les glycanes anioniques. Les acides aminés chargés sont cependant moins conservés que les acides aminés hydrophobes (Figure 16 B). Les propriétés physico-chimiques des domaines CYS semblent différentes en fonction des mucines gélifiantes. En effet, les domaines CYS de MUC5AC ont une moins grande proportion d'acides aminés hydrophobes mais un plus grand nombre d'acides aminés chargés en comparaison avec MUC2 et MUC5B. Hypothétiquement, le recouvrement des fibres de MUC5B, sécrétées par les glandes sous-

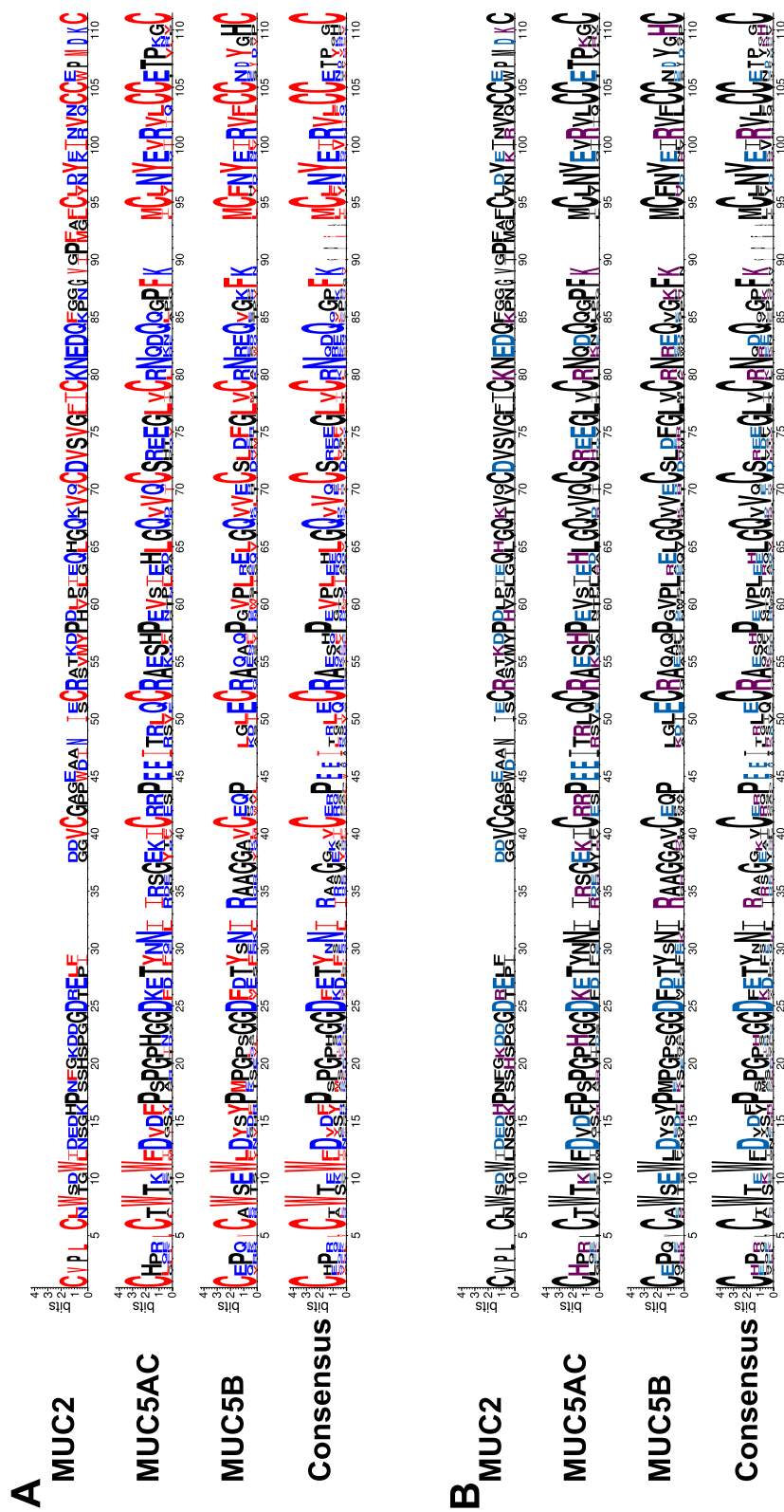


FIGURE 16 – Propriétés physico-chimiques des séquences primaires des domaines CYS humains
 Séquences consensus des domaines CYS de MUC2, MUC5AC, MUC5B et de l'ensemble des domaines CYS des mucines géli-fiantes humaines. **A.** Les acides aminés (aa) hydrophobes et hydrophiles sont respectivement représentés en rouge et en bleu. **B.** Les aa chargés négativement et positivement sont respectivement représentés en bleu et en violet. Représentations graphiques obtenues avec l'application Weblogo v3 (www.weblogo.threeplusone.com).

muqueuses des voies aériennes, par des polymères de MUC5AC pourrait faciliter la clairance mucociliaire en diminuant l'adhérence de ces fibres de mucus par augmentation de leur hydrophilicité [Ermund et al., 2017, Ostedgaard et al., 2017].

Tableau 3 – Analyse des séquences des domaines CYS humains

Acides aminés hydrophobes : Tyr, Val, Met, Cys, Leu, Phe, Ile, Trp; Acides aminés hydrophiles : Arg, Lys, Asp, Glu, Asn, Gln; Acides aminés positifs : Lys, His, Arg; Acides aminés négatifs : Asp, Glu. Les séquences des domaines CYS sont tirées de Desseyne, 2009.

Domaine CYS	aa hydrophobes (%)	aa hydrophiles (%)	aa cationiques (%)	aa anioniques (%)
MUC2 #1	36,3	36,3	11,7	19,2
MUC2 #2	41,4	25,7	6,1	10,3
MUC2	38,9	31,0	8,9	14,8
MUC5AC #1	33,3	32,4	13,1	12,2
MUC5AC #2	38,7	31,6	6,0	13,8
MUC5AC #3	33,5	37,1	18,1	13,3
MUC5AC #4	38,7	31,6	6,0	13,8
MUC5AC #5	33,5	36,2	17,2	13,3
MUC5AC #6	34,3	37,2	9,2	14,3
MUC5AC #7	33,5	37,1	18,1	13,3
MUC5AC #8	33,5	37,2	17,2	14,3
MUC5AC #9	34,4	37,2	16,2	14,3
MUC5AC	34,8	35,3	13,5	13,6
MUC5B #1	39,0	34,0	11,0	14,0
MUC5B #2	37,8	37,7	14,0	15,8
MUC5B #3	37,1	33,3	8,8	15,7
MUC5B #4	39,7	29,7	8,9	11,9
MUC5B #5	39,7	29,7	8,9	11,9
MUC5B #6	39,7	29,7	8,9	11,9
MUC5B #7	39,7	28,8	8,0	11,9
MUC5B	39,0	31,8	9,8	13,3

— Glycosylation

Les domaines CYS sont décrits comme des domaines pas ou peu glycosylés. Des résidus sérine et thréonine sont présents dans toutes les séquences des domaines CYS humains. Cependant, l'analyse des profils électrophorétiques de domaines CYS recombinants (domaines CYS #1 et #5 de MUC5AC et #1, #2 et #3 de MUC5B) est compatible avec l'absence de *O*-glycannes [Perez-Vilar et al., 2004].

Parmi les domaines CYS des mucines gélifiantes humaines, seuls le domaine CYS #2 de MUC2 et le domaine CYS #2 de MUC5B sont *N*-glycosylables (ils possèdent respectivement 2 et 1 sites de *N*-glycosylation). Cependant, les formes *N*-glycosylées apparaissent beaucoup moins abondantes que les formes non *N*-glycosylées.

Le domaine CYS est un domaine *C*-mannosylable [Gouyer et al., 2018]. La séquence de *C*-mannosylation W–X–X–W est conservée dans tous les domaines CYS et est très similaire à la séquence consensus de la *C*-mannosylation de la RNaseII (TWAQWFET pour la RNaseII, TWTTWFDV pour le domaine CYS #5 de MUC5AC). Cela suggère que la fonction de la séquence W–X–X–W des domaines CYS est identique à celle de la RNaseII, c'est-à-dire de porter un *C*-mannose [Löffler et al., 1996]. À l'heure actuelle, aucune étude n'a pu mettre en évidence avec certitude la *C*-mannosylation des domaines CYS car leur proximité avec les régions S/T/P dans les mucines gélifiantes, de même que la présence d'un unique résidu mannose rend l'analyse des spectres de masse difficile. Perez-Vilar *et coll.* ont utilisé des lectines spécifiques reconnaissant les mannoses terminaux pour purifier des domaines CYS produits, non *N*- ou *O*-glycosylés, par la lignée cellulaire COS-7 [Perez-Vilar et al., 2004]. La mutation de la séquence W–X–X–W en A–X–X–W abolit toute sécrétion du domaine CYS et provoque sa rétention dans le RE [Perez-Vilar et al., 2004, Gouyer et al., 2018]. La plupart des protéines *C*-mannosylables sont des protéines sécrétées [Krieg et al., 1998b]. Ces éléments suggèrent que les domaines CYS sont effectivement *C*-mannosylés et que cette glycosylation est impliquée dans la conformation et/ou la sécrétion des protéines chez les mammifères [Hilton et al., 1996].

1.2.3.2.5.2 Phylogénie et conservation

On trouve des domaines CYS dans de nombreuses molécules produites par une grande variété d'espèces (voir Tableau 4) depuis les échinodermes (apparus il y a 650 millions d'années) jusqu'aux mammifères supérieurs. Certaines protéines d'invertébrés comportent

Tableau 4 – Exemples de mucines avec des domaines CYS dans le règne animal
La double barre horizontale marque la séparation entre le sous-embranchement des vertébrés et des invertébrés, ce qui illustre la conservation importante du domaine CYS. D'après Desseyn, 2009.

Super-classe	Organisme	Gène	Nombre de domaines CYS	Nombre de résidus cystéine
Mammifères	<i>Homo sapiens</i>	<i>MUC2</i>	2	10
		<i>MUC5AC</i>	9	10
		<i>MUC5B</i>	7	10
	<i>Mus musculus</i>	<i>Muc5b</i>	10	10
Oiseaux	<i>Gallus gallus</i>	GG-A	3	10
		GG-B	6	10
		GG-C	2	10
Amphibiens	<i>Xenopus tropicalis</i>	183-A	2	10
		183-B	3	10
		183-C	3	10
		216-A	3	10
		306-A	3	10
Poissons	<i>Danio rerio</i>	DR1	25	10
		DR2	10	10
	<i>Petromyzon marinus</i>	16521	2	8-11
		22179	3	6-7
		443	18	8
		5720	3	7
Tuniciers	<i>Oikopleura dioica</i>	Oikosine 1	13	6
	<i>Ciona savignyi</i>	CS	4	6
Echinodermes	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	SU	24	10

des domaines CYS moins conservés, ce qui implique une apparition précoce au cours de l'évolution. Le tunicier *Oikopleura dioica* sécrète l'oikosine 1, une protéine constituée d'une répétition de 13 domaines CYS, qui participe à la formation d'une cupule gélatineuse qui filtre les nutriments de l'eau de mer [Spada et al., 2001]. Les molécules possédant des domaines CYS comportent, à l'exception de l'oikosine 1, des domaines S/T/P, ce qui permet de conclure qu'elles sont apparentées à des mucines gélifiantes. Chez les vertébrés, les domaines CYS sont codés par un unique exon (hormis chez *P. marinus* qui possède certains gènes codant des domaines CYS sur plusieurs exons). Les domaines CYS codés

par plusieurs exons sont systématiquement suivis de séquences codant des résidus sérine, thréonine et proline. L'évolution a donc favorisé l'augmentation du nombre de domaines CYS par des duplications intragéniques successives ainsi que leur groupement en un seul exon, probablement pour préserver les ressources énergétiques de la cellule durant la transcription. Chez les craniates, il semble qu'il y ait une co-évolution entre les domaines vWD et les domaines CYS, car seules les mucines possédant des domaines vWD ont des domaines CYS (voir Figure 4). Il existe une corrélation positive entre le nombre de domaines CYS et la similarité de leurs séquences (la similarité de séquence est comprise entre 93 et 100 % pour les domaines CYS de *S. purpuratus* et varie entre 40 et 70 % pour les autres gènes de vertébrés). L'analyse de la séquence des domaines CYS révèle un taux de substitution nucléotidique faible ($\leq 0,05$) et une prévalence des substitutions synonymes. Cela révèle que l'augmentation du nombre de domaines CYS est bénéfique pour la physiologie du mucus et que toute substitution de la séquence peptidique du domaine CYS aurait des conséquences délétères. Il est également probable que les événements de divergence soient récents. La fréquence de substitution synonyme des codons codant les résidus cystéine, codés par les codons TGC et TGT, est particulièrement élevée. Ce phénomène couplé aux différences de fréquence observées entre les codons TGC et TGT d'un orthologue à l'autre permet de conclure à un phénomène d'homogénéisation des codons Cys au sein d'un même gène d'une espèce donnée, et donc à une évolution concertée des domaines CYS [Desseyn, 2009]. La pression de sélection exercée sur le domaine CYS implique une fonction biologique importante qui, pour l'heure, reste peu documentée.

1.2.3.2.5.3 Fonctions

Les domaines CYS pourraient être impliqués dans la compaction des mucines gélifiantes dans le granule de sécrétion riche en ions Ca^{2+} et au pH acide [Desseyn et al., 1997]. Par analogie avec la région amino-terminale de MUC5B, ce phénomène pourrait être dé-

pendant de la liaison d'ions Ca^{2+} , notamment sur les acides aminés anioniques conservés (Figure 16 B, positions 13, 25, 27, 45 et 46). Dans ce cas, le pH acide aurait un effet synergique en neutralisant les glycanes environnants des régions S/T/P pour faciliter ces interactions. Cette transition d'une conformation en fibre vers une conformation condensée à pH inférieur à 6 (le pH du granule est de 5,5 environ) a déjà été observée par microscopie à force atomique avec des mucines gélifiantes purifiées ou non [Hong et al., 2005, Brunelli et al., 2007]. Toutefois, l'implication du domaine CYS dans ce phénomène reste hypothétique. La conservation des résidus cystéine permet d'envisager une implication de la structure secondaire du domaine CYS dans la formation de multimères non covalents [Ambort et al., 2011]. Ces associations ont été confirmées en utilisant des domaines CYS recombinants produits par la lignée cellulaire COS7 [Perez-Vilar et al., 2004]. Le domaine CYS pourrait donc agir comme modulateur de la structure du réseau de mucines gélifiantes en formant des liaisons réversibles homotypiques et/ou hétérotypiques avec d'autres composants hydrophobes du mucus, et donc, contribuer aux propriétés viscoélastiques de ces gels [Brunelli et al., 2007, Cao et al., 1999, Hong et al., 2005, Bansil and Turner, 2006].

1.2.3.2.5.4 Modèle Transgénique 222

— Création

Chez les mammifères, les domaines CYS sont presque toujours séparés par des domaines S/T/P. Sheehan *et coll.* ont observé en 1991 que des domaines nus des mucines gélifiantes sont exposés à intervalles réguliers de 100–150 nm, ce qui correspond à 250–375 aa environ [Sheehan et al., 1991]. Cette distance est compatible avec l'intervalle existant entre certains domaines CYS de MUC5B. Cette distance minimale est probablement nécessaire à l'établissement de liaisons entre les polymères de mucines gélifiantes. Pour renforcer la barrière de mu-

cus colique par densification de la matrice de mucus, le modèle murin transgénique 222 (Tg222) a été créé pour produire une molécule constituée d'une succession de 12 domaines CYS identiques (rCYS×12). Ce domaine est le 4^{ème} domaine CYS de MUC5B [Gouyer et al., 2015]. Cette molécule possède une grande similitude avec l'oikosine 1, une molécule synthétisée par le tunicier *Oikopleura dioica* et qui comporte 13 domaines CYS (Figure 17). L'expression de rCYS×12 est contrôlée par le promoteur du gène *Tff3*. Cela permet de restreindre le territoire d'expression du transgène aux cellules caliciformes de l'intestin grêle et du côlon et d'avoir une co-sécrétion de rCYS×12 avec la mucine gélifiante Muc2 [Podolsky et al., 1993, Suemori et al., 1991]. Le promoteur de rCYS×12 est suivi du premier intron, des 2 premiers exons et de la partie 5' de l'intron 2 (1,8 kb) du gène *Tff3* qui codent le signal de sécrétion. Le troisième exon est un fragment génomique codant rCYS×12. Une séquence codante de la eGFP a été ajoutée dans le cadre de lecture et à la suite de rCYS×12 afin de permettre sa visualisation par microscopie à fluorescence (Figure 18 A, B). L'objectif de ce modèle était donc d'évaluer l'effet d'un enrichissement du mucus par des domaines CYS sur les propriétés de barrière du mucus colique. Pour cela le mucus colique de souris transgéniques a été comparé à celui de souris de type sauvage du même sexe, de la même portée et élevées dans la même cage.

— Résultats acquis

La caractérisation de la souris transgénique Tg222 a fait l'objet d'une étude antérieure à mon travail de thèse [Gouyer et al., 2015]. Les souris transgéniques sont fertiles et transmettent le transgène à leur descendance sans phénotype délétère. La protéine rCYS×12 est présente de manière diffuse avec Muc2 (Figure 18 B) visualisé par marquage avec la lectine UEA1 (*Ulex europaeus* agglutinine I) qui reconnaît

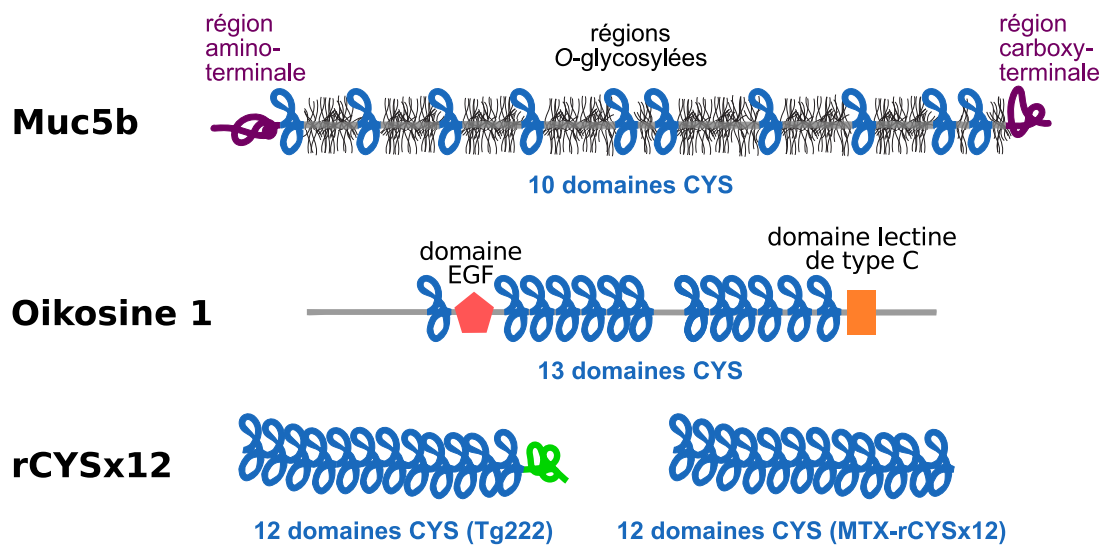


FIGURE 17 – Similitudes structurales entre la protéine recombinante rCYS×12 et l'oikosine 1

Le domaine CYS, présent en 10 copies dans la mucine gélifiante murine Muc5b est également retrouvé, en 13 copies, dans l'oikosine 1 produite par *Oikopleura dioica*. L'oikosine1 comporte également un domaine EGF et un domaine lectine de type C, respectivement représentés par un pentagone rouge et un rectangle orange. La protéine recombinante rCYS×12 est très similaire à l'oikosine 1 car elle comporte 12 domaines CYS organisés en chapelet. Dans le modèle murin Tg222, cette protéine est marquée par une séquence de la eGFP (Tg222) contrairement au modèle cellulaire recombinant (MTX-rCYS×12).

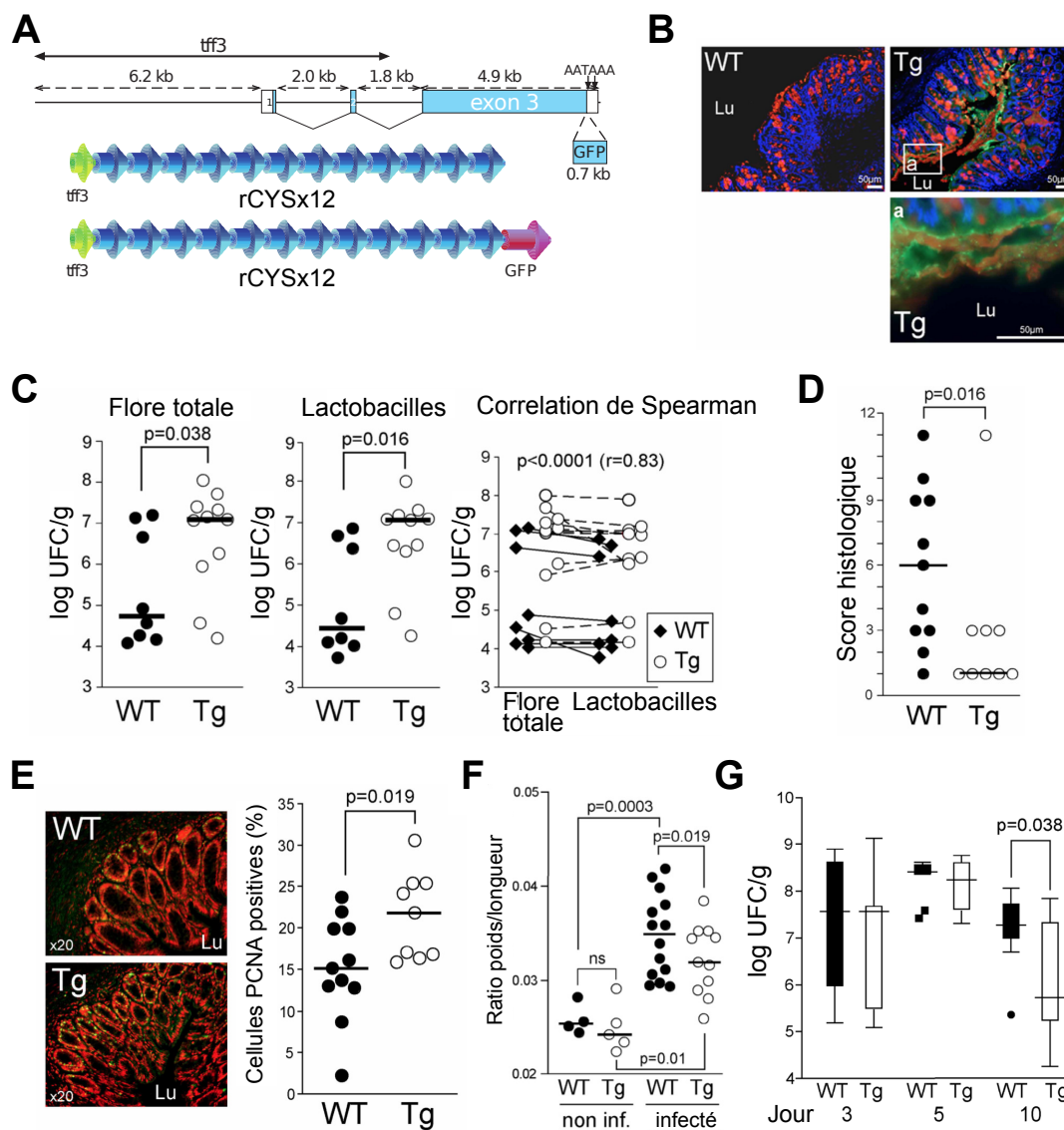


FIGURE 18 – Élaboration du modèle murin Tg222 et résultats acquis

A. Représentation schématique du fragment d'ADN utilisé pour générer le modèle murin transgénique Tg222. Ce fragment comprend le promoteur suivi des 2 premiers exons et introns du gène *Tff3*. Le troisième exon code une succession de 12 domaines CYS empruntés à la séquence du 4^{ème} domaine CYS de *MUC5B*. Une séquence codant la eGFP a été ajoutée dans le cadre de lecture de la région 3' du transgène. Les rectangles blancs représentent les régions 5' et 3'UTR. **B.** Coupes transversales de côlons de souris de type sauvage (WT) et transgéniques (Tg). La mucine Muc2 est visualisée par marquage avec la lectine UEA1 (rouge) et le transgène rCYSx12 est marqué par un anticorps anti eGFP (vert). L'ADN est contremarqué par le Hoechst 33258 (bleu). Lu : Lumière. **C.** Quantification de la flore cultivable du mucus de souris de type sauvage (WT) ($n = 8$) et transgéniques (Tg) ($n = 11$).

D. Score histologique ([Dieleman et al., 1998]) du tissu colique de souris WT ($n = 11$) et Tg ($n = 9$) après une colite chimiquement induite (DSS 2,5 % durant 5 jours), 7 jours après l'arrêt du traitement. **E.** Quantification de la réparation de l'épithélium par immunomarquage du marqueur de prolifération PCNA (vert) dans des coupes transversales de côlons de souris WT ($n = 11$) et Tg ($n = 9$). L'ADN est contre-marqué par l'iodure de propidium (rouge). Lu : Lumière. **F.** Rapport masse/longueur du côlon de souris WT ($n = 14$) et Tg ($n = 11$) 10 jours après une infection à *Citrobacter rodentium* par gavage oral. **G.** Persistance de *Citrobacter rodentium* dans les fèces de souris WT ($n = 14$) et Tg ($n = 11$) 3, 5 et 10 jours post-infection par gavage oral. D'après Gouyer *et coll.*, 2015.

spécifiquement l'épitope Fuc α -1,2-Gal. Cette technique permet de mettre en évidence un mucus mieux préservé sur les coupes histologiques provenant de souris Tg222. Cette persistance du gel indique des changements probables de ces propriétés viscoélastiques. La sédimentation de micro-billes carboxylées révèle une diminution de la perméabilité du gel de mucus chez les souris qui expriment rCYS \times 12. Afin d'évaluer la cause des modifications des propriétés biophysiques du mucus de la souris Tg222, la O-glycosylation des mucines gélifiantes coliques a été déterminée par marquage avec des lectines et par spectrométrie de masse. D'une manière générale, la souris Tg222 possède une plus grande diversité du répertoire de O-glycannes. Une augmentation de la proportion de mucines gélifiantes sialylées et une diminution des mucines gélifiantes sulfatées ont été détectées dans le tissu colique. À l'inverse, les mucines gélifiantes iléales sont moins sialylées mais plus sulfatées et fucosylées. Ces changements du profil de O-glycosylation des mucines gélifiantes chez les souris transgéniques sont associés à des modifications de la composition du microbiote dans l'iléon et le côlon. Une augmentation de la prévalence de bactéries probiotiques du genre *Lactobacillus* spp. a été mise en évidence dans ces tissus (Figure 18 C). Afin de tester l'impact bénéfique d'une augmentation de la concentration en domaines CYS dans le mucus, les souris ont été soumises à plusieurs challenges. D'une part la souris Tg222 s'est révélée mieux protégée contre

une colite chimio-induite par exposition au DSS (dextran sulfate de sodium, 2,5 %) pendant 5 jours. Le score histologique du tissu colique sept jours après arrêt du traitement DSS est significativement plus bas chez la souris transgénique (Figure 18 D) et une augmentation de la régénération du tissu colique, par mesure du marqueur de prolifération PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), a été observée dans le côlon (Figure 18 E). D'autre part la souris Tg222 est également moins susceptible à une infection expérimentale par le pathogène *Citrobacter rodentium* et a une clairance plus rapide de ce pathogène dans les fèces. Cette clairance plus rapide de *Citrobacter rodentium* est associée à un ratio masse/longueur du côlon plus faible reflétant une meilleure protection contre l'inflammation (Figure 18 F, G).

La sécrétion de rCYS×12 dans le mucus intestinal semble conférer aux souris une meilleure protection contre les infections par un renforcement de la barrière de mucus. Cependant, ces changements sont concomitants avec des modifications du profil de *O*-glycosylation des mucines gélifiantes et de la composition du microbiote. Ceci rend toute conclusion sur la mécanistique du renforcement de mucus par l'enrichissement en domaine CYS impossible. L'utilisation d'un modèle cellulaire, moins complexe et stérile, est donc nécessaire pour conclure quant à l'effet du domaine CYS sur le mucus et pour déterminer comment celui-ci peut en changer les propriétés physiologiques et biophysiques.

1.3 Stratégie de l'étude et intérêt du travail

Les domaines CYS sont apparus il y a au moins 650 millions d'années et montrent une conservation de séquence importante chez tous les organismes. Un tel degré de conser-

vation implique des propriétés biologiques importantes qui restent peu documentées à l'heure actuelle [Desseyn, 2009, Desseyn et al., 2016].

La nature hydrophobe et le nombre de résidus chargés des domaine CYS suggèrent la possibilité de liaisons de faible énergie réversibles de nature homo- ou hétérotypique. Si tel est le cas, ce domaine aurait une importance majeure dans l'architecture du mucus, et par conséquent dans le comportement rhéologique des gels.

Mon travail s'organisera en 2 axes :

— **Étude de la délivrance endogène d'une molécule constituée de 12 domaines CYS**

Le modèle murin Tg222 a été développé pour étudier l'effet d'un enrichissement du mucus intestinal par une molécule chimérique constituée de 12 domaines CYS [Gouyer et al., 2015]. Cette souris a un mucus renforcé qui a un effet protecteur contre la colite chimio-induite et les infections expérimentales à *Citrobacter rodentium*.

La première partie de mon travail consistera à déterminer par quel mécanisme la sécrétion de rCYS \times 12 aboutit au renforcement de la barrière muqueuse intestinale. Une relation étroite existe entre le microbiote intestinal et les mucines gélifiantes [Corfield, 2018]. Afin de mieux appréhender l'effet d'un enrichissement du mucus en domaine CYS, un modèle cellulaire muco-sécrétant produisant la même molécule rCYS \times 12 a été développé. Le mucus de cette lignée cellulaire a été caractérisé afin de déterminer si les changements des propriétés du mucus observés dans le modèle murin Tg222 sont reproductibles dans un environnement stérile.

— **Développement de modèles recombinants produisant une molécule constituée de 3 domaines CYS**

Dans les modèles cellulaire et murin, la sécrétion de la molécule rCYS×12 est endogène. Afin de tester le potentiel du domaine CYS comme molécule capable de modifier le mucus, une stratégie exogène est plus indiquée. L'élaboration de modèles recombinants (en levure *Pichia pastoris* et dans la lignée cellulaire HEK293) sécrétant une molécule constituée de 3 domaines CYS (rCYS×3) permettra de caractériser la structure du domaine CYS, de déterminer les facteurs qui influencent ces associations et de tester l'effet de sa délivrance exogène sur les gels de mucus.

2 Matériel et Méthodes

2.1 Biologie moléculaire

Pour plus d'informations sur le développement du modèle murin Tg222, le lecteur peut se référer à l'article du laboratoire en accès libre [Gouyer et al., 2015].

2.1.1 Génération du modèle HT29-MTX E12 sécrétant la molécule rCYS \times 12

La lignée HT29-MTX E12 (MTX) provient de la sélection clonale de cellules HT29 résistantes au méthotrexate (HT29-MTX) [Behrens et al., 2001, Lesuffleur et al., 1993]. La population cellulaire HT29 est issue d'un adénocarcinome colique. Cette lignée cellulaire commerciale, obtenue chez ECACC, est particulièrement utilisée en biologie des mucines gélifiantes, car ce clone se différencie en cellule caliciforme environ 21 jours post-confluence. Les cellules MTX ont été transfectées pour exprimer stablement la molécule rCYS \times 12 (MTX-rCYS \times 12). La séquence du transgène rCYS \times 12 consiste en une séquence nucléotidique codant 12 domaines CYS. La séquence du domaine CYS est empruntée au 4^{ème} domaine CYS de *MUC5B* reconnu par l'anticorps Eu1/Eu2. Le vecteur d'expression #208 de 18,1 kb, utilisé pour générer la souris transgénique Tg208 dans une étude antérieure du laboratoire [Gouyer et al., 2015], a été modifié comme suit pour la transfection

des cellules MTX (Figure 19) :

Un fragment *XhoI/XhoI* de 2,3 kb portant le gène de la néomycine phosphotransférase (Neo) sous contrôle du promoteur hybride LacUV5-SV40 est utilisé pour la sélection des clones cellulaires recombinants. Un fragment de 322 pb a été excisé par digestion enzymatique avec *HpaI* et *StuI* avant de religuer le vecteur. Le vecteur a été ensuite linéarisé avec *SalI* puis le fragment *XhoI/XhoI* a été sous-cloné dans le site de restriction unique *SalI* pour obtenir un vecteur de 20,2 kb. Les plasmides ayant la cassette de sélection dans le sens de lecture opposé à rCYS×12 ont été conservés. Les cellules ont été transfectées avec 60 μL d'Effectene (Qiagen) et 2 μg d'ADN linéarisé par digestion enzymatique avec *SacII*. La sélection des clones recombinants débute 48 h après la transfection en incubant les cellules avec du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contenant 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 (Sigma-Aldrich) et un mélange de Pénicilline-Streptomycine (100 U/mL ; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Gibco BRL). Sept clones résistants au G418 ont été isolés et amplifiés et la présence du transgène a été évaluée par PCR en utilisant les oligonucléotides 5'-ACCTACTCCAACATCCGTGC-3' (sens) 5'-GTAGGTGTCAAAGTCCCCGC-3' (anti-sens). L'expression du transgène a été déterminée par RT-PCR (réaction en chaîne par polymérisation après rétro-transcription de l'ARN) en utilisant les oligonucléotides 5'-GCTGCCATGGAGACCAGA-3' (sens ; situé dans l'exon #1) et 5'-TGTGGATCCCCTCCAGCTG-3' (anti-sens ; situé dans l'exon #3). La production de rCYS×12 a été évaluée par Western blot parmi les trois clones qui expriment le plus le transgène. Le clone le plus productif a été utilisé pour la suite des expériences.

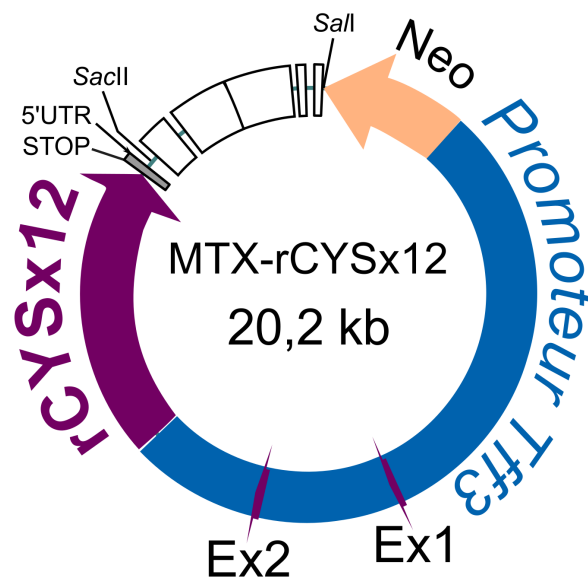


FIGURE 19 – Schéma du vecteur permettant la production de rCYS×12 par les cellules HT29-MTX E12

Le vecteur comprend le promoteur du gène *Tff3* suivi de ses deux premiers exons. Le troisième exon est un exon artificiel dont la séquence est une succession de 12 séquences codant le domaine CYS #4 de *MUC5B* (humain). Le squelette du vecteur est représenté en blanc, la cassette de sélection de la néomycine phosphotransférase, conférant la résistance au G418 aux cellules MTX, en orange, et le codon STOP suivi de la région 3'UTR en gris.

2.1.2 Génération du modèle *Pichia pastoris* sécrétant rCYS×3

2.1.2.1 Préparation du vecteur pPICZ- Δ FSS-rCYS×3

Une séquence codant une succession de 3 domaines CYS (domaine CYS #4 de *MUC5B*) optimisée pour une production par la levure *Pichia pastoris* a été insérée dans le vecteur commercial pPICZ- α (ThermoFisher Scientific). Un tag hexa-histidines, placé dans le cadre de lecture, permet de purifier la protéine recombinante produite. Ces étapes ont été effectuées par une entreprise privée. Ce vecteur est nommé pPICZ- α -rCYS×3. Les clones de *Pichia pastoris* transformés par le vecteur pPICZ- α -rCYS×3 ont des taux de sécrétion de protéine recombinante très faibles. Ce phénomène est probablement dû à la complexité de la protéine recombinante qui peut réduire les taux de sécrétion d'un facteur 40 dans le modèle *Pichia pastoris* [Maccani et al., 2014].

Notre stratégie de production de rCYS×3 a donc été modifiée afin d'abolir la sécrétion et éviter le phénomène de saturation de la machinerie intracellulaire. Le vecteur pPICZ- α -rCYS×3 a été muté afin de pouvoir exciser la majeure partie du signal de sécrétion α -FSS par digestion enzymatique (Figure 20 A). Les enzymes de restriction et les tampons utilisés proviennent de chez New England Biolabs. Un site de restriction *KpnI* est introduit par mutagenèse dirigée dans la partie 5' de la séquence codant le facteur α -FSS. Les oligonucléotides utilisés sont :

5'-GATTTCCCTTCAATTGGTACCGCTGTTTTATTTCGCAG-3' (sens)

5'-GCGAATAAAACAGCGGTACCAATTGAAGGAAATCTC-3' (anti-sens)

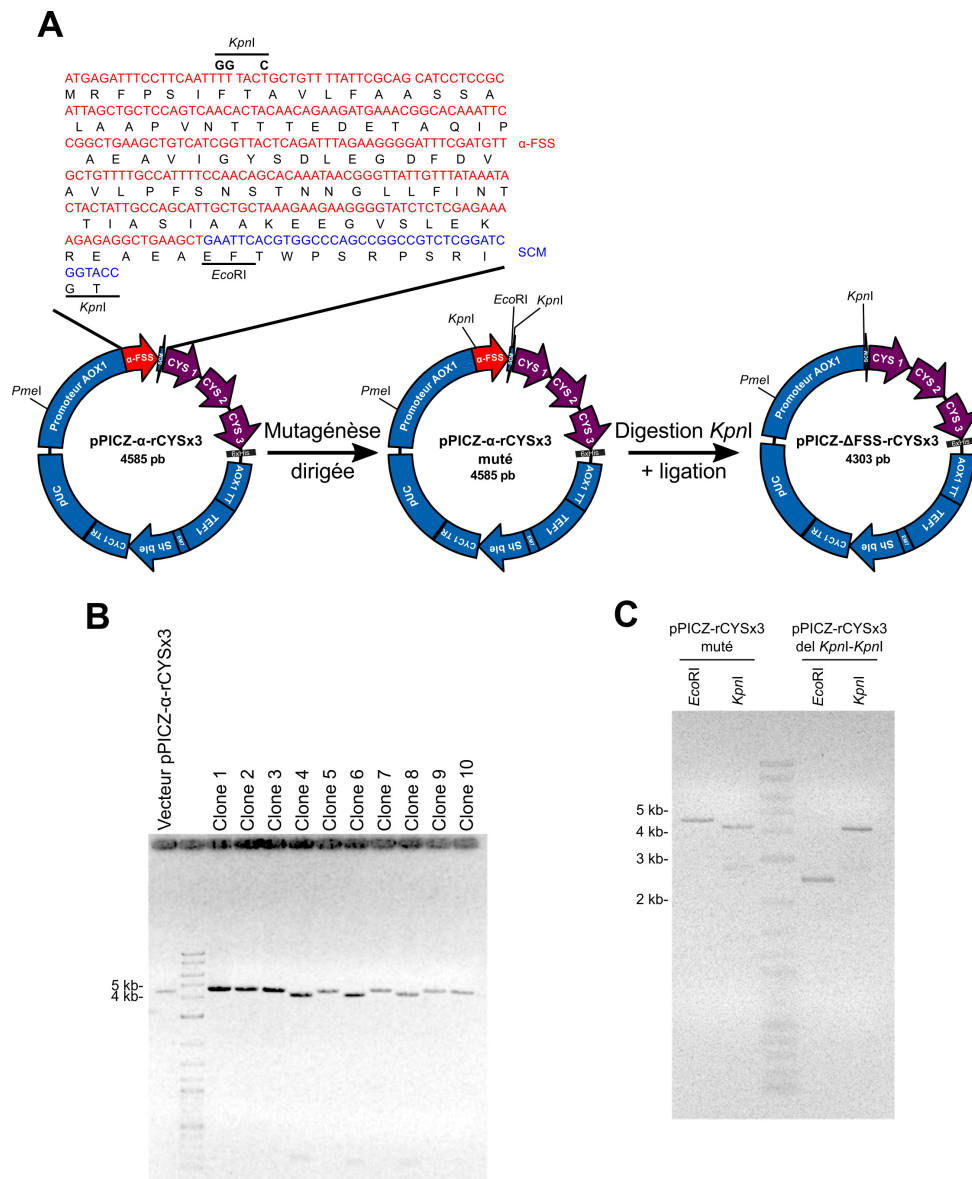


FIGURE 20 – Excision du facteur de sécrétion α -FSS du vecteur pPICZ- α -rCYS \times 3

A. Un site de restriction *KpnI* a été introduit dans la partie 5' de la séquence codant le signal de sécrétion α -FSS du vecteur pPICZ- α -rCYS \times 3 par mutagenèse dirigée. Le fragment *KpnI-KpnI* a été excisé par digestion enzymatique éliminant ainsi le site de restriction unique *EcoRI* après religation de l'ADN. Les séquences codant les domaines CYS sont représentées en violet. Une séquence codant un tag hexa-histidine, représenté par un rectangle noir, est située en aval de la séquence codant rCYS \times 3.

Les éléments présents dans le vecteur pPICZ sont représentés en bleu et le signal de sécrétion α -FSS en rouge; TEF1 et EM7 sont des promoteurs de levure et de bactérie, respectivement, *Sh ble* est le gène codant la résistance à la zéocine, pUC est l'origine de réplication bactérienne et SCM est le site de clonage multiple. La séquence peptidique du signal de sécrétion α -FSS, ainsi qu'une partie du site de clonage multiple, est indiquée sous la séquence nucléotidique. **B.** Profil électrophorétique du vecteur pPICZ- α -rCYS \times 3 muté après digestion par l'enzyme *KpnI*. L'insertion d'un second site *KpnI* par mutagenèse dirigée entraîne la perte de 282 pb comme visualisé pour les clones 4, 6 et 8. **C.** Profil électrophorétique des vecteurs pPICZ- α -FSS muté et pPICZ- Δ FSS-rCYS \times 3 après digestion par les enzymes de restriction *EcoRI* et *KpnI*. L'excision du fragment *KpnI/KpnI* entraîne la disparition du site de restriction *EcoRI*. Le vecteur pPICZ- Δ FSS-rCYS \times 3 n'est donc pas linéarisé *EcoRI* et migre à un poids moléculaire apparent inférieur à sa forme linéarisée par *KpnI*.

Le mélange réactionnel de la PCR est le suivant :

Vecteur pPICZ- α -rCYS \times 3 (71 ng/ μ L)	1 μ L
Tampon <i>Pfu</i>	5 μ L
Oligonucléotide sens (5 pmol/ μ L)	2 μ L
Oligonucléotide anti-sens (5 pmol/ μ L)	2 μ L
dNTP (20 mM)	1 μ L
<i>Pfu</i> polymérase (3000 U/mL)	1 μ L
	Qsp H ₂ O 50 μ L

Une PCR avec une ADN polymérase (*Pfu*) de haute fidélité (Qiagen) est réalisée selon le cycle suivant :

95°C	60 s	
95°C	30 s	
53°C	30 s	
72°C	720 s	25 cycles
72°C	300 s	
10°C	∞	

Le vecteur pPICZ- α -rCYS \times 3 a été digéré par l'enzyme *DpnI*, qui clive l'ADN méthylé, en suivant le mélange réactionnel suivant :

ADN amplifié	20 μ L
<i>DpnI</i> (20000 U/mL)	1 μ L
Tampon	3 μ L
Qsp H ₂ O	30 μ L
	37°C, 2 h

L'enzyme a été inactivée à 80°C pendant 20 minutes puis l'ADN plasmidique a été utilisé pour transformer des bactéries XL2[®] (*Escherichia coli*) ultra-compétentes (Stratagène). Cinquante μ L de bactéries ont été incubées avec 25 mM de β -mercaptoéthanol pendant 10 min sur de la glace. La suspension bactérienne a ensuite été incubée pendant 30 min sur de la glace avec 1 μ L de préparation de plasmide. Un choc thermique (42°C, 30 s) a été réalisé puis les bactéries ont été incubées sur de la glace pendant 2 min puis à 37°C, sous agitation à 220 rpm pendant 1 h avec 450 μ L de milieu S.O.C (Invitrogen). Cinquante et 150 μ L de suspension bactérienne ont été étalés sur des géloses LB (Luria-Bertani, Sigma-Aldrich) contenant 25 μ g/mL de zéocine (ThermoFisher Scientific) pour

la sélection positive des bactéries transformées. Les géloses ont été incubées à 37°C sur la nuit.

Dix clones ont été isolés puis ensemencés dans 5 mL de milieu LB liquide (Sigma-Aldrich) contenant 25 µg/mL de zéocine. La purification du vecteur a été réalisée grâce au kit QIAprep® Spin (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Les préparations de plasmides obtenues ont ensuite été digérées par *KpnI* selon le mélange réactionnel suivant :

ADN plasmidique	4 µL
<i>KpnI</i> (10000 U/mL)	1 µL
Tampon	2 µL
Qsp H ₂ O 20 µL	

La figure 20 B montre le profil électrophorétique des digestions d'ADN plasmidique dans un gel d'agarose 0,8 % équilibré dans un tampon TE (80 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0). Les clones 4, 6 et 8 ont été transformés par un vecteur dont la taille apparente est en accord avec la délétion des 282 pb correspondant au fragment *KpnI-KpnI*. La préparation de plasmide du clone 8 a été utilisée pour préparer le vecteur pPICZ-ΔFSS-rCYS×3 correspondant au vecteur pPICZ-α-rCYS×3 sans le fragment *KpnI-KpnI*. Un µg d'ADN a été digéré par les enzymes *KpnI* et *EcoRI* afin de sortir et cliver le fragment *KpnI-KpnI* :

ADN plasmidique (1 µg/µL)	10 µL
Tampon	2 µL
<i>KpnI</i> (10000 U/mL)	1 µL
<i>EcoRI</i> (20000 U/mL)	1 µL
Tampon	2 µL
Qsp H ₂ O 20 µL 37°C, 2 h	

Après avoir inactivé les enzymes de restriction (65°C, 20 min), l'extrémité 5' du vecteur a été phosphorylée :

ADN plasmidique (0,5 µg/µL)	10 µL
Tampon	3 µL
ATP (10 mM)	5 µL
Kinase PNK (10000 U/mL)	1 µL
Qsp H ₂ O 30 µL 37°C, 30 min	

La kinase a ensuite été inactivée (65°C, 20 min) puis le vecteur a été re-circularisé :

ADN plasmidique (17 ng/µL)	3 µL
Tampon	2 µL
Ligase T4 (400000 U/mL)	1 µL
Qsp H ₂ O 20 µL 16°C, 12 h	

Dix ng d'ADN plasmidique ont été utilisés pour transformer des bactéries XL2[®] comme décrit ci-dessus. L'ADN plasmidique du clone 8 a été digéré par les enzymes de restriction *EcoRI* et *KpnI* à 37°C pendant 12 h. La figure 20 C montre le profil électrophorétique du vecteur pPICZ- α -FSS muté et du vecteur pPICZ- Δ FSS-rCYS \times 3. La digestion du vecteur pPICZ- α -FSS muté par *EcoRI* linéarise le vecteur qui migre à une taille apparente d'environ 4,6 kb en accord avec sa taille théorique. La digestion par *KpnI* aboutit à une réduction de la taille apparente du vecteur correspondant à la délétion du fragment *KpnI-KpnI*. L'incubation du vecteur pPICZ- Δ FSS-rCYS \times 3 avec l'enzyme *EcoRI* ne linéarise pas le vecteur qui migre à une taille apparente d'environ 2,1 kb. Cela confirme l'élimination du site de restriction *EcoRI* contenu dans le fragment *KpnI-KpnI* et la re-circularisation de l'ADN plasmidique. Après digestion, seuls les 7 premiers acides aminés du facteur α -FSS subsistent. L'élimination du pré-facteur du signal de sécrétion permet d'abolir la sécrétion de la protéine située en aval [Lin-Cereghino et al., 2013]. Ce clone a été utilisé pour réaliser

une préparation de plasmide avec le kit JetStar[®] (Genomed) selon les recommandations du fabricant.

2.1.2.2 Transformation de *Pichia pastoris*

La souche X33 de *Pichia pastoris* a été transformée par la méthode du chlorure de lithium. Le vecteur (pPICZ- α -rCYS \times 3 ou pPICZ- Δ FSS-rCYS \times 3) a été préalablement linéarisé dans le promoteur *AOX1* afin de générer des clones par recombinaison homologue et non par insertion aléatoire, moins stables étant donné la nature recombinogène de *Pichia pastoris* [Aw and Polizzi, 2013]. Une colonie de levure a été inoculée dans 50 mL de milieu YPD (1 % d'extrait de levure, 2 % de peptone et 2 % de D-glucose) et a été mise en culture (30°C, 220 rpm) jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,8–1. Les levures ont été centrifugées (1500 \times *g*, 10 min) puis suspendues dans 25 mL d'eau ultrapure avant d'être de nouveau centrifugées (1500 \times *g*, 10 min). Le culot a été suspendu dans 1 mL de chlorure de lithium (100 mM) puis la suspension de levures a été transférée dans un tube 1,5 mL puis centrifugée (1500 \times *g*, 10 min). Les levures ont été suspendues dans 400 μ L de chlorure de lithium (100 mM).

Cinquante μ L de suspension de levure ont été centrifugés dans un tube 1,5 mL. Le surnageant a été éliminé puis les composés suivant sont ajoutés dans l'ordre :

- 240 μ L de PEG 3350 (50 %)
- 35 μ L de chlorure de lithium (1 M)
- 5 μ L d'ADN de sperme de saumon (10 mg/mL) dénaturé (95°C, 10 min)
- 70 μ L d'eau ultrapure contenant 10 μ g du plasmide pPICZ- Δ FSS-rCYS \times 3 ou pPICZ- α -rCYS \times 3, préalablement linéarisés dans le promoteur *AOX1* par l'enzyme *PmeI* (37°C, 2 h, puis inactivation 65°C, 20 min)

Ce mélange a été vigoureusement vortexé puis incubé 30 min à 30°C. Les levures ont été soumises à un choc thermique (42°C, 22 min) puis centrifugées 5 min à 3500 \times *g*. Le

surnageant a été remplacé par 1 mL de milieu YPD puis incubé 1 h à 30°C, 220 rpm.

2.1.2.3 Sélection des clones recombinants

La suspension de levure a été étalée (100 μ L et 25 μ L) sur des géloses YPD (milieu YPD complété avec 2 % d'agar) contenant 500, 750 ou 1000 μ g/mL de zéocine. Les géloses ont été incubées à l'abri de lumière pendant 3 jours à 30°C. Après la période d'incubation, seize clones résistants à une concentration de 1000 μ g/mL de Zéocine ont été sélectionnés, six transformés par le vecteur pPICZ- Δ FSS-rCYS \times 3 et dix transformés par le vecteur pPICZ- α -rCYS \times 3.

2.1.3 Génération du modèle cellulaire HEK293 sécrétant la molécule rCYS \times 3

L'inadéquation du modèle *Pichia pastoris* pour la production de la molécule rCYS \times 3 nous a menés à changer de modèle. La lignée cellulaire de mammifère HEK293, particulièrement adaptée pour la production de molécules recombinantes, a donc été utilisée pour produire la molécule rCYS \times 3. Une séquence nucléotidique codant trois domaines CYS successifs (domaine CYS #4 de *MUC5B*) a été optimisée pour une production en cellules HEK293, puis nous a été retournée, insérée dans le vecteur pMOS, par une entreprise privée (NeoBiotech). Notre stratégie a donc été de sous-cloner cette séquence dans le vecteur pcMG-IRES-Luc qui comporte une séquence codant la luciférase sous contrôle d'une séquence IRES qui permettra le criblage des cellules transfectées.

2.1.3.1 Préparation du vecteur pcMG-GST-rCYS \times 3-IRES-Luc

La production de la molécule rCYS \times 3 a initialement été sous-traitée par une entreprise disposant de vecteurs propriétaires destinés à la production de molécules recombinantes

par la lignée cellulaire HEK293. Les rendements étaient insuffisants et la séquence codant GST-rCYS×3 nous a été retournée sous-clonée dans le vecteur commercial pMOS Blue.

La première étape a consisté à cloner l'insert codant GST-rCYS×3 dans le vecteur pcMG-IRES-Luc pour une expression par la lignée cellulaire HEK293. Le vecteur pcMG-IRES-Luc a été obtenu en sous clonant une séquence IRES-Luc au site unique de restriction *EcoRI* du vecteur pcDNA3.1 dans lequel le promoteur CMV a été remplacé par un promoteur hybride EF1 α -HTLV (Figure 21 A) [Valque et al., 2012]. Les vecteurs pMOS-GST-rCYS×3 et pcMG-IRES-Luc ont été digérés par les enzymes de restriction *NheI* et *ClaI* pour sortir l'insert codant GST-rCYS×3 et linéariser le vecteur pcMG-IRES-Luc, respectivement.

vecteur pcMG-IRES-Luc (0,5 μ g)	2 μ L
<i>ClaI</i> (5000 U/mL)	1 μ L
<i>NheI</i> (10000 U/mL)	1 μ L
Tampon	2 μ L

Qsp H₂O 20 μ L 37°C, 2 h

Le vecteur pMOS-GST-rCYS×3 a également été digéré par *BspHI* qui clive le gène de résistance à l'ampicilline selon le mélange suivant :

vecteur pMOS-GST-rCYS×3 (1,7 μ g)	0,6 μ L
<i>ClaI</i> (5000 U/mL)	1 μ L
<i>NheI</i> (10000 U/mL)	1 μ L
<i>BspHI</i> (10000 U/mL)	1 μ L
Tampon	2 μ L

Qsp H₂O 20 μ L 37°C, 2 h

Les enzymes de restriction ont ensuite été inactivées par une incubation à 65°C pendant 20 min. La quantité d'insert à ajouter dans le mélange réactionnel pour la ligation a été

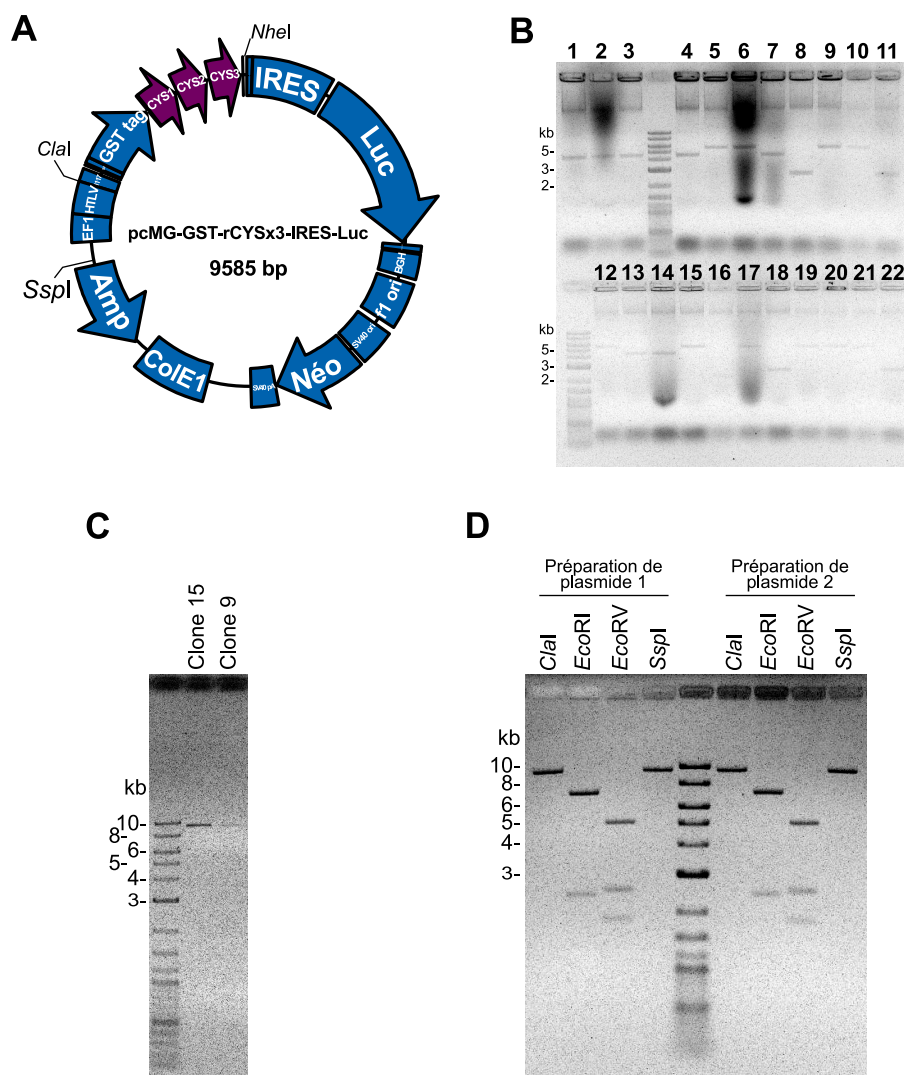


FIGURE 21 – Préparation du vecteur pcMG-GST-rCYS×3-IRES-Luc pour la transfection en cellules HEK293

A. Schéma du vecteur pcMG-GST-rCYS×3-IRES-Luc. La séquence codant rCYS×3 et les éléments du vecteur sont respectivement représentés en violet et en bleu. EF1- α est un promoteur ubiquitaire chez les eucaryotes et HTLV est une séquence générant une structure secondaire en épingle à cheveux qui stabilise la région 5' de l'ARNm. Un intron de 117 pb se situe en amont de la séquence de tête des IgK. Le vecteur contient également une séquence codant la luciférase (Luc) sous contrôle d'une séquence IRES. SV40 ori et ColE1 ori sont les origines de répllication en cellules eucaryotes et en bactéries, respectivement. Amp et Néo sont les gènes de résistance à l'ampicilline et au G418 pour la sélection positive des bactéries et des cellules eucaryotes, respectivement.

B. Profil électrophorétique de l'ADN plasmidique de bactéries transformées par le vecteur pcMG-GST-rCYS×3-IRES-Luc obtenu par la méthode du *cracking*. La migration a été effectuée dans un gel d'agarose à 0,8 %.

C. Profil électrophorétique de préparations de plasmide pcMG-GST-rCYS×3-IRES-Luc digérées par *ClaI*.

D. Cartographie du vecteur pcMG-GST-rCYS×3-IRES-Luc.

évaluée empiriquement selon la formule suivante :

$$\text{Quantité d'insert (ng)} = \frac{\text{Quantité de vecteur(ng)} \times \text{Taille de l'insert (kb)}}{\text{Taille du vecteur (kb)}} \quad (2.1)$$

Le mélange réactionnel de ligation était le suivant :

vecteur pcMG-IRES-Luc (50 ng/ μ L)	1 μ L
Insert GST-rCYS \times 3 (19 ng/ μ L)	1,8 μ L
Tampon	2 μ L
ATP (10 mM)	3 μ L
Ligase T4 (400000 U/mL)	1 μ L
Qsp H ₂ O 20 μ L 16°C, 12 h	

Quatre μ L du produit de la réaction de ligation ont été utilisés pour transformer 20 μ L de bactéries ultra-compétentes XL2[®] comme décrit au 2.1.2.1. Le plasmide pcMG-IRES-Luc a été utilisé pour réaliser une transformation contrôle. La sélection des bactéries transformées a été effectuée sur des géloses LB (Sigma-Aldrich) contenant 50 μ g/mL d'ampicilline (Sigma-Aldrich) incubées à 37°C sur la nuit. Après incubation, 22 clones ont pu être isolés dont 3 clones contrôles transformés par le vecteur pcMG-IRES-Luc.

La présence du vecteur a été vérifiée par la méthode du *cracking*. La moitié de chaque colonie ampicilline-résistante a été prélevée avec une pipette pasteur boutonnée puis déposée dans 28 μ L de tampon (50 mM NaOH, 0,5 % dodécylsulfate de sodium [SDS], 50 mM éthylènediaminetétraacétique [EDTA]). Après 20 min d'incubation à 72°C, les lysats obtenus ont été mélangés avec 10 μ L de bleu BCX (0,25 % bleu de bromophénol, 0,25 % xylène cyanol FF, 15 % Ficoll 400, 5 % glycérol, 40 mM EDTA, pH = 7,4) puis une électrophorèse a été réalisée dans un gel d'agarose 0,8 % (Figure 21 B). Sous forme circulaire, les vecteurs pMOS-GST-rCYS \times 3, pcMG-IRES-Luc et pcMG-GST-rCYS \times 3-IRES-Luc migrent

à des tailles de 2,3, 3,9 et 4,8 kb, respectivement. Les clones 1, 2 et 3 sont des contrôles transformés par le vecteur pcMG-IRES-Luc. Les clones 4, 7, 13 et 14 ont donc été transformés par ce vecteur. Les clones 8, 11, 16, 18 et 22 ont été transformés par le vecteur pMOS-GST-rCYS×3. En revanche les clones 5, 6, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20 et 21 semblent être transformés par un vecteur dont la masse moléculaire apparente est compatible avec celle de pcMG-GST-rCYS×3-IRES-Luc. Les clones 9 et 15 ont été ensemencés dans du milieu LB liquide contenant 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline afin de réaliser des préparations de plasmide avec le kit QIAprep[®] Spin comme décrit au 2.1.2.1. Les plasmides ont ensuite été digérés par l'enzyme de restriction *Cla*I comme suit :

Plasmide	10 ng
<i>Cla</i> I (5000 U/mL)	1 μL
Tampon	2 μL
Qsp H ₂ O 20 μL 37°C, 2 h	

Le produit de cette digestion a été analysé par électrophorèse dans un gel d'agarose 0,8 % (Figure 21 C). L'ADN plasmidique des clones transformés par le vecteur pcMG-GST-rCYS×3-IRES-Luc migre à une taille apparente conforme à la taille théorique attendue de 9,6 kb. La préparation de plasmide du clone 15 a donc été utilisée pour transformer des bactéries ultra-compétentes XL2[®]. Deux clones ont été sélectionnés pour réaliser une grande préparation de plasmide avec le kit JetStar[®]. La cartographie du vecteur pcMG-GST-rCYS×3-IRES-Luc a été déterminée pour les deux préparations de plasmide (Figure 21 D) et confirme le clonage de l'insert GST-rCYS×3 dans le vecteur pcMG-IRES-Luc. Les tailles des fragments attendus sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 5 – Taille des fragments attendus après digestion des vecteurs pcMG-IRES-Luc, pcMG-GST-rCYS×3-IRES-Luc et pMOS-GST-rCYS×3 par les enzymes de restriction *ClaI*, *EcoRI*, *EcoRV* ou *SspI*

	pcMG-IRES-Luc	pcMG-GST-rCYS×3-IRES-Luc	pMOS-GST-rCYS×3
Digestion <i>ClaI</i>	7,8 et 2,5 kb	9,6 kb	4,7 kb
Digestion <i>EcoRI</i>	5,3 et 2,5 kb	7,1 et 2,5 kb	4,7 kb
Digestion <i>EcoRV</i>	5,1, 1,9 et 0,8 kb	5,1, 2,6 et 1,9 kb	2,3 kb
Digestion <i>SspI</i>	7,8 kb	9,6 kb	4,2 et 0,5 kb

2.1.3.2 Transfection des cellules HEK293

Le seuil de résistance au G418 des cellules HEK293 a été déterminé par une exposition prolongée à des doses croissantes d'antibiotique. Après deux semaines de traitement, la mortalité des cellules atteint 100 % à partir d'une concentration de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418. Cette concentration a donc été utilisée pour sélectionner les cellules transfectées, devenues résistantes au G418. Le vecteur pcMG-GST-rCYS×3-IRES-Luc de la préparation de plasmide 1 (Figure 21 D) a été linéarisé par *SspI* selon le mélange suivant :

Plasmide pcMG-GST-rCYS×3-IRES-Luc (1,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	18,2 μL
Tampon	3 μL
<i>SspI</i> (5000 U/mL)	2 μL
Qsp H ₂ O 30 μL 37°C, 2 h	

Les cellules ont été cultivées en boîte de Pétri (\varnothing 10 cm) dans du milieu EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*, ATCC) supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal et un mélange de Pénicilline-Streptomycine (100 U/mL ; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Lorsqu'elles atteignaient 80 % de confluence, les cellules ont été transfectées avec 1 μg de vecteur linéarisé à l'aide d'effectene (Stratagène) en suivant les recommandations du fabricant. Après 48 h d'incubation à 37°C sous 5 % de CO₂, le milieu de culture a été remplacé par du milieu, contenant 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418, renouvelé toutes les 24 h pendant 14 jours. Les clones résistants au G418 ont été piqués puis amplifiés dans des plaques 96 puits (Techno Plastic

Products, TPP). À confluence, les clones ont été repiqués en duplicat dans des plaques 24 puits (TPP). L'activité luciférase (BioAssay Systems) est mesurée, selon les recommandations du fabricant, en lysant les cellules avec un tampon contenant de la luciférine dont l'oxydation en oxy-luciférine par la luciférase produit de la bioluminescence. Cette bioluminescence a été quantifiée par une caméra refroidie (Carestream IS400MM PRO). Les neuf clones ayant l'activité luciférase la plus élevée ont été repiqués dans des flasques de 25 cm² (T25). La production de GST-rCYS×3 a été évaluée dans le lysat cellulaire et le surnageant. Les deux clones les plus productifs sont congelés à -152°C dans du milieu EMEM supplémenté avec 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO).

2.1.4 PCR quantitative

La fraction d'ARN totale a été extraite des cultures cellulaires par la méthode du trizol. L'ADN génomique a été digéré par incubation avec la DNaseI (37°C, 1 h) puis l'ARN a été rétrotranscrit en ADNc par RT-PCR à l'aide de l'enzyme MMLV (0,2 U, Promega) et d'hexamères aléatoires selon les recommandations du fabricant. Le niveau d'expression des mucines gélifiantes a été déterminé en triplicat à partir de cultures de cellules MTX et MTX-rCYS×12 en utilisant l'ARN ribosomal 18S comme contrôle interne (TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents, Applied Biosystems, USA). Les séquences des amorces et des sondes utilisées sont listées dans le tableau suivant :

Tableau 6 – Séquences des amorces et des sondes utilisées pour la quantification de l’expression des mucines gélifiantes dans les cellules MTX et MTX-rCYS \times 12

Les oligonucléotides et la sonde utilisés pour la quantification de l’expression de *MUC5B* ont été développés durant un travail du laboratoire antérieur [Valque et al., 2012].

Gène	Oligonucléotide	Séquence
<i>MUC2</i>	sens	5'-GCGCTCCCCTAGGCATCT-3'
	anti-sens	5'-GGAAAGCAAGGACTGAACAAAGA-3'
	sonde	5'-ACAGCTTTACCTCCCCCGGACCCTC-3'
<i>MUC5AC</i>	sens	5'-AGAGTGGGAGCTGGGAGAGAG-3'
	anti-sens	5'-AGCTCAGAGGACATATGGGAGGT-3'
	sonde	5'-CCAGTGTCCCCCATGCAGTGACC-3'
<i>MUC5B</i>	sens	5'-GCCTGCTGCAGGGTAACTCA-3'
	anti-sens	5'-ATTGCTCAGGGTTTATTTGCAAA-3'
	sonde	5'-CATCCCAAAGCCCCCTCTGCTCA-3'
<i>MUC6</i>	sens	5'-GGGTCGCTGCCTGCTCT-3'
	anti-sens	5'-TGACCAGGAAAGCAGCTGC-3'
	sonde	5'-CCACCAGCCCCCTTCCCGC-3'

La PCR quantitative a été réalisée sur un appareil 7500 Applied System (Applied Biosystems, USA) et l’expression génique a été déterminée par la méthode du $\Delta\Delta C_t$.

2.2 Culture cellulaire

2.2.1 *Pichia pastoris*

Les clones de levure *Pichia pastoris* sont maintenus étalés sur des géloses YPD contenant un mélange de Pénicilline-Streptomycine (100 U/mL ; 100 μ g/mL). La production de molécules recombinantes par les levures transformées par le vecteur pPICZ se déroule en deux étapes. Durant la première phase *Pichia pastoris* est cultivée en milieu BMGY :

Peptone	20 g
Extrait de levure	10 g
Bases azotées de levure	13,4 g
Tampon phosphate pH 6,0	100 mM
Biotine	400 mg
Glycérol	10 mL
	Qsp H ₂ O 1 L

La peptone et l'extrait de levure sont préparés dans 800 mL d'eau ultrapure, puis autoclavés. Les composants restants sont préparés dans 200 mL puis filtrés (\varnothing 0,22 μ m, Sartolab). Une fois la solution de peptone et extrait de levure tempérée, le reste des composants est ajouté pour reconstituer le milieu BMGY. Les levures sont cultivées à 30°C, 220 rpm pendant 48 h jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 8–10. Les levures sont alors centrifugées (4000×g, 10 min) et suspendues dans le même volume de milieu BMMY (composition identique au milieu BMGY hormis pour le glycérol qui est remplacé par 1 % de méthanol qui induit l'expression de la protéine rCYS×3, contrôlée par le promoteur *AOX1*). Le méthanol est renouvelé toutes les 24 h pour une durée de 48 h. Les cultures sont centrifugées (4000×g, 10 min, 4°C), le surnageant est filtré (\varnothing 0,22 μ m) puis conservé à 4°C et le culot est congelé à -80°C. La purification de rCYS×3 sécrété dans le surnageant est effectuée dans les 12 h après l'arrêt de l'induction.

2.2.2 *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium nous ont été données par le Dr. B. Borlee et le Dr. J.-C. Sirard, respectivement [Davies et al., 1998, Hopkins et al., 2001]. Ces deux souches expriment stablement une sé-

quence codant la GFP, ce qui permet leur suivi par microscopie à fluorescence. Les souches sont ensemencées dans du milieu LB contenant 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline et cultivées sur la nuit à 37°C, sous agitation. La croissance bactérienne est évaluée par mesure de la DO_{600} et la vitalité des bactéries est vérifiée par microscopie à fluorescence avant toute procédure expérimentale.

2.2.3 Lignée cellulaire HT29-MTX E12

Les cellules MTX et MTX-rCYS \times 12 sont cultivées dans des flasques T25 contenant 5 mL de milieu DMEM supplémentés avec 10 % de sérum de veau foetal (HyClone) et un mélange de Pénicilline-Streptomycine (100 U/mL ; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La pression de sélection des cellules MTX-rCYS \times 12 est maintenue par l'ajout de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418. Les cellules sont cultivées à 37°C, sous 5 % de CO_2 et le milieu de culture est renouvelé toutes les 48 h. Les cultures confluentes sont repiquées par ajout de trypsine (0,05 %, Gibco BRL) et incubation 7 min à 37°C. La trypsine est ensuite inactivée par le sérum de veau foetal contenu dans 5 mL de milieu de culture. Les cellules sont dénombrées en cellule de Malassez puis repiquées à raison de 300 000 et 700 000 cellules par T25 pour les clones MTX et MTX-rCYS \times 12, respectivement. Des co-cultures sont réalisées à 5 ratios allant de 100 % de cellules MTX à 100 % de cellules MTX-rCYS \times 12 afin d'étudier l'effet dose de la protéine rCYS \times 12 sur les propriétés du gel de mucus (Figure 22).

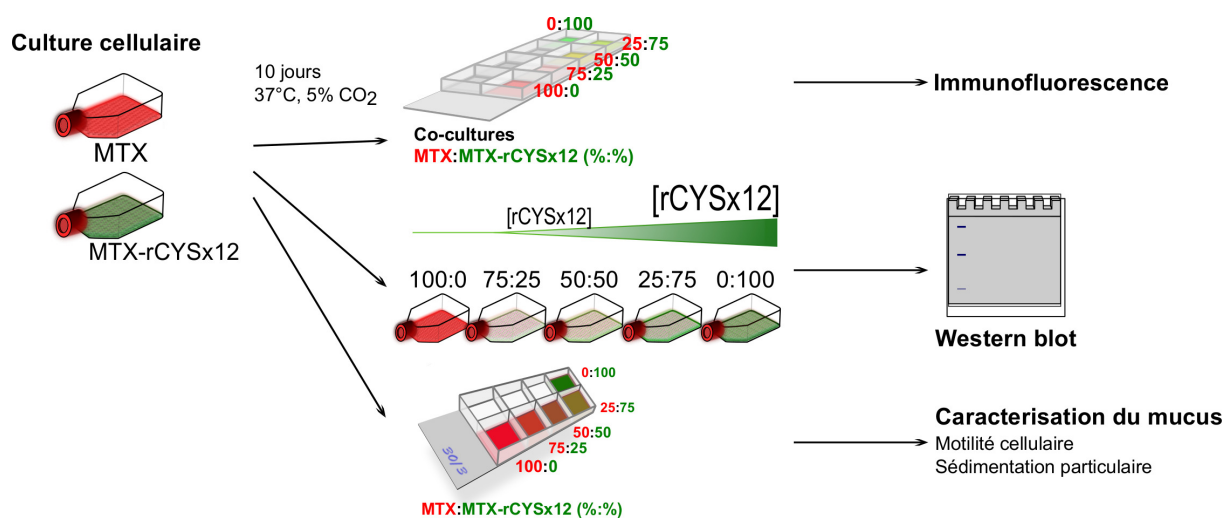


FIGURE 22 – Schéma du dispositif expérimental pour l'étude de rCYS \times 12 dans le modèle cellulaire HT29-MTX E12

Les cellules MTX natives (MTX) et recombinantes (MTX-rCYS \times 12) sont amplifiées pendant 10 jours puis co-cultivées avant leur 20^{ème} passage à 5 ratios à raison de 100 000 cellules par puits pour les tests de perméabilité et de motilité (lame 4 puits, Labtek), 50 000 cellules par puits pour l'immunohistochimie (lame 8 puits, Millipore) ou dans des flasques de 75 cm² pour le Western blot (ratio d'ensemencement des T25 multiplié par 3). Les cultures cellulaires sont étudiées environ 21 jours après ensemencement lorsque les cellules sont confluentes et complètement différenciées.

2.2.4 Lignée cellulaire HEK293

La lignée cellulaire HEK293 est une lignée épithélioïde de cellules rénales humaines immortalisées, ou transformées, par de l'ADN adénoviral [Russell et al., 1977]. Les cellules HEK293 sont cultivées en T25 contenant 5 mL de milieu EMEM supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal et un mélange de Pénicilline–Streptomycine (100 U/mL ; 100 µg/mL). Les cellules sont cultivées à 37°C sous 5 % de CO₂ et sont repiquées tous les 7 jours à une concentration de 10 % (vol./vol.) jusqu'à leur 20^{ème} passage. La pression de sélection des clones recombinants est maintenue par l'ajout de 500 µg/mL de G418.

2.3 Prélèvement de mucus colique murin

2.3.1 Élevage et génotypage des animaux

Les souris transgéniques de la lignée Tg222 sont maintenues à l'état hétérozygote dans un fond génétique C57BL/6 [Gouyer et al., 2015]. Les souris de type sauvage (WT) et transgéniques (Tg222) issues de la même portée sont maintenues appariées dans la même cage d'une animalerie EOPS (Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique, Université de Lille ; numéro OGM : 5287, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche). Le génotypage des animaux est effectué à 8 semaines par PCR froide à partir d'une biopsie caudale comme décrit précédemment [Gouyer et al., 2015].

2.3.2 Prélèvement du mucus

Les souris sont mises à jeun sur la nuit avant toute procédure expérimentale. Les souris sont tuées par une injection intra-péritonéale d'euthanasique (T61, MSD Santé animale) selon la posologie du fournisseur. Le génotype des souris est confirmé au moment du

sacrifice par observation d'une biopsie d'iléon ouverte. Le transgène rCYS \times 12, marqué par la GFP, émet une fluorescence détectable par stéréomicroscopie à épifluorescence (Leica M205 équipé de la caméra DFC450c ; Figure 23). Les côlons sont alors prélevés, ouverts longitudinalement et débarrassés des fèces. Le mucus est prélevé en grattant délicatement la surface de la muqueuse avec une lame de scalpel. Les échantillons de mucus obtenus sont groupés en fonction du génotype et dilués avec un volume équivalent de solution saline tamponnée (PBS) contenant 1 mM d'inhibiteur de protéases à sérine (Fluorure de 4-(2-aminoéthyl)benzènesulfonyle [PMSF], Sigma-Aldrich).

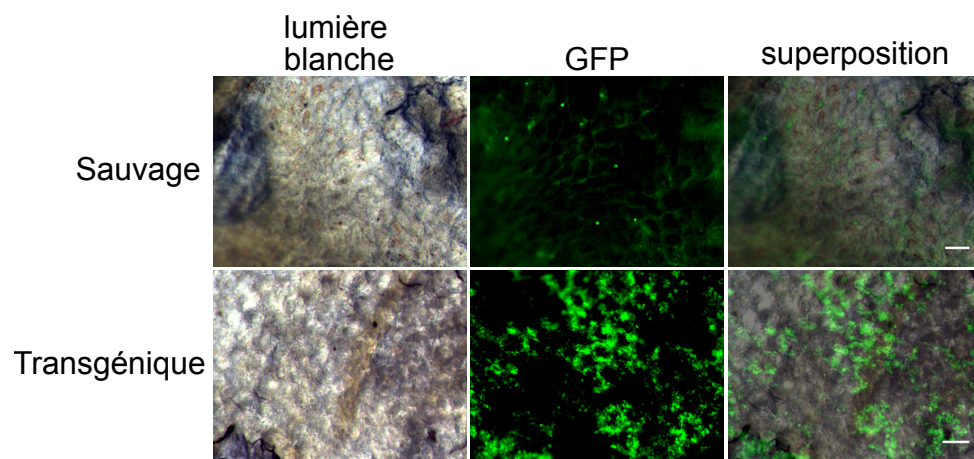


FIGURE 23 – Observation de biopsies d'iléon frais de souris de type sauvage et transgénique par microscopie à épifluorescence

Contrairement à celui des souris de type sauvage, le tissu iléal des souris transgéniques émet une fluorescence verte lorsqu'il est excité à 488 nm. Barres d'échelle : 100 μm .

2.4 Biochimie

2.4.1 Purification de rCYS×3

2.4.1.1 Dans le modèle *Pichia pastoris*

La molécule rCYS×3 a tout d'abord été purifiée à partir de cultures de levures transformées par le vecteur pPICZ- α -rCYS×3. La molécule étant peu sécrétée, elle est purifiée à partir du lysat des levures. Les levures sont suspendues poids/poids dans un tampon de lyse (50 mM tampon phosphate, 1 mM EDTA, 5 % glycérol, pH = 7,4) auquel sont ajoutés 0,1 % de 3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate ([CHAPS], Sigma-Aldrich) et 1/20^{ème} de volume d'alcool isoamylique (Sigma-Aldrich). La suspension de levure est mélangée avec 1/3 de volume de billes de verre (\varnothing 0,5 mm, Sigma-Aldrich). La suspension est vortexée 30 s puis incubée sur de la glace 30 s à quinze reprises. L'efficacité de la lyse est constatée par l'observation d'un mélange volume/volume du lysat de levure avec une solution de bleu Evans (1 %, Sigma-Aldrich). Le cytoplasme des levures apparaît bleu si les parois des levures sont perméables.

Les billes de verre sont rincées à quatre reprises avec le tampon d'équilibration de la résine Ni Sepharose FastFlow[®] (20 mM de tampon phosphate, 1 M NaCl, 0,1 % CHAPS, 40 mM Imidazole, pH = 7,4; GE Healthcare). Le lysat et le rinçage des billes sont groupés puis centrifugés (14 000×g, 60 min, 4°C). Le surnageant est filtré (\varnothing 0,22 μ m), le pH ajusté à 7,4, puis incubé avec la résine sur un agitateur rotatif à 4°C pendant 12 h. La résine est chargée dans une colonne, préalablement nettoyée avec du tampon d'équilibration, puis est rincée avec 50 volumes de tampon d'équilibration. La protéine recombinante est éluée par le tampon d'éluion contenant 500 mM d'imidazole (composition identique au tampon d'équilibration excepté pour la concentration d'imidazole).

2.4.1.2 Dans la lignée HEK293

Les clones exprimant la luciférase sont cultivés en T75 dans 10 mL de milieu EMEM contenant 10 % de sérum de veau foetal, un mélange de Pénicilline–Streptomycine (100 U/mL; 100 μ g/mL) et du G418 (500 μ g/mL). Le milieu est renouvelé tous les 2 jours jusqu'à confluence où il est remplacé par du milieu EMEM sans sérum. Après 24 h, le milieu de culture conditionné est filtré (\varnothing 0,22 μ m) puis incubé avec la résine Glutathione Sepharose 4B[®] (GE Healthcare) pendant 2 h à température ambiante. La résine est rincée trois fois avec 10 volumes de PBS puis éluee avec le tampon d'élution (50 mM tris(hydroxyméthyl)aminométhane [tris], 10 mM glutathion réduit, pH = 8,0) selon les recommandations du fabricant.

2.4.2 Western blot

Les protéines sont préparées dans le tampon d'échantillon LDS 2X ou 4X suivant le volume déposé (Invitrogen). Les échantillons analysés en conditions dénaturantes sont homogénéisés avec le tampon LDS contenant 10 % de β -mercaptoéthanol (vol.) puis incubés 5 min à 95°C. Les protéines sont séparées dans un gel d'acrylamide/bis-acrylamide surmonté d'un gel de concentration (0,5 mL acrylamide/bis-acrylamide 40 %, 1,25 mL tris-HCl 0,5 M pH = 6,8, 25 μ L SDS 20 %, 25 μ L persulfate d'ammonium 10 %, 5 μ L tétra-méthyl-éthylène-diamine [TEMED], 3,2 mL H₂O) par la méthode du SDS-PAGE. L'électrophorèse est réalisée sous ampérage constant de 15 mA dans le gel de concentration puis de 25 mA dans le gel de séparation, dans un tampon de migration (25 mM tris, 0,192 M glycine, 2 mM EDTA, 0,02 % SDS).

Une fois la séparation effectuée, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham) dans un tampon de transfert (25 mM tris, 0,192 M glycine) à un voltage constant de 100 V pendant 90 min. La membrane est ensuite saturée avec une

solution de lait écrémé (5 %, Régilait) sous agitation dans un tampon TNT (10 mM tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) pendant une nuit. La membrane est alors rincée puis incubée avec le tampon TNT contenant l'anticorps primaire. Les différents anticorps, leurs espèces hôte et cible et la concentration à laquelle ils ont été employés sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 7 – Caractéristiques des anticorps primaires

Anticorps	Espèce hôte	Espèce cible	Dilution	Référence
Anti-domaine CYS (Eu1/Eu2)	Souris	Homme	1/3000 ^{ème}	[Rousseau et al., 2003]
Anti-MUC5AC (45M1)	Souris	Homme	1/5000 ^{ème}	[Bara et al., 1991]
Anti- β -actine	Souris	Homme	1/3000 ^{ème}	Abcam
Anti-GST	Chèvre	Homme	1/2000 ^{ème}	Invitrogen
Anti MUC2 (H-300)	Lapin	Homme	1/3000 ^{ème}	Santa Cruz

L'anticorps primaire est incubé pendant 3 h sous agitation. Puis, après trois rinçages, la membrane est incubée avec la solution d'anticorps secondaire anti-espèce couplé à la peroxydase de raifort (1/2500^{ème}) pendant 90 min. La membrane est rincée puis révélée par une incubation avec une solution d'ECL (GE Healthcare) préparée extemporanément. La lecture de la membrane est réalisée sur une caméra refroidie (Carestream IS400MM PRO).

2.4.3 Coloration à l'argent

La préparation et la séparation des échantillons est réalisée comme décrit au paragraphe 2.4.2. Après l'électrophorèse, le gel est fixé 30 min dans un tampon méthanol/acide acétique (50 %/10 %) puis 15 min dans un second tampon méthanol/acide acétique (5 %/1 %). Le gel est rincé et réhydraté par trois incubations de 10 min dans de l'eau ultrapure puis sensibilisé dans une solution de thiosulfate de sodium (0,02 %, Sigma-Aldrich) pendant 90 s. L'excès de thiosulfate de sodium est éliminé par trois rinçages de 30 s dans de l'eau ultrapure puis le gel est incubé dans une solution de nitrate d'argent

(0,2 %, Sigma-Aldrich) pendant 30 min à l'abri de la lumière. Le gel est ensuite rincé trois fois 1 min dans de l'eau ultrapure puis incubé 3–5 min dans un tampon de révélation (6 % bicarbonate de sodium, 0,0004 % thiosulfate de sodium, 0,00002 % formaldéhyde). La réaction est arrêtée par une solution d'acide acétique (3 %) puis le gel est conservé dans de l'eau ultrapure.

2.4.4 Ultra-centrifugation sur gradient de saccharose

Cinq mL de surnageant de cultures de cellules MTX et MTX-rCYS×12 confluentes et différenciées sont déposés à la surface d'un gradient continu de saccharose préparé dans du PBS (15–30 %, 8 mL). Les échantillons sont centrifugés ($202\,000\times g$, 90 min, 4°C, rotor SW41 Ti) dans des tubes de 13 mL (Beckman Counter) puis fractionnés des densités les plus faibles vers les plus élevées. Vingt μL de chaque fraction sont adsorbés à la surface d'une membrane de nitrocellulose, préalablement équilibrée dans du tampon TNT, à l'aide d'un appareil de micro-filtration (Biorad). Le transgène rCYS×12 et la mucine gélifiante MUC5AC sont détectés à l'aide des anticorps primaires Eu1/Eu2 et 45M1, respectivement, en suivant la procédure décrite au 2.4.2. Une semi-quantification des concentrations de rCYS×12 et MUC5AC est réalisée par densitométrie à l'aide du logiciel Fiji [Schindelin et al., 2012].

2.5 Motilité cellulaire

2.5.1 Motilité de bactéries

Les bactéries sont cultivées selon la procédure décrite au paragraphe 2.2.2. Après la mesure de la DO_{600} , les bactéries sont centrifugées puis suspendues à 10^8 bactéries/mL dans du PBS.

Les co-cultures MTX:MTX-rCYS \times 12 sont cultivées sur des lames 4 chambres (0,9 mL, Labtek). Une fois les cellules différenciées, le volume de milieu de culture est réduit au minimum, soit environ 300 μ L et 6 μ L d'une suspension de *Pseudomonas aeruginosa* sont déposés à la surface de chaque co-culture.

La motilité de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium est analysée dans le mucus colique de souris de type sauvage et transgéniques. Les échantillons de mucus sont prélevés comme décrit au paragraphe 2.3.2. Un μ L d'une suspension de *Salmonella enterica* est homogénéisé avec \simeq 50 μ L de mucus colique. Ce mélange est déposé dans une lame 4 chambres.

Les déplacements bactériens sont enregistrés par microscopie à fluorescence time-lapse (Leica MM AF 1.3, objectif \times 40) à une résolution temporelle de 4 images/s pendant 1 min. Six vidéos sont enregistrées par condition et l'ordre d'enregistrement est randomisé. Les trajectoires bactériennes sont reconstituées grâce au module Trackmate du logiciel Fiji [Tinevez et al., 2017, Schindelin et al., 2012]. Ces données de trajectoires sont exportées pour ensuite être analysées par le logiciel Icy [de Chaumont et al., 2012]. La linéarité est calculée en divisant la distance linéaire d'une trajectoire bactérienne par la trajectoire réelle. De ce fait, plus la valeur de la linéarité approche 0, plus la trajectoire est sinueuse et confinée. Une classification a été créée par Pontier-Bres *et coll.* en 2012. Elle définit les trajectoires dont la linéarité est inférieure à 0,3 comme confinées [Pontier-Bres et al., 2012]. Les données du suivi de bactéries permettent également de calculer la vitesse de déplacement définie comme le ratio de la distance parcourue sur la durée de déplacement.

2.5.2 Motilité de spermatozoïdes

Les spermatozoïdes sont extraits des épидидymes de souris de type sauvage âgées d'au moins 8 semaines. Les souris sont tuées par une injection intrapéritonéale de T61. Les épидидymes sont prélevés, ciselés et incubés 10 min à 37°C sous 5 % de CO₂ dans 1 mL de milieu M2 préchauffé (Sigma-Aldrich). Les spermatozoïdes sont isolés sur un gradient discontinu de Percoll (45/90 %) [Varisli et al., 2008]. La solution tampon SP-TALP est préparée concentrée 10 fois (4,68 % NaCl, 0,23 % KCl, 0,4 % NaH₂PO₄, 2,38 % acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique [HEPES], pH = 7,4) puis est ajoutée au Percoll (GE Healthcare). La solution de Percoll 90 % est obtenue en ajoutant 14,7 mg CaCl₂, 4 mg MgCl₂, 42 mg NaCO₃ et 184 μ L de lactate de sodium (60 %). Le Percoll 45 % est obtenu par dilution volume/volume du Percoll 90 % avec du tampon SP-TALP dilué au 1/10^{ème} et supplémenté par le chlorure de calcium, le chlorure de magnésium, le carbonate de sodium et le lactate de sodium comme décrit ci-dessus. Toutes les solutions de Percoll sont filtrées (\varnothing 0,22 μ m, Sartolab).

Après incubation, les épидидymes ciselés dans le milieu M2 sont placés sur le gradient de Percoll préchauffé à 37°C, puis centrifugés à 300 \times *g* pendant 30 min. Le culot est récupéré puis incubé dans 1 mL de milieu M2 préchauffé à 37°C. Les spermatozoïdes sont rendus fluorescents par un traitement à l'acriflavine (0,01 %, Sigma-Aldrich) [Trottmann et al., 2015].

Pour chaque condition, 10 vidéos sont acquises sur un microscope inversé (Spinning disk, grossissement \times 20, Zeiss) incubé à 37°C sous 5 % de CO₂. La méthode d'analyse des vidéos obtenues est identique à celle décrite au paragraphe 2.5.1.

2.6 Micro-rhéologie

2.6.1 Tests de perméabilité

Des co-cultures MTX:MTX-rCYS \times 12 sont préparées comme au paragraphe 2.5.1. Une fois les cellules différenciées en cellules muco-sécrétantes, le volume de milieu de culture est réduit au minimum ($\simeq 300 \mu\text{L}$), puis $3 \mu\text{L}$ d'une solution de microparticules en polystyrène de $3 \mu\text{m}$ de diamètre diluée au $1/100^{\text{ème}}$ dans du PBS (0,025 %, Polysciences) sont déposés à la surface de chaque condition de co-culture. La mono-couche de cellules est marquée par le CellTrace Bodipy Methyl Ester[®] ($1/1000^{\text{ème}}$, Invitrogen). Après 45 min d'incubation à 37°C sous 5 % de CO_2 , la distribution des microparticules dans le mucus est déterminée à une résolution spatiale de $4 \mu\text{m}$ selon l'axe z sur trois champs de microscopie (Spinning disk Zeiss, grossissement $\times 20$). La distribution des microparticules est imagée depuis la surface cellulaire jusqu'à la dernière section optique de mucus définie comme la section la plus luminale où des microparticules sont observables à $t = 0$ min. Le nombre de microparticules par section optique est déterminé à l'aide du logiciel Fiji. Nous considérons que les microparticules se trouvant dans le tiers de la couche de mucus le plus proche de la mono-couche de cellules après 45 min ont effectivement traversé le mucus.

2.6.2 Préparation des nanoparticules

Afin d'étudier les propriétés structurales du mucus, les particules doivent être le plus muco-inertes possible. La PEGylation est l'une des méthodes les plus utilisées pour atteindre cet objectif, et s'avère particulièrement efficace dans le cas des gels de mucus [Huckaby and Lai, 2017].

Le recouvrement covalent des nanoparticules par du PEG *via* une liaison peptidique est

effectué à partir d'un volume de 500 μL de suspension de particules (2,5 %, Polysciences). Les nanoparticules sont rincées trois fois dans un tampon carbonate (100 mM, pH = 9,6) puis trois fois dans un tampon d'acide 2-(N-morpholino)-éthanesulfonique (MES, 100 mM, pH = 5,5). Les nanoparticules sont centrifugées puis suspendues dans 625 μL de tampon MES. Six cent vingt-cinq μL d'une solution de carbodiimide (2 %, Sigma-Aldrich) sont progressivement ajoutés à la solution de nanoparticules qui est incubée sur un agitateur rotatif pendant 20 min à température ambiante. Les nanoparticules sont de nouveau centrifugées puis rincées à trois reprises dans 1 mL de tampon MES. Le tampon MES est ensuite échangé avec 1,2 mL de tampon borate (200 mM, pH = 8,5, Sigma-Aldrich) additionné de 400 μg de diamine-PEG (3,4 kDa, Sigma-Aldrich). Ce mélange est placé sur un agitateur rotatif à température ambiante pendant 12 h. Les nanoparticules sont centrifugées puis suspendues dans 1,2 mL de tampon borate contenant 50 μL d'éthanolamine (250 mM, Sigma-Aldrich) puis dans 1 mL de tampon borate contenant 10 mg d'albumine de sérum bovin (BSA). Ce mélange est placé sur un agitateur rotatif pendant 30 min, puis les nanoparticules sont centrifugées et conservées dans 500 μL de tampon de conservation (10 mM phosphate de sodium, 1 % BSA, 0,1 % d'azide de sodium, 5 % glycérol). Les nanoparticules sont conservées à 4°C jusqu'à utilisation.

Le recouvrement des nanoparticules par le PEG est confirmé par une incubation avec de la NeutrAvidine couplée à la rhodamine (Invitrogen). Dix μL de la solution de nanoparticules (2,5 %) sont homogénéisés avec 200 μL de NeutrAvidine (0,1 mg/mL dans du PBS) sur un agitateur rotatif pendant 1 h à température ambiante. Les nanoparticules sont rincées à deux reprises avec du PBS, puis diluées à une concentration de 0,08 % dans du PBS. L'observation est réalisée entre lame et lamelle sur un microscope à fluorescence (Spinning disk, Zeiss, grossissement $\times 20$). Les nanoparticules non-modifiées (carboxylées) sont utilisées comme contrôle. La charge de surface (exprimée par le potentiel ξ)

et la taille (exprimée par le Z-average) des nanoparticules sont mesurées dans le PBS en triplicat à 25°C par diffusion dynamique de la lumière (ZetaSizer NanoZS analyzer, Malvern Instruments).

2.6.3 Suivi de particules

Les nanoparticules sont diluées au 1/100^{ème} et 2 μL de cette suspension sont mélangés à environ 20 μL de mucus colique prélevé comme décrit au paragraphe 2.3.2. Les échantillons sont placés sur une lame d'angiogénèse (Ibidi) incubée à 37°C sous 5 % de CO_2 . Après 10 min, les mouvements des nanoparticules sont enregistrés sur un microscope inversé (Spinning disk, grossissement $\times 100$, Zeiss) à une résolution temporelle de 20 et 50 images/s, respectivement, pour les particules de 200 et 1000 nm de diamètre. L'ordre d'acquisition des vidéos est randomisé. Les trajectoires sont reconstituées à l'aide du module Trackmate puis sont analysées grâce au logiciel Icy. Les coordonnées des trajectoires sont transformées en déplacement quadratique (MSD ou $\Delta r^2(\tau)$) par la formule :

$$\Delta r^2(\tau) = [x(t + \tau) - x(t)]^2 + [y(t + \tau) - y(t)]^2 \quad (2.2)$$

où x et y représentent les coordonnées des particules à un temps t , et τ le retard. Les déplacements quadratiques moyens \pm l'erreur standard de la moyenne sont représentés pour chaque condition. La diffusivité des particules est quantifiée par le calcul du coefficient de diffusion à $\tau = 1$ s comme suit [Yildiz et al., 2015b] :

$$D_{eff} = \frac{MSD}{4\tau} \quad (2.3)$$

La mesure du coefficient de diffusion des nanoparticules de 200 nm à $\tau = 0,25$ s permet de déterminer la proportion de particules piégées par le gel de mucus. En ef-

fet, une nanoparticule de diamètre supérieur à 200 nm ayant un coefficient de diffusion inférieur à $0,032 \mu\text{m}^2/\text{s}$ à $\tau = 0,25$ s aurait un déplacement inférieur à son diamètre sur l'échelle de temps considérée [Wang et al., 2015b]. La taille des pores formés par les mucines gélifiantes est estimée grâce au modèle *obstruction scaling* qui relie la diffusion des nanoparticules à la structure locale du réseau dans lequel elles diffusent [Hadjiev and Amsden, 2015, Lai et al., 2010, Amsden, 1998, Amsden, 1999]. Pour ce faire, l'équation suivante est résolue :

$$\frac{D_{eff}}{D_0} = \exp \left[\frac{-\pi}{4} \left(\frac{r_s + r_f}{r_g + r_f} \right)^2 \right] \quad (2.4)$$

où r_s est le rayon de la particule, r_f le rayon estimé des mucines gélifiantes et r_g le rayon du pore. Le rayon d'une mucine gélifiante est estimé à 3,5 nm [Sheehan et al., 1986, Brunelli et al., 2007], la taille du pore est donc égale à $2 \times r_g$.

2.7 Immunohistochimie

La production de la molécule rCYS \times 12 et de MUC5AC est vérifiée par immunohistochimie après ensemencement de 50 000 cellules par puits dans des lames 8 puits (Millipore). Les co-cultures sont rincées à l'aide de PBS (pH 7,4, Gibco BRL) puis fixées au paraformaldéhyde 4 % (Afflymetrix). Les groupements aldéhydes résiduels sont ensuite neutralisés par une solution de chlorure d'ammonium (50 mM), et les cellules perméabilisées avec une solution de saponine (0,2 %, Sigma-Aldrich). Les cellules sont saturées par une solution de PBS contenant 1 % de BSA (Sigma-Aldrich) et 0,2 % de saponine. Les anticorps primaires Eu1/Eu2 (1/300^{ème}) ou 45M1 (1/500^{ème}) sont incubés durant une nuit avec les cellules à 4°C. Après rinçage, l'anticorps secondaire anti-IgG murin couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (1/150^{ème}, Santa Cruz) est incubé durant 90 minutes à température ambiante.

L'ADN est contremarqué par le Hoechst 33258 (1/1000^{ème}, ThermoFisher Scientific). Les lames sont montées à l'aide de Mowiol et les observations sont réalisées sur microscope à fluorescence (Leica TCS LCSM, Leica Microsystems). Le comptage des cellules exprimant rCYS×12 est réalisé à partir de trois quantifications indépendantes (\pm écart-type) réalisées par deux expérimentateurs sur un champ de microscopie représentatif de l'échantillon. Les valeurs sont normalisées en % par rapport à la condition de co-culture 0:100.

3 Résultats

L'étude de la délivrance endogène de la molécule rCYS×12 dans les modèles cellulaire et murin a fait l'objet d'une publication dans le journal *Scientific Reports* (voir Annexe 3). L'étude de la *C*-mannosylation du domaine CYS a été publiée dans le journal *Biochemical and Biophysical Research Communications* (voir Annexe 4).

3.1 Étude de la délivrance endogène de la molécule rCYS×12 dans la lignée cellulaire HT29-MTX E12

3.1.1 Caractérisation des co-cultures

Après 21 jours, les co-cultures de cellules MTX et MTX-rCYS×12 (MTX:MTX-rCYS×12) sont confluentes et différenciées en cellules caliciformes muco-sécrétantes [Gouyer et al., 2001]. Étant donné le rôle prépondérant de la concentration des mucines gélifiantes sur les propriétés rhéologiques du mucus (voir 1.2.3.2.1), l'absence d'effet de la sécrétion de rCYS×12 sur l'expression et la production des mucines gélifiantes est vérifiée avant de caractériser le mucus produit par les co-cultures. Les niveaux d'expression des mucines *MUC2*, *MUC5AC*, *MUC5B* et *MUC6* des cellules MTX et MTX-rCYS×12 ont été déterminés par RT-PCR quantitative (technologie TaqMan). Les résultats montrent que la mucine majoritairement exprimée par les cellules MTX et

MTX-rCYS \times 12 est *MUC5AC* (Figure 24 A), ce qui confirme les données de la littérature [Dolan et al., 2012, Gouyer et al., 2001].

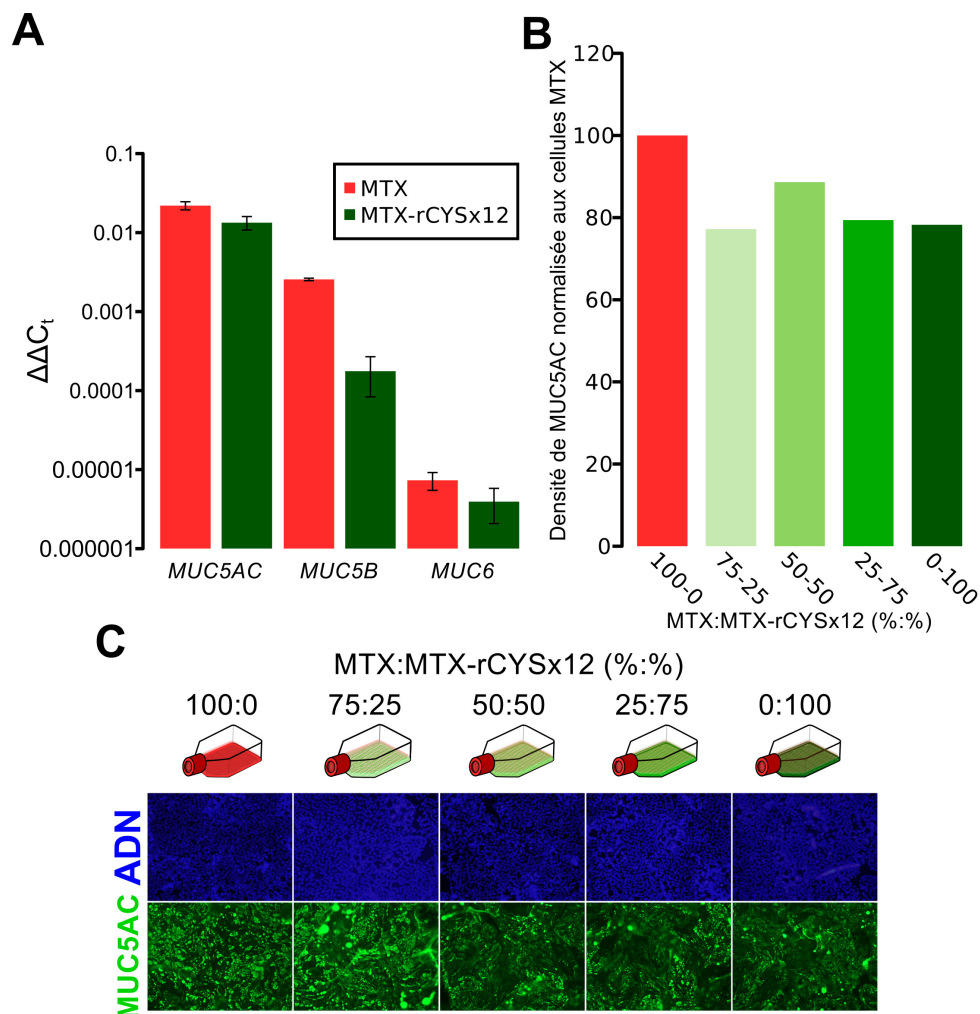


FIGURE 24 – Expression et production des mucines gélifiantes dans les co-cultures MTX:MTX-rCYS \times 12

A. Expression des mucines gélifiantes *MUC5AC*, *MUC5B* et *MUC6* dans les cinq conditions de co-culture MTX:MTX-rCYS \times 12 déterminée par PCR quantitative. Les mesures ont été effectuées en triplicat sur une culture MTX et une culture MTX-rCYS \times 12. **B.** Détermination de la production de MUC5AC dans les surnageants des cinq conditions de co-culture MTX:MTX-rCYS \times 12 par dot blot. **C.** Évaluation de la production de MUC5AC (vert) par immunohistochimie à la surface des cinq conditions de co-culture MTX:MTX-rCYS \times 12. L'ADN est contremarqué par le Hoechst 33258 (bleu). Grossissement \times 20.

MUC5B est exprimé à des niveaux environ 10 à 100 fois inférieurs à ceux de *MUC5AC*. L'expression de *MUC6* est environ 2000 fois inférieure à celle de *MUC5AC* tandis que l'expression de *MUC2* est indétectable par cette technique. Excepté pour *MUC5B*, dont l'expression est légèrement supérieure dans les cellules MTX en comparaison avec les cellules MTX-rCYS×12, aucun effet de la sécrétion de rCYS×12 sur l'expression de *MUC6* ou la mucine majeure *MUC5AC* n'a été mis en évidence. La concentration relative de la mucine gélifiante *MUC5AC* est déterminée dans le surnageant des cinq conditions co-culture MTX:MTX-rCYS×12 par dot blot. La densité du signal est normalisée au signal obtenu pour la condition 100:0 (MTX:MTX-rCYS×12; Figure 24 B). Aucun effet de la sécrétion du transgène rCYS×12 sur la concentration de *MUC5AC* n'a été mis en évidence dans le surnageant des co-cultures. Le marquage de *MUC5AC* par immunohistochimie dans les cinq conditions de co-cultures MTX:MTX-rCYS×12 est homogène et comparable dans toutes les conditions, ce qui confirme l'absence d'effet de la production de rCYS×12 sur la concentration de *MUC5AC* (Figure 24 C). En conclusion, l'expression et la production de *MUC5AC* sont donc indépendantes de la sécrétion de rCYS×12 dans notre modèle cellulaire. La production du transgène rCYS×12 est déterminée par immunohistochimie et par Western blot à l'aide d'un anticorps spécifiquement dirigé contre le peptide RNREQVVGKFKMC contenu dans la molécule rCYS×12 et dans la mucine gélifiante *MUC5B* [Rousseau et al., 2003]. Le marquage du domaine CYS par immunohistochimie révèle un gradient de production de rCYS×12 dans les cinq conditions de co-culture MTX:MTX-rCYS×12. Aucun signal n'est observé dans les cellules MTX natives. Cela montre l'absence de sécrétion de rCYS×12 par le clone natif et confirme que l'expression de *MUC5B* par les cellules MTX est très faible par rapport à celle de *MUC5AC* (Figures 24 A et 25 A). Le nombre de cellules CYS-positives est quantifié en triplicat par deux expérimentateurs indépendants sur un champ de microscopie représentatif de l'échantillon. Le nombre de cellules CYS-positives est normalisé à la condition de co-

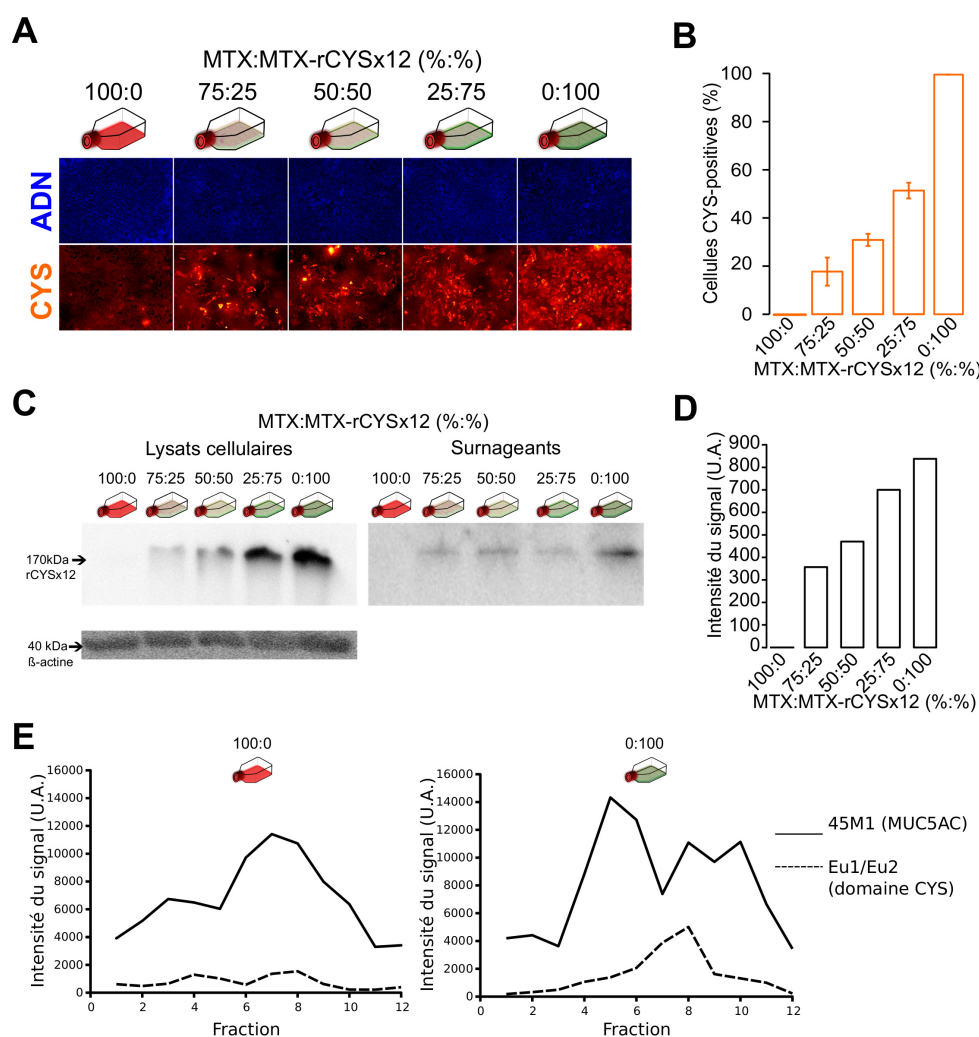


FIGURE 25 – Caractérisation des co-cultures MTX:MTX-rCYS \times 12

A. Marquage de rCYS \times 12 dans les cinq conditions de co-cultures MTX:MTX-rCYS \times 12 par immunohistochimie (rouge). L'ADN est contremarqué par le Hoechst 33258 (bleu). Grossissement \times 20. **B.** Quantification du nombre de cellules CYS-positives normalisée par rapport à la condition 0:100. **C.** Détection de rCYS \times 12 dans les lysats cellulaires et les surnageants des cinq conditions de co-culture MTX:MTX-rCYS \times 12 par Western blot. **D.** Quantification de la production de rCYS \times 12 normalisée à la β -actine dans les lysats cellulaires. **E.** Séparation des protéines de surnageants de cultures cellulaires MTX et MTX-rCYS \times 12 par ultracentrifugation sur gradient de saccharose. Les protéines MUC5AC et rCYS \times 12 sont détectées par dot blot puis semi-quantifiées par densitométrie.










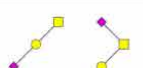






culture 0:100 (Figure 25 B) et confirme la production croissante du transgène rCYS×12. La production de rCYS×12 a été mesurée par Western blot dans le lysat et le surnageant des co-cultures MTX:MTX-rCYS×12. La détection de rCYS×12 dans le surnageant de toutes les co-cultures comprenant des cellules MTX-rCYS×12 confirme la sécrétion de cette protéine. La protéine rCYS×12 est détectée à une masse moléculaire de 170 kDa, en accord avec sa masse moléculaire théorique de 167 kDa, excluant la présence de modifications post-traductionnelles importantes. Un signal croissant est détecté dans le lysat des co-cultures de la condition 75:25 à la condition 0:100 (Figure 25 C). Ce signal a donc été normalisé à celui de la β -actine pour quantifier la production relative du transgène et mettre en exergue l'enrichissement du mucus cellulaire par la protéine rCYS×12 (Figure 25 D).

Il est peu probable que la molécule rCYS×12 ait un effet sur le gel de mucus des co-cultures si elle ne s'associe pas spontanément avec les mucines gélifiantes. Afin de détecter ces associations, les surnageants d'une culture MTX et d'une culture MTX-rCYS×12 ont été séparés par ultra-centrifugation sur un gradient continu de saccharose (15–30 %). Ce gradient est ensuite fractionné puis la détection de MUC5AC et de rCYS×12 est réalisée séparément par dot blot. Le signal est ensuite quantifié par densitométrie. MUC5AC est répartie en un seul pic pour la culture MTX, tandis que l'on observe deux pics pour la culture MTX-rCYS×12. Ceci traduit une plus grande hétérogénéité de densités, et donc de structures. La protéine rCYS×12 n'est pas ou peu détectée pour la culture MTX tandis que l'on observe un pic de détection de rCYS×12 pour la culture MTX-rCYS×12. Ce pic est associé avec le second pic de MUC5AC. Cela signifie que rCYS×12 est bien associé avec MUC5AC et que ces associations entraînent la formation de structures de mucus plus denses. Ce phénomène a été observé par ailleurs lors de la délivrance de polyphénols de thé vert dans le mucus [Davies et al., 2014].

La *O*-glycosylation des mucines gélifiantes est impliquée dans différentes propriétés des gels de mucus. Elle est responsable de l'hydrophilicité des mucines gélifiantes, de leur expansion post-sécrétion par équilibre de Donnan [Verdugo, 2012] et de la rigidité du réseau protéique qu'elles forment [Kramer et al., 2015]. Il est donc tout à fait intéressant de déterminer le profil de *O*-glycosylation des mucines gélifiantes des clones MTX et MTX-rCYS×12 avant de procéder à la caractérisation des gels de mucus qu'ils produisent. Comme décrit dans la littérature, la grande majorité des chaînes glycaniques portées par les mucines gélifiantes produites par les cellules MTX sont des chaînes courtes ayant une longueur de 1 à 4 sucres. Le profil de *O*-glycosylation est dominé par les antigènes T et silalyl-T, qui comportent 2 sucres, et qui représentent, respectivement, 80,6 et 69,5 % du *O*-glycome des clones MTX et MTX-rCYS×12 (Tableau 8). La spectrométrie de masse ne met pas en évidence de changements importants du profil *O*-glycannique des mucines gélifiantes entre les clones MTX et MTX-rCYS×12.

Tableau 8 – Détermination du profil de *O*-glycosylation des mucines gélifiantes sécrétées par les cellules MTX et MTX-rCYS×12

Les structures glycaniques sont représentées selon la nomenclature du consortium de la glycomique fonctionnelle (voir Figure 6). Les proportions d'antigènes T et sialyl-T sont représentées en gras.

Structure proposée	[M+Na] ⁺	MTX (%)	MTX-rCYS×12 (%)
	534	52,8	34,1
	575	5,3	1,2
	622	0,0	0,9
	663	1,6	0,6
	691	1,7	3,4
	708	0,0	0,6
	779	1,4	1,2
	837	0,0	0,3
	867	1,1	2,5
	895	27,8	35,4
	953	0,0	0,3
	983	1,3	2,5
	1024	0,0	0,1
	1069	0,4	0,4
	1256	3,1	4,3
	1344	1,2	5,7

3.1.2 Étude de la perméabilité des co-cultures MTX:MTX-rCYS×12

Une des fonctions majeures du mucus est de protéger l'épithélium des agressions extérieures en formant un filtre sélectif (voir paragraphe 1.1.2.2.2). Dans cette partie, la perméabilité du gel de mucus a été mesurée en déterminant la capacité de particules de 3 μm de diamètre à sédimenter dans le gel sécrété par les co-cultures MTX:MTX-rCYS×12. La Figure 26 A est une reconstitution 3D de la répartition des particules dans le mucus de cellules MTX et de cellules MTX-rCYS×12 obtenue par microscopie confocale. Cette reconstitution met en évidence une diminution de la perméabilité du gel de mucus lorsqu'il est enrichi par la molécule rCYS×12. Après 45 min de sédimentation, une augmentation progressive du nombre de particules présentes dans les sections de mucus les plus lumineuses est mesurée avec l'enrichissement par la molécule rCYS×12 (Figure 26 B). En considérant que les particules se trouvant dans le tiers de la couche de mucus le plus proche de la surface cellulaire ont traversé le gel, alors le pourcentage de particules ayant traversé le mucus après 45 min passe de 81,5 % dans les cultures MTX à 72,1 % dans les cultures MTX-rCYS×12.

Cette modification de la sédimentation passive de particules dans le gel indique des changements des propriétés du mucus qui peuvent potentiellement avoir une influence sur les déplacements actifs de bactéries fréquemment associées aux gels de mucus.

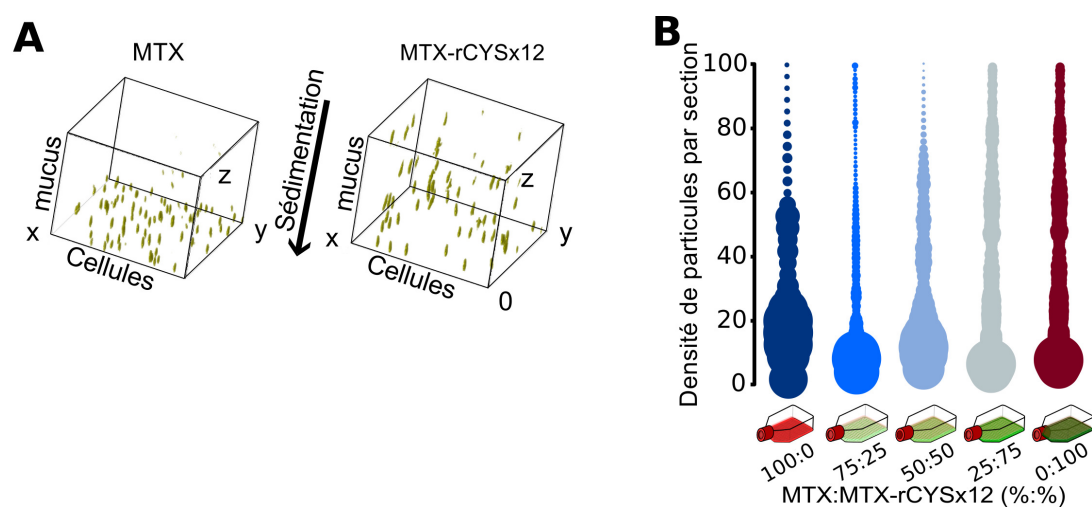


FIGURE 26 – Perméabilité du mucus de co-cultures MTX:MTX-rCYS×12 à des particules de 3 μm de diamètre

A. Distribution des particules de 3 μm de diamètre dans le mucus de cellules MTX et MTX-rCYS×12 après 45 min de sédimentation. **B.** Quantification de la densité de particules en fonction de la section optique de mucus dans les cinq conditions de co-culture MTX:MTX-rCYS×12. La largeur de chaque cercle est proportionnelle au nombre de particules par section. Ces données sont le résultat de deux expériences indépendantes.

3.1.3 Motilité de *Pseudomonas aeruginosa* à la surface des co-cultures MTX:MTX-rCYS×12

Le mucus constitue une barrière qui protège l'épithélium des particules exogènes et des pathogènes. Afin de tester cette capacité de barrière, nous avons mesuré la motilité de pathogènes dans le mucus produit par les co-cultures MTX:MTX-rCYS×12. Dans une première expérience, nous avons utilisé une souche de l'entéropathogène murin *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [Hopkins et al., 2001]. Aucun déplacement de cette bactérie n'a pu être observé. Un des facteurs ayant pu entraîner l'immobilité de *Salmonella enterica* est la nature des mucines sécrétées, majoritairement MUC5AC, qui est normalement exprimée dans l'arbre pulmonaire en situation physiologique (voir Figure 5). La souche PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*, plus adaptée à la sphère pulmonaire, a donc été employée pour réaliser l'étude.

La modélisation des trajectoires bactériennes enregistrées dans le mucus provenant de cultures MTX et MTX-rCYS×12 rend compte de profonds changements dans les modalités de déplacement (Figure 27 A). On observe un plus grand confinement des bactéries dans le mucus enrichi par la molécule rCYS×12. Afin de quantifier le degré de confinement des bactéries, la linéarité des trajectoires a été mesurée dans les cinq conditions de co-culture MTX:MTX-rCYS×12. La linéarité décroît progressivement avec l'enrichissement par rCYS×12 et passe de 0,34 à la surface des cellules MTX à 0,23 à la surface des cellules MTX-rCYS×12, soit une diminution de 32 %. Cette diminution de la linéarité moyenne est principalement due à une augmentation de la proportion de trajectoires confinées (linéarité < 0,3) qui passe de 52 % à la surface des cultures MTX à 72 % à la surface des cellules MTX-rCYS×12. La vitesse de déplacement des bactéries est également impactée par la production de rCYS×12. On note une disparition progressive de la population de

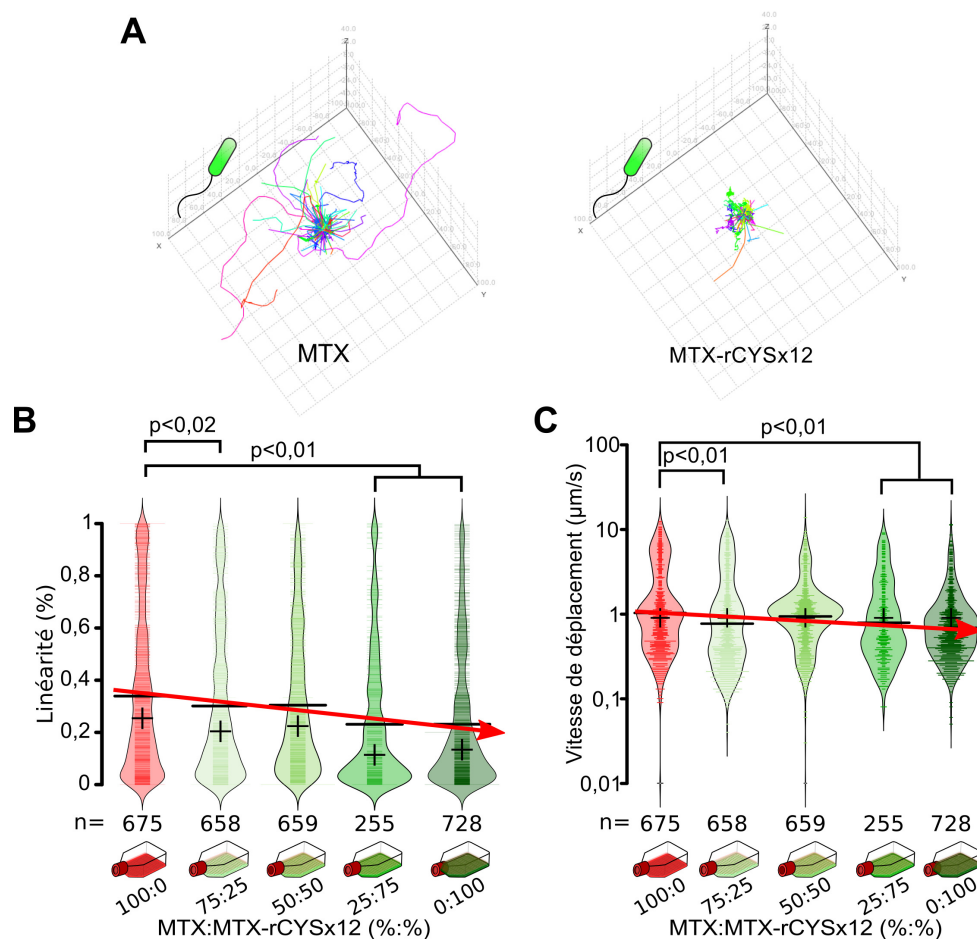


FIGURE 27 – Motilité de *Pseudomonas aeruginosa* à la surface des co-cultures MTX:MTX-rCYS \times 12

A. Trajectoires représentatives de *Pseudomonas aeruginosa* à la surface d’une culture MTX et MTX-rCYS \times 12. **B.** Analyse de la linéarité de *Pseudomonas aeruginosa* à la surface des cinq conditions de co-culture MTX:MTX-rCYS \times 12. **C.** Analyse de la vitesse de déplacement de *Pseudomonas aeruginosa* à la surface des cinq conditions de co-culture MTX:MTX-rCYS \times 12. **B./C.** Les variables mesurées sont représentées à l’aide de *bean plots*. Pour chaque condition, la forme du *bean plot* rend compte de la densité. La ligne horizontale noire représente la moyenne et la croix la médiane. Chaque trait horizontal coloré représente au moins une bactérie. Le nombre de bactéries analysées (n) est indiqué en bas de chaque figure. L’expérience est représentative de 3 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisés à l’aide du test univarié de Wilcoxon–Mann–Whitney.

bactéries les plus rapides ($v > 5 \mu\text{m}/\text{s}$). Cela explique la diminution progressive de la vitesse moyenne de déplacement des bactéries de $1,92 \mu\text{m}/\text{s}$ à la surface de la culture MTX à $1,01 \mu\text{m}/\text{s}$ à la surface de la culture MTX-rCYS \times 12, soit une décélération moyenne de 47 %.

3.2 Étude de la délivrance endogène de la molécule rCYS \times 12 dans le modèle murin Tg222

Nous avons ensuite confronté les résultats obtenus dans le modèle cellulaire MTX avec un modèle intégré produisant la même molécule rCYS \times 12 dans l'intestin [Gouyer et al., 2015].

3.2.1 Motilité de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium dans le mucus colique

Afin de limiter les biais de composition du mucus dus aux variations inter-individuelles, les mucus coliques de 3 à 5 souris appariées et élevées dans la même cage ont été prélevés par grattage puis homogénéisés. Le mucus est dilué (vol./vol.) avec du PBS afin de pouvoir le manipuler aisément, puis employé immédiatement pour les tests de motilité (Figure 28 A). Nous avons utilisé la bactérie *Salmonella enterica* pour réaliser ces tests car nous n'avons pas observé de motilité de *Pseudomonas aeruginosa* dans le mucus colique des souris. Comme pour les tests réalisés sur les cellules MTX, on observe des changements dans les modalités de déplacements des bactéries, notamment un plus grand degré de confinement dans le mucus colique de la souris Tg222, enrichi par rCYS \times 12 (Figure 28 B). La linéarité moyenne passe de 0,65 dans le mucus de souris WT à 0,43 dans celui de souris Tg222, soit une diminution significative de 34 % (Figure 28 C). Cette diminution

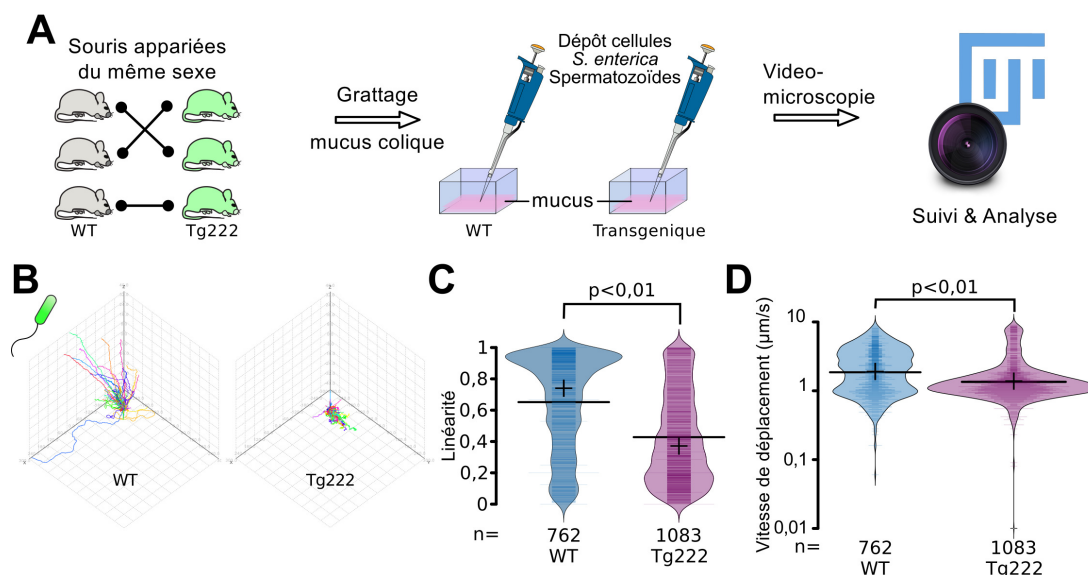


FIGURE 28 – Motilité de *Salmonella enterica* dans le mucus colique de souris WT et Tg222

A. Chaque échantillon de mucus est composé du mucus colique prélevé par grattage de trois à cinq souris appariées et élevées dans la même cage. Les bactéries sont déposées dans le mucus, puis leurs déplacements sont enregistrés par vidéo-microscopie avant d'être analysés à l'aide des logiciels Fiji et Icy. **B.** Trajectoires représentatives de *Salmonella enterica* dans le mucus de souris de type sauvage (WT) et transgéniques (Tg222). **C.** Analyse de la linéarité de *Salmonella enterica* dans le mucus de souris de type sauvage (WT) et transgéniques (Tg222). **D.** Analyse de la vitesse de déplacement de *Salmonella enterica* dans le mucus de souris de type sauvage (WT) et transgéniques (Tg222). **C./D.** Les variables mesurées sont représentées à l'aide de *bean plots*. Pour chaque condition, la forme du *bean plot* rend compte de la densité. La ligne horizontale noire représente la moyenne et la croix la médiane. Chaque trait horizontal coloré représente au moins une bactérie. Le nombre de bactéries analysées (n) est indiqué en bas de chaque figure. L'expérience est représentative de trois expériences indépendantes. Le test univarié de Wilcoxon–Mann–Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique.

de la linéarité est également causée par une augmentation substantielle du pourcentage de trajectoires bactériennes confinées qui passe de 19 à 41 %. La vitesse de déplacement de *Salmonella enterica* est significativement plus faible dans le mucus enrichi par rCYS×12. Celle-ci passe de 2,41 $\mu\text{m/s}$ dans le mucus de souris WT à 1,70 $\mu\text{m/s}$ dans celui de souris Tg222, soit une diminution de 29 % (Figure 28 D).

3.2.2 Motilité de spermatozoïdes murins dans du mucus enrichi par rCYS×12

Les changements de motilité des bactéries dans le mucus enrichi par rCYS×12 suggèrent des changements structuraux et/ou fonctionnels du gel. La motilité de spermatozoïdes est dépendante de la structure du gel, dont la maille ne permet le passage des spermatozoïdes qu'au cours de la phase ovulatoire [Brunelli et al., 2007, Chrétien, 2003]. Cependant le volume de mucus cervical murin est trop faible pour envisager de le prélever et de faire des tests de motilité dans ce gel. Nous avons donc mesuré la motilité de spermatozoïdes murins, rendus fluorescents, dans du mucus colique.

Afin de montrer d'éventuelles modifications structurales du mucus induites par la sécrétion de rCYS×12, la motilité des spermatozoïdes a été analysée par vidéomicroscopie. Similairement à ce qui a été observé avec la bactérie *Salmonella enterica*, les trajectoires des spermatozoïdes sont plus confinées dans le mucus enrichi par rCYS×12 (Figure 29 A). Ces changements des modalités de déplacements sont supportés par une diminution significative de la linéarité des trajectoires qui passe de 0,54 dans le mucus de souris de type sauvage à 0,38 dans le mucus de souris Tg222, soit une diminution de 30 % (Figure 29 B). Une diminution substantielle de 67 % de la vitesse moyenne de déplacement est également mesurée. La vitesse moyenne des spermatozoïdes passe de 139,5 $\mu\text{m/min}$ dans

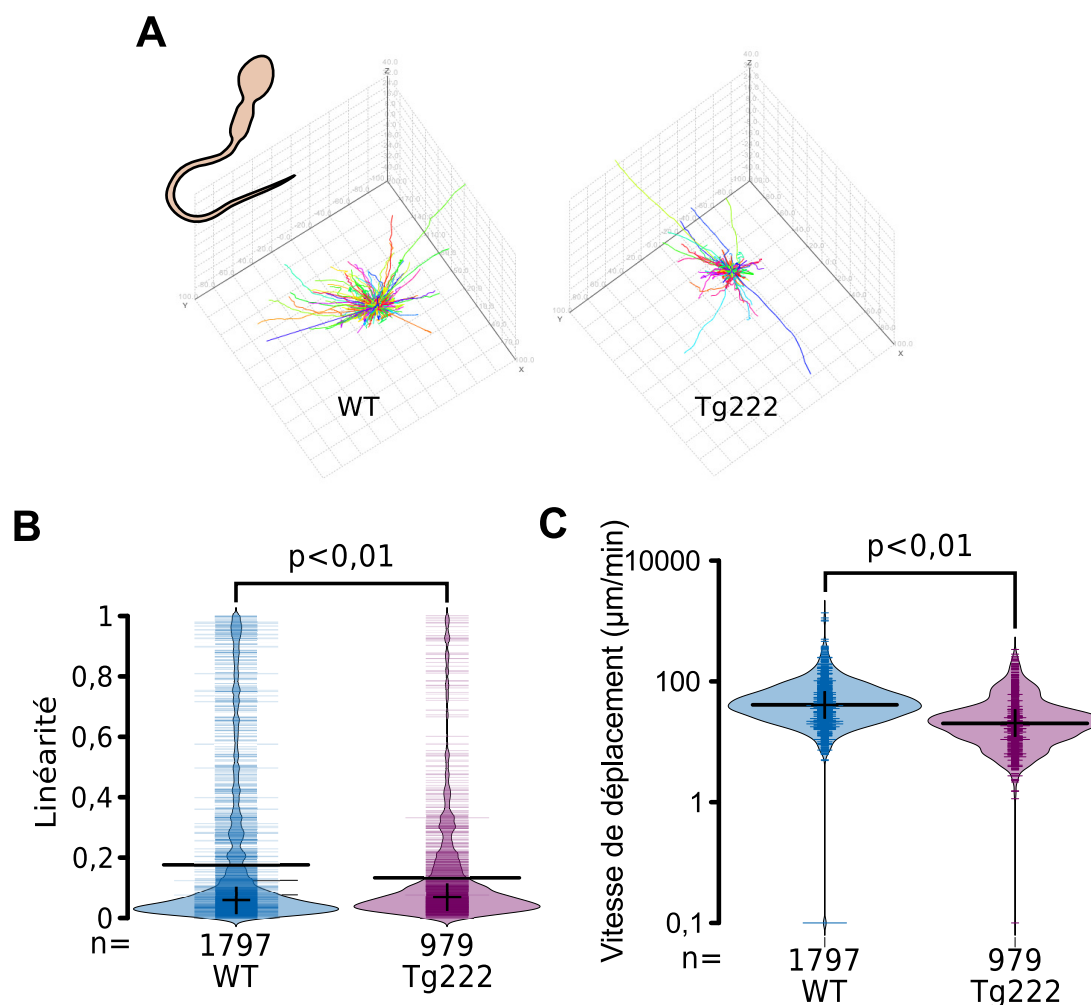


FIGURE 29 – Motilité de spermatozoïdes dans le mucus colique de souris WT et Tg222

A. Trajectoires représentatives de spermatozoïdes dans le mucus de souris de type sauvage (WT) et transgéniques (Tg222). **B.** Analyse de la linéarité de spermatozoïdes dans le mucus de souris de type sauvage (WT) et transgéniques (Tg222). **C.** Analyse de la vitesse de déplacement de spermatozoïdes dans le mucus de souris de type sauvage (WT) et transgéniques (Tg222). **B./C.** Les variables mesurées sont représentées à l'aide de *bean plots*. Pour chaque condition la forme du *bean plot* rend compte de la densité. La ligne horizontale noire représente la moyenne et la croix la médiane. Chaque trait horizontal coloré représente au moins un spermatozoïde. Le nombre de spermatozoïdes analysés (n) est indiqué en bas de chaque figure. L'expérience est représentative de trois expériences indépendantes. Le test univarié de Wilcoxon–Mann–Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique.

le mucus de souris de type sauvage à $46,9 \mu\text{m}/\text{min}$ dans celui des souris Tg222 (Figure 29 C).

Ces résultats montrent que l'enrichissement du mucus par rCYS \times 12 a un impact sur la motilité cellulaire. Afin d'avoir une vision plus complète des changements des propriétés du mucus induits par la sécrétion de rCYS \times 12, les propriétés micro-rhéologiques du mucus colique de souris de type sauvage et de souris Tg222 ont été déterminées par l'étude de la diffusion de micro- et nanoparticules.

3.2.3 Propriétés macro- et micro-rhéologiques du mucus colique

3.2.3.1 Caractérisation des particules

Les nano- et microparticules utilisées sont couvertes par du PEG de faible masse moléculaire (3,4 kDa), afin de limiter les interactions électrostatiques avec les mucines gélifiantes, qui fausseraient les mesures de diffusion. Pour ce faire, les groupements amine portés par le PEG sont liés, de manière covalente, aux groupements carboxyles à la surface des particules. La liaison efficace entre les groupements amine et carboxyle est vérifiée par incubation avec de l'avidine couplée à la rhodamine, qui fluoresce dans le rouge. En effet, l'avidine ne peut s'adsorber à la surface des particules couvertes par le PEG, contrairement aux particules carboxylées (Figure 30). La neutralisation de la surface des particules est confirmée par mesure du potentiel ζ grâce à la diffusion dynamique de la lumière. Cette technique est également employée afin de déterminer la taille des particules en suspension. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 9 ci-dessous :

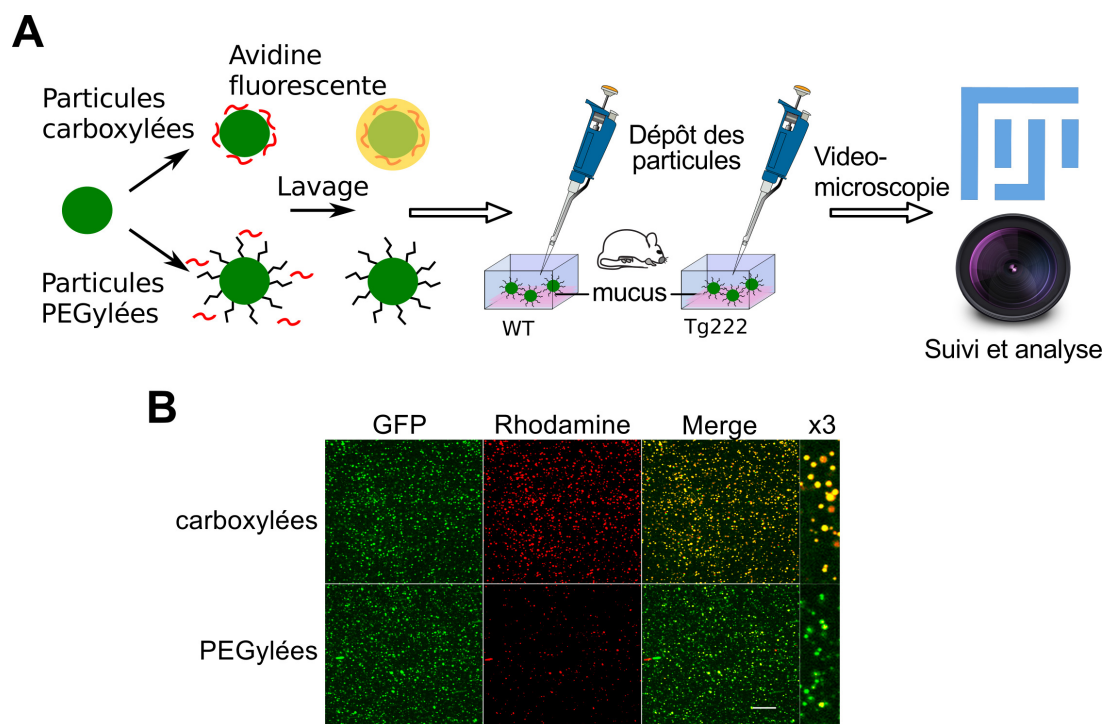


FIGURE 30 – PEGylation des nano- et microparticules

A. Schéma du dispositif expérimental permettant d'étudier la diffusion de nano- et microparticules dans le mucus. Le PEG empêche l'adsorption de l'avidine couplée à la rhodamine (rouge) à la surface des nanoparticules. La PEGylation efficace est donc visualisée en superposant les canaux correspondant à l'émission de fluorescence rouge et verte qui résulte en une fluorescence verte si les billes sont PEGylées. Après avoir été PEGylées, les particules sont déposées dans le mucus prélevé puis, à l'équilibre, leurs déplacements sont enregistrés par vidéo microscopie afin d'être analysés à l'aide des logiciels Fiji et Icy.

B. Confirmation du recouvrement des particules fluorescentes de 200 nm (vert) par une incubation avec de l'avidine couplée à la rhodamine (rouge). Les particules non PEGylées apparaissent jaunes quand on superpose les canaux correspondant aux fluorescences rouge et verte (voir le grossissement $\times 3$) contrairement aux particules PEGylées qui apparaissent vertes. Barre d'échelle : 50 μm .

Tableau 9 – Caractérisation des particules par diffusion dynamique de la lumière

Particule	Taille (nm)	potentiel ζ (mV)
1 μm -COOH	1034	$-41,6 \pm 4,1$
1 μm -PEG	1259	$-5,0 \pm 0,0$
200 nm-COOH	226	$-46,9 \pm 0,0$
200 nm-PEG	325	$-5,5 \pm 0,0$

La PEGylation des particules a donc permis de neutraliser leurs surfaces, comme illustré par les valeurs de potentiel ζ mesurées qui s'approchent de 0 mV. Une fois la PEGylation confirmée, les particules sont diluées puis mélangées à du mucus fraîchement prélevé afin de mesurer leur diffusion.

3.2.3.2 Propriétés micro-rhéologiques du mucus à l'échelle nanométrique

Les nanoparticules de 200 nm de diamètre ont été utilisées afin de tester les propriétés du mucus colique à une échelle avoisinant sa maille moyenne [Ensign et al., 2013]. À l'équilibre, les déplacements aléatoires des nanoparticules dans le mucus suivent un mouvement Brownien. L'extraction des coordonnées des particules en fonction du temps permet de calculer leurs déplacements quadratiques moyens (MSD) en fonction du temps, qui traduit la capacité des particules à diffuser dans le fluide et, par extension, de déterminer les propriétés mécaniques que le fluide exerce sur elles.

Les taux de diffusion sont systématiquement plus élevés dans le mucus colique des souris de type sauvage en comparaison avec celui des souris Tg222, comme illustré par les courbes du déplacement quadratique moyen (Figure 31 A). De plus, le coefficient directeur des courbes de déplacement quadratique, en échelle logarithmique, ou loi de puissance locale du déplacement quadratique moyen α , témoigne de l'entrave qu'exerce la matrice de mucines gélifiantes sur la diffusion Brownienne de la particule. Le coefficient

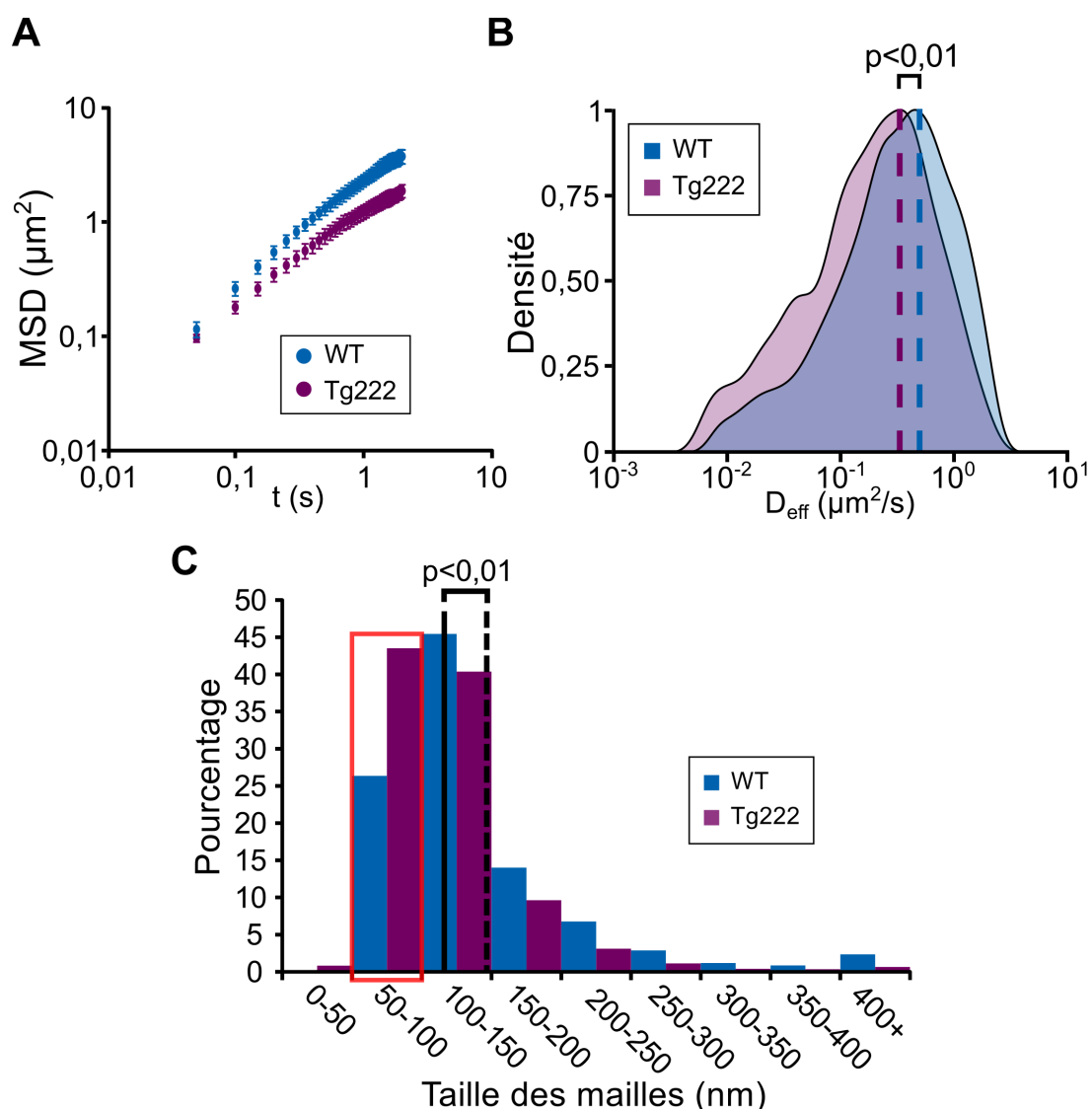


FIGURE 31 – Diffusion de nanoparticules de 200 nm de diamètre dans le mucus colique de souris WT et Tg222

A. Déplacement quadratique moyen (MSD \pm s.e.m.) de nanoparticules de 200 nm de diamètre dans le mucus colique de souris de type sauvage (WT ; bleu) et transgéniques sécrétant la protéine rCYS \times 12 (Tg222 ; violet). **B.** Distribution des coefficients de diffusion ($t = 1$ s) des nanoparticules de 200 nm de diamètre dans le mucus colique de souris WT (bleu) et Tg222 (violet). Les valeurs inférieures à l'incertitude ont été exclues de l'analyse. La valeur moyenne est représentée par une ligne pointillée verticale. Les moyennes sont comparées à l'aide du test de Wilcoxon–Mann–Whitney. **C.** Détermination du profil de distribution des mailles du mucus colique de souris WT (bleu) et Tg222 (violet) à partir des coefficients de diffusion à $t = 1$ s grâce à l'*obstruction scaling model*.

Il y a une augmentation de la prévalence des mailles de taille inférieure à 100 nm dans le mucus de souris Tg222 en comparaison avec les souris WT (rectangle rouge). La maille moyenne du mucus colique de souris Tg222 est représentée par une ligne verticale continue et celle de souris WT par une ligne verticale pointillée. Les échantillons sont comparés grâce au test de Wilcoxon–Mann–Whitney. **A.–C.** Les données sont groupées à partir de cinq expériences indépendantes.

α passe de 0,83 pour le mucus colique de souris de type sauvage, à 0,70 pour celui des souris transgéniques, ce qui indique une plus grande obstruction dans le mucus enrichi par rCYS \times 12. La distribution des coefficients de diffusion des nanoparticules dans le mucus est illustrée en Figure 31 B. Une prévalence des particules ayant des taux de diffusion faibles est observée dans le mucus enrichi par rCYS \times 12 en comparaison avec le mucus de souris de type sauvages. Le coefficient de diffusion moyen, représenté par une ligne pointillée verticale, est de $0,580 \mu\text{m}^2/\text{s}$ dans le mucus colique de souris de type sauvage (bleu) contre $0,310 \mu\text{m}^2/\text{s}$ dans celui de souris transgéniques (violet), soit une diminution de 47 %. Ce phénomène peut être expliqué par l’augmentation de la proportion de nanoparticules piégées dans le gel de mucus qui passe de 4,7 % dans le mucus des souris de type sauvage à 13,4 % dans celui des souris transgéniques.

L’*obstruction scaling model* développé par Amsden permet d’évaluer la taille des mailles formées par les polymères de mucines gélifiantes à partir de la diffusion de particules [Amsden, 1998, Amsden, 1999]. Ce modèle a été développé pour des gels homogènes, et est applicable pour les hydrogels [Hadjiev and Amsden, 2015]. Le mucus est un gel hétérogène à l’échelle macroscopique [Wagner et al., 2017] mais il peut localement être considéré comme isotrope, ce qui est compatible avec l’utilisation de l’*obstruction scaling model* [Lai et al., 2007, Wang et al., 2011, Lai et al., 2011a, Lai et al., 2010]. L’*obstruction scaling model* a été appliqué aux coefficients de diffusion calculés dans cinq expériences indépendantes. Les résultats sont présentés dans la Figure 31 C. Une diminution signi-

ficative de la maille moyenne du mucus est mesurée dans le mucus colique des souris transgéniques comparée à celle de souris de type sauvage. La maille moyenne du mucus colique passe de 148 nm dans le mucus de souris de type sauvage à 118 nm dans celui des souris transgéniques, soit une diminution de 20,3 %. Ce changement structural peut être imputé à une augmentation de la prévalence des mailles de taille inférieure à 100 nm dans le mucus colique des souris transgéniques en comparaison avec les souris de type sauvage (Figure 31 C).

3.2.3.3 Propriétés micro-rhéologiques du mucus à l'échelle micrométrique

Afin de déterminer l'environnement dans lequel évoluent les bactéries et spermatozoïdes, la diffusion passive de particules de 1 μm de diamètre est étudiée. Le taux de diffusion des particules de 1 μm est inférieur dans le mucus des souris transgéniques en comparaison avec celui de souris de type sauvage, ce qui confirme les résultats obtenus avec les particules de 200 nm (Figure 32 A). Le coefficient α passe de 1,01 dans le mucus colique de souris de type sauvage à 0,88 dans celui de souris Tg222, confirmant une plus grande obstruction du réseau de mucines gélifiantes enrichi par rCYS \times 12 à la diffusion de particules de taille micrométrique. La distribution des coefficients de diffusion met en évidence une augmentation de la prévalence des coefficients de diffusion faibles dans le mucus colique provenant de souris transgéniques. Il en résulte une diminution significative du coefficient de diffusion moyen qui passe de 0,181 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ dans le mucus colique de souris de type sauvage à 0,073 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ dans celui de souris transgéniques, soit une diminution de 60 % (Figure 32 B). Le produit du déplacement quadratique par le rayon des particules indique qu'à ces échelles, le taux de diffusion mesuré est indépendant de la taille des particules (Figure 32 C).

Ces résultats indiquent que la sécrétion de rCYS \times 12 induit des changements structu-

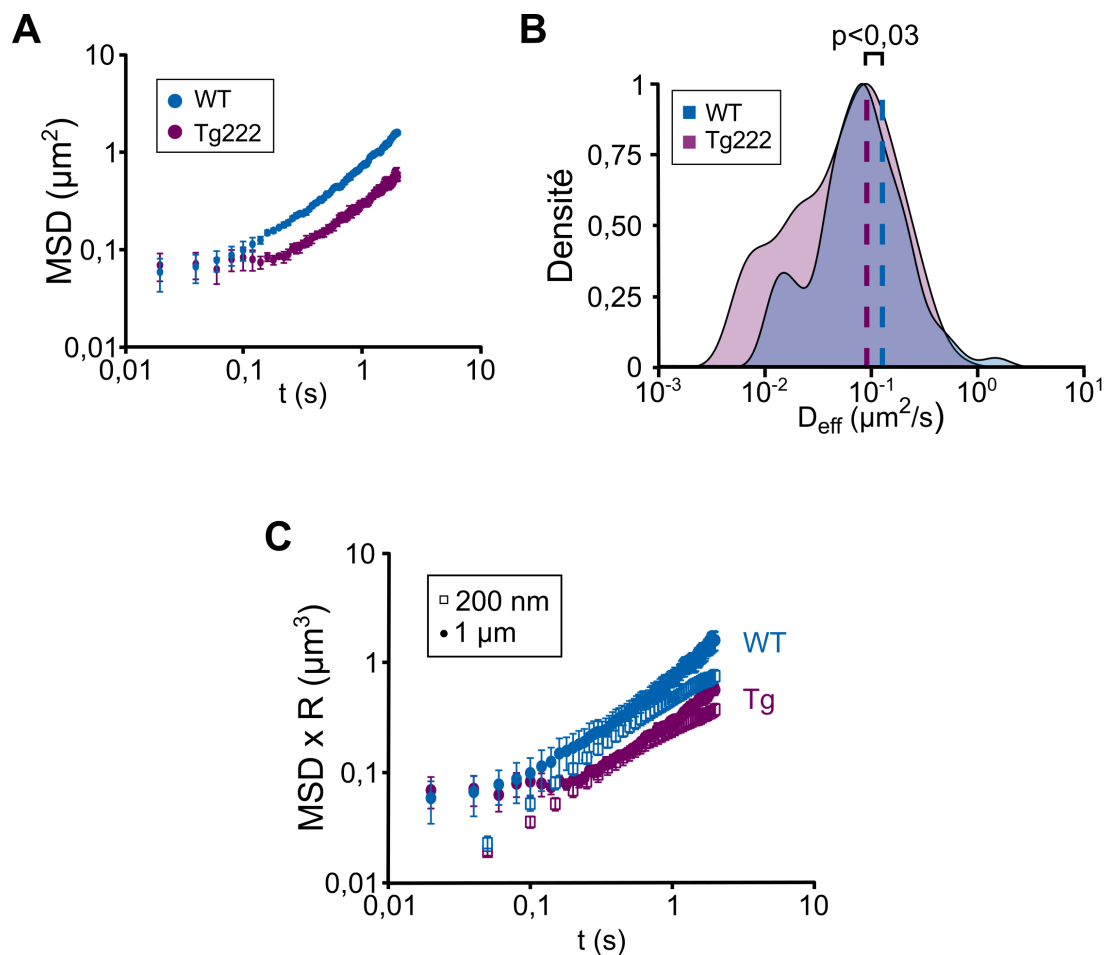


FIGURE 32 – Diffusion de nanoparticules de 1 μm dans le mucus colique de souris WT et Tg222

A. Déplacement quadratique moyen (MSD \pm s.e.m.) de nanoparticules de 1 μm de diamètre dans le mucus colique de souris de type sauvage (WT; bleu) ou transgéniques sécrétant la protéine rCYS \times 12 (Tg222; violet). **B.** Distribution des coefficients de diffusion ($t = 1$ s) des nanoparticules de 1 μm dans le mucus colique de souris WT (bleu) et Tg222 (violet). Les valeurs inférieures à l'incertitude ont été exclues de l'analyse. La valeur moyenne est représentée par une ligne pointillée verticale. Les moyennes sont comparées à l'aide du test de Wilcoxon–Mann–Whitney. **C.** Déplacements quadratiques de particules de 200 nm (symboles pleins) et 1 μm (symboles vides) dans le mucus de souris de type sauvage (bleu) et transgéniques (violet) proportionnés par leurs rayons.

raux du gel de mucus qui le rendent plus obstructif à la diffusion passive de particules comprises entre 0,2 et 1 μm . Ce phénomène apporte une explication aux différences observées de motilité de bactéries et spermatozoïdes.

3.3 Développement de modèles produisant rCYS \times 3

Le domaine CYS des mucines gélifiantes a un grand intérêt dans le développement de molécules capables de renforcer les gels de mucus dans des contextes pathologiques, tels que la rectocolite hémorragique ou la vaginose bactérienne. Pour pouvoir être délivrées de manière exogène, ces molécules doivent, dans un premier temps, être produites sous forme de molécules recombinantes, puis purifiées. Le choix de la molécule à produire est important. Dans la nature, toutes les molécules qui ont des domaines CYS en possèdent plusieurs copies, suggérant qu'au moins deux domaines CYS sont nécessaires pour exercer une fonction biologique (Tableau 4). Dans la mucine gélifiante MUC5B, quatre des sept domaines CYS sont régulièrement espacés. Une distance minimale est donc probablement nécessaire à ce domaine pour exercer sa fonction. Nous avons donc choisi de développer des modèles produisant une molécule constituée de 3 domaines CYS (rCYS \times 3) afin de potentialiser d'éventuelles interactions avec la matrice protéique du mucus.

3.3.1 Production de rCYS \times 3 dans le modèle *Pichia pastoris*

Initialement brevetée par l'entreprise Phillips Petroleum dans les années 1970, la levure *Pichia pastoris* était transformée en complément alimentaire pour les animaux. Son intérêt principal était de pouvoir fermenter à des densités très importantes. Ce n'est que dans les années 1980 que cette levure a été exploitée pour la production de protéines hétérologues en utilisant le promoteur fort *AOX1*. Les principaux avantages de *Pichia pastoris* sont le statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*) dont elle bénéficie, et qui

permet notamment à l'industrie pharmaceutique de l'employer pour la production de molécules à visée thérapeutique, et ses rendements de production pouvant atteindre plusieurs grammes par litre de culture [Ahmad et al., 2014].

3.3.1.1 Transformée par le vecteur pPICZ- α -rCYS \times 3

3.3.1.1.1 Production

Après 48 h d'incubation sur des géloses YPD contenant 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Zéocine, les dix clones résistants ont été amplifiés dans 4 mL de milieu minimal (MM ; 1,34 % bases azotées de levures, 4.10^{-5} % biotine, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zéocine, Pénicilline-Streptomycine (100 U/mL ; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) pendant 24 h. Les levures ont ensuite été cultivées en milieu MM contenant 1 % de méthanol pendant 24 h afin d'induire l'expression de la protéine rCYS \times 3. La présence de rCYS \times 3 est analysée dans la fraction protéique totale du surnageant préalablement précipitée par saturation avec du sulfate d'ammonium (concentration finale : 80 %) et dans le lysat cellulaire. La protéine rCYS \times 3 est indétectable dans le surnageant contrairement au lysat cellulaire (Figure 33 A). Parmi les clones testés, les clones 35 et 49 ont les rendements les plus importants. Une protéine majeure à un poids moléculaire apparent de \simeq 60 kDa est détectée par l'anticorps Eu1/Eu2 dirigé contre le domaine CYS. D'autres protéines, de poids moléculaires apparents plus faibles, sont détectées et correspondent très probablement à des intermédiaires de synthèse.

La cinétique de production a été déterminée avec le clone 49. Après 24 h de croissance en milieu MM contenant 1 % de glycérol (DO = 1,55), le milieu a été remplacé par du milieu MM contenant 1 % de méthanol. Le méthanol a été renouvelé toutes les 24 h et 10 mL de culture ont été prélevés pour l'analyse. La protéine est détectée dans le lysat et dans le surnageant concentré 10 fois par saturation avec du sulfate d'ammonium (80 %).

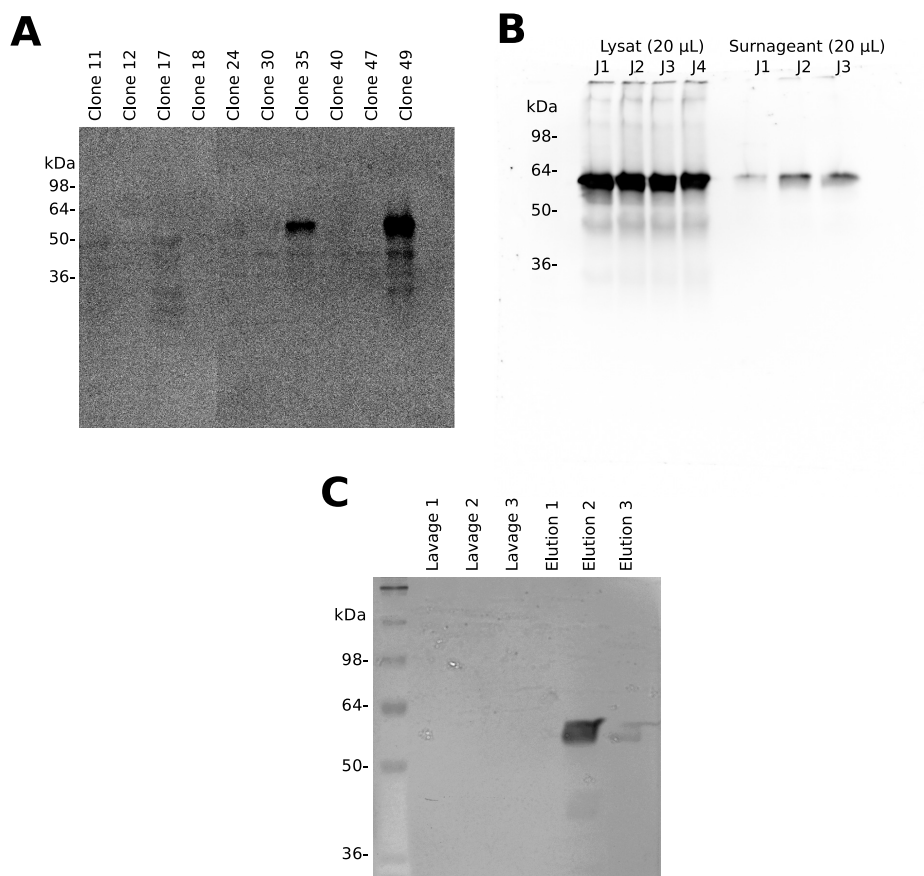


FIGURE 33 – Production et purification de rCYS \times 3 par la levure *Pichia pastoris* transformée par le vecteur pPICZ- α -rCYS \times 3

A. Analyse par Western blot des lysats cellulaires de clones de *Pichia pastoris* transformés par le vecteur pPICZ- α -rCYS \times 3 et résistants à 1000 μ g/mL de zéocine. L'analyse est réalisée en conditions dénaturantes avec l'anticorps primaire Eu1/Eu2. **B.** Cinétique de production de rCYS \times 3 par le clone 49 déterminée par analyse Western blot. L'analyse a été réalisée en conditions dénaturantes avec l'anticorps primaire Eu1/Eu2. **C.** Coloration à l'argent des protéines purifiées dans le lysat cellulaire du clone 49.

D'après l'analyse des surnageants par Western blot, la durée optimale d'induction est 48 h (J2, Figure 33 B). L'analyse des lysats cellulaires par Western blot indique que la majeure partie de la production de la protéine recombinante est retenue dans la cellule, et ce malgré la présence du signal de sécrétion.

3.3.1.1.2 Purification

Des essais de purification sur une culture de 100 mL ont été menés. Les levures sont cultivées dans du milieu MM contenant 1 % de glycérol pendant 48 h puis en milieu MM contenant 1 % de méthanol pendant 48 h. Le méthanol est renouvelé au bout de 24 h. La purification est réalisée comme décrit au paragraphe 2.4.1.1. On détecte une protéine majeure dans la fraction d'élution n°2, à un poids moléculaire apparent de $\simeq 60$ kDa, ce qui correspond à la protéine détectée par Western blot (clone 49) dans la Figure 33 B. La culture de la levure a ensuite été réalisée dans les milieux BMGY/BMMY, plus adaptés à la production de protéines recombinantes.

3.3.1.2 Transformée par le vecteur pPICZ- Δ FSS-rCYS \times 3

La transformation de *Pichia pastoris* par le vecteur pPICZ- Δ FSS-rCYS \times 3, selon la même méthodologie que celle décrite pour le vecteur pPICZ- α -rCYS \times 3, a permis d'obtenir six clones résistants à 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de zéocine. Ces clones expriment tous une protéine majeure reconnue par l'anticorps Eu1/Eu2 à un poids moléculaire apparent de $\simeq 50$ kDa (Figure 34 A). Le clone 5 a été sélectionné pour réaliser une cinétique de production de rCYS \times 3. La molécule est présente à une concentration maximale un jour après le début de l'induction (Figure 34 B). La délétion du facteur de sécrétion α -FSS ne permettant pas d'améliorer la production de rCYS \times 3 (comparer Figures 33 B et 34 B), la purification a donc été réalisée sur le clone 49 (Figure 33 C).

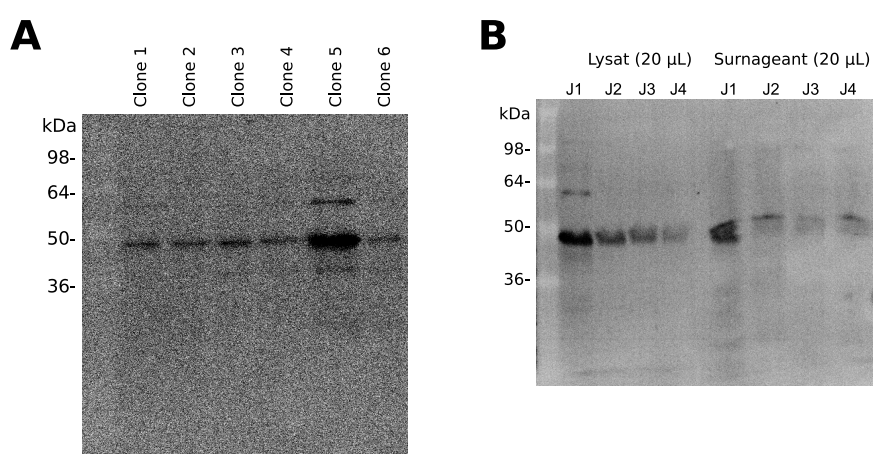


FIGURE 34 – Production et purification de rCYS \times 3 par la levure *Pichia pastoris* transformée par le vecteur pPICZ- Δ FSS-rCYS \times 3

A. Analyse par Western blot des lysats cellulaires de clones de *Pichia pastoris* transformés par le vecteur pPICZ- Δ FSS-rCYS \times 3 et résistants à 1000 μ g/mL de zéocine. L'analyse est réalisée en conditions dénaturantes avec l'anticorps primaire Eu1/Eu2. **B.** Cinétique de production de rCYS \times 3 par le clone 5 déterminée par analyse Western blot. L'analyse a été réalisée en conditions dénaturantes avec l'anticorps primaire Eu1/Eu2.

3.3.2 Production de rCYS×3 dans la lignée cellulaire HEK293

3.3.2.1 Production et purification de GST-rCYS×3

3.3.2.1.1 Production

Les clones HEK293 recombinants résistants à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 ont été piqués au bout de 14 jours puis amplifiés. Une première phase de sélection a été réalisée en déterminant si les clones expriment la luciférase. Les neuf clones possédant l'activité luciférase la plus élevée ont été amplifiés en T25 jusqu'à confluence, où le milieu EMEM complet a été remplacé par du milieu EMEM sans sérum. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été lysées et le milieu conservé.

L'analyse Western blot des lysats cellulaires révèle la présence d'une protéine majeure à un poids moléculaire apparent de 64 kDa, en accord avec le poids moléculaire théorique de la protéine GST-rCYS×3 (Figure 35 A). La reconnaissance de cette protéine par l'anticorps Eu1/Eu2 confirme son identité avec le domaine CYS humain. La membrane a ensuite été hybridée avec un anticorps anti- β -actine comme témoin de charge. L'analyse des surnageants par Western blot montre que la protéine GST-rCYS×3 est sécrétée et son profil électrophorétique indique l'absence, ou quasi-absence, de modifications post-traductionnelles (Figure 35 B). Afin de déterminer le clone le plus productif, le ratio du signal correspondant à la protéine GST-rCYS×3 dans le lysat a été normalisé, par densitométrie, avec celui de la β -actine (Figure 35 C). D'après cette analyse, le clone B12 fournit le meilleur rendement.

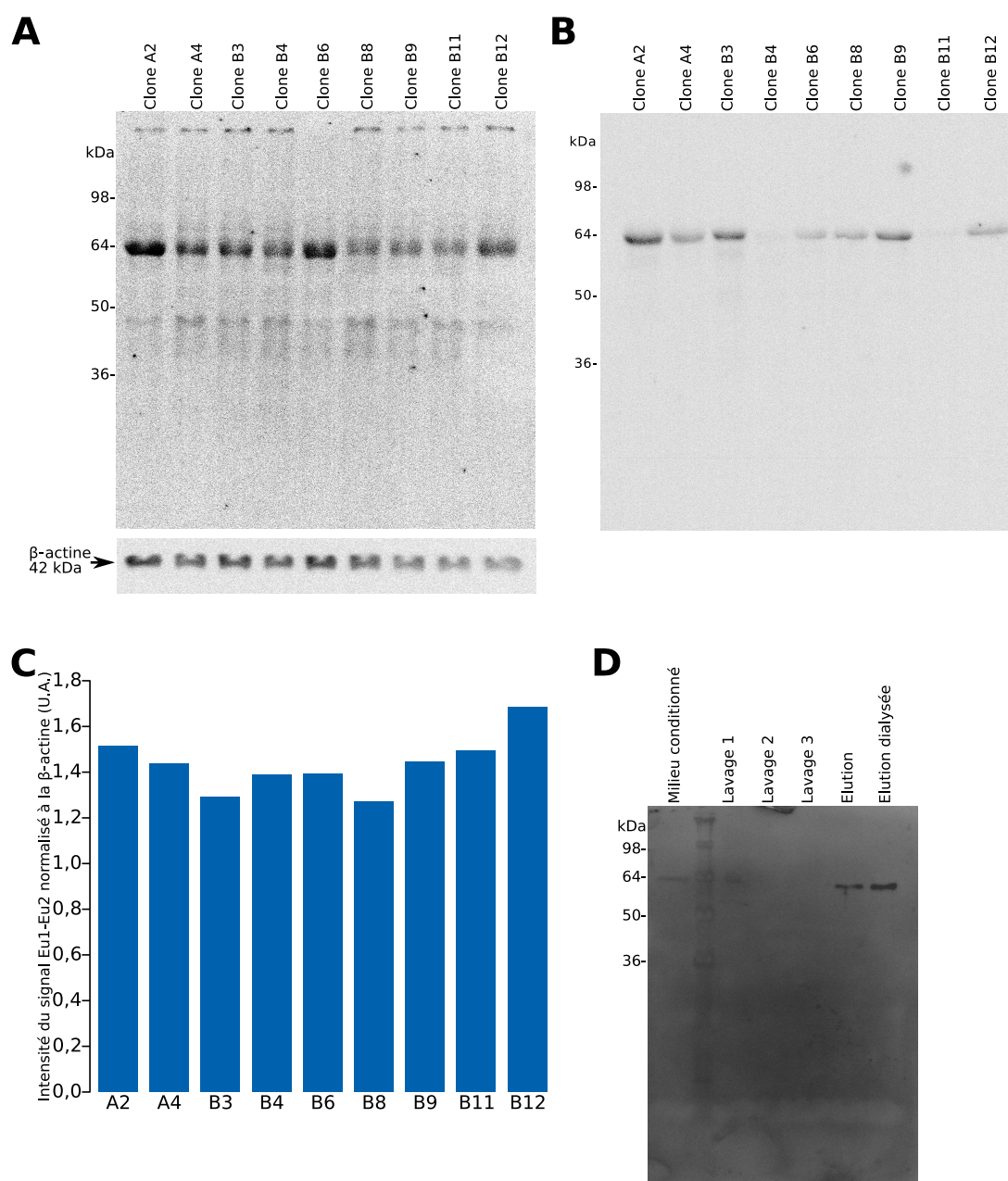


FIGURE 35 – Production et purification de GST-rCYS \times 3 par la lignée cellulaire HEK293

A. Analyse par Western blot des lysats cellulaires de clones HEK293 luciférase-positifs. Le dépôt est normalisé à 20 μ g de protéines totales. L'analyse est réalisée en conditions dénaturantes avec l'anticorps primaire Eu1/Eu2 et un anticorps dirigé contre la β -actine. **B.** Analyse par Western blot des surnageants de culture des clones HEK293 luciférase-positifs. L'analyse est réalisée en conditions dénaturantes avec l'anticorps Eu1/Eu2.

C. Quantification de la production de rCYS×3 dans les lysats des clones luciférase-positifs par densitométrie. Le signal correspondant à GST-rCYS×3 est normalisé à celui de la β -actine. **D.** Purification de GST-rCYS×3 dans le surnageant de culture du clone B12. L'analyse a été effectuée en conditions dénaturantes avec un anticorps dirigé contre la GST.

3.3.2.1.2 Purification

Le clone B12 a donc été amplifié dans neuf flacons de culture cellulaire (T75) jusqu'à confluence, puis le milieu EMEM complet a été remplacé par du milieu EMEM sans sérum de veau fœtal. Vingt-quatre heures plus tard, le milieu a été récupéré, puis la protéine GST-rCYS×3 a été purifiée par chromatographie d'affinité grâce au tag GST. L'analyse du milieu de culture après 24 h (milieu conditionné), des trois fractions de lavage de la résine, puis de la fraction d'élution, par Western blot, révèle la présence de la protéine GST-rCYS×3 dans le milieu conditionné et dans l'élution de la résine (Figure 35 D). La fraction d'élution a été dialysée sur la nuit à 4°C avant d'en mesurer la concentration protéique par dosage de Bradford. La concentration protéique est de 0,92 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, ce qui porte le rendement de production de GST-rCYS×3 à 5,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de milieu conditionné.

La culture des cellules HEK293 en absence de sérum de veau fœtal ne peut être prolongée plus de 24 h sans entraîner la mort cellulaire. Cela nous oblige à utiliser un milieu complet pour prolonger la durée de production de la protéine GST-rCYS×3. Un essai de purification a été mené sur un volume de 250 mL de milieu conditionné (milieu EMEM complet) en collectant le milieu de cinq T75 tous les jours pendant cinq jours. La présence du sérum de veau fœtal ne permet pas de purifier la protéine GST-rCYS×3 avec un rendement supérieur à celui obtenu précédemment (données non montrées), probablement à cause d'une saturation de la résine par l'albumine contenue dans le sérum de veau fœtal empêchant la bonne fixation de la protéine GST-rCYS×3.

3.3.2.2 Caractérisation de GST-rCYS×3 par spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse (MS-MS) de la protéine éluée lors de la purification illustrée en Figure 35 D a été réalisée en collaboration avec le Dr. Robbe-Masselot et le Dr. Cieniewski-Bernard. Celle-ci a permis d'identifier deux peptides appartenant à la séquence de la protéine GST-rCYS×3. Ces peptides (AAGGAV-CEQPLGLECR et ELGQVVECSLDFGLVCR) sont contenus dans la protéine rCYS×3, ce qui permet de confirmer la production de la protéine attendue. D'autres analyses sont actuellement en cours afin d'améliorer la couverture de GST-rCYS×3 et de déterminer la structure secondaire du domaine CYS.

4 Discussion et perspectives

Mon travail de thèse avait pour objectif d'explorer l'effet d'un enrichissement du mucus par des molécules constituées de domaines CYS. Pour ce faire, nous avons employé deux stratégies complémentaires. La première visait à tester l'effet d'une molécule constituée de 12 domaines CYS sur les propriétés du mucus, par une approche de délivrance endogène, tandis que la seconde avait pour but de développer des modèles produisant une molécule constituée de trois domaines CYS afin de tester si il est possible de reproduire l'effet de la délivrance endogène de domaines CYS par une stratégie de délivrance exogène. Cette seconde approche avait pour finalité de rendre le gel de mucus plus protecteur dans des contextes pathologiques où des défaillances sont observées, telles que dans le rectocolite hémorragique.

4.1 Modifications du gel de mucus par la co-sécrétion de rCYS \times 12 avec les mucines gélifiantes

4.1.1 Perméabilité des gels de mucus

Des modifications de la perméabilité des gels de mucus sont observées dans des contextes pathologiques tels que la rectocolite hémorragique [Johansson et al., 2014], la mucoviscidose [Gustafsson et al., 2012] ou les naissances

prématurées [Critchfield et al., 2013]. Ces changements des propriétés fonctionnelles du gel résultent de modifications de sa structure, induites par une dérégulation de l'environnement physico-chimique et/ou biologique des mucines gélifiantes [Witten et al., 2018, Lieleg et al., 2010]. Bien que les gels de mucus aient, en moyenne, une taille de maille bien inférieure à celle des particules utilisées dans les analyses de sédimentation, la dynamique d'association/dissociation des mucines gélifiantes permet la sédimentation de particules de taille supérieure à $1 \mu\text{m}$ de diamètre, sous l'effet de leur propre inertie, à des échelles de temps longues [Heyder, 2004]. Au cours d'un travail antérieur, une diminution de la perméabilité du gel de mucus colique à des particules carboxylées de $1 \mu\text{m}$ de diamètre avait été mesurée chez les souris Tg222 [Gouyer et al., 2015, Desseyn et al., 2016]. La reproductibilité de ces résultats dans le modèle cellulaire MTX-rCYS \times 12 confirme le renforcement de la barrière muqueuse, par l'enrichissement en domaine CYS, et permet donc d'exclure tout effet de la différence de microbiote observée entre dans mucus de souris de type sauvage et celui de souris Tg222.

4.1.2 Motilité de bactéries dans le mucus

Une des fonctions majeures du mucus est de former une barrière qui prévient l'accès des pathogènes à l'épithélium, ce qui évite de saturer le système immunitaire [Zarepour et al., 2013]. La présence de flagelle(s) est une adaptation des pathogènes qui leur permet de franchir la couche de mucus pour coloniser et/ou infecter l'épithélium. C'est pourquoi l'organisme a développé des mécanismes de défense qui ciblent les bactéries flagellées [Okumura et al., 2016]. L'étude de la motilité des micro-organismes est donc un modèle d'étude pertinent pour quantifier le renforcement de la barrière muqueuse.

Dans ce travail une diminution de la motilité de *Pseudomonas aeruginosa* est mesurée dans le mucus enrichi par rCYS \times 12. Ce phénomène est également observé lorsque les mi-

lieux de culture sont supplémentés avec des mucines gélifiantes [Schick and Kassen, 2018]. À des concentrations physiologiques (0,5 %), les mucines gélifiantes maintiennent *Pseudomonas aeruginosa* sous forme planctonique [Caldara et al., 2012, Co et al., 2018], tandis que lorsque leur concentration atteint des niveaux pathologiques, mimant ceux observés dans la mucoviscidose (8 %), *Pseudomonas aeruginosa* se multiplie sous forme de biofilms [Matsui et al., 2006]. De part son ultra-structure, dépendante de la concentration des mucines gélifiantes, le mucus agit donc comme un élément régulateur de la motilité et du mode de croissance des micro-organismes. La délivrance de rCYS×12 induit un remodelage de la matrice de mucus en réduisant la taille des mailles du gel. Il serait intéressant de tester si, à des concentrations physiologiques de mucines gélifiantes, la délivrance de molécules composées de domaines CYS, par exemple celle produite dans la lignée HEK293, favorise ou non la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* sous forme de biofilm. Si ce n'était pas le cas, alors un facteur autre que la structure du mucus entrerait en ligne de compte dans la croissance en biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*. La motilité de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium a été étudiée dans le mucus colique de souris de type sauvage et Tg222. Les résultats obtenus sont concordants avec ceux observés pour *Pseudomonas aeruginosa*, à savoir une diminution de la motilité dans le mucus enrichi par rCYS×12. Une étude récente montre que *Salmonella enterica* est un bon indicateur de l'hétérogénéité du mucus intestinal, et que c'est sa propulsion, à l'aide de flagelles, qui lui permet de traverser la couche de mucus au contact de l'épithélium [Furter et al., 2019]. Cela explique pourquoi le mutant immotile *fliGHI* de *Salmonella enterica* a des capacités d'invasion réduites comparé à la souche sauvage [Stecher et al., 2004].

Dans notre étude, la motilité bactérienne dans le mucus a une répartition bimodale (Figures 27 C et 28 C). Cette répartition tend à s'uniformiser à des valeurs plus faibles avec l'enrichissement par rCYS×12, ce qui pourrait indiquer le piégeage et/ou l'adhésion

des bactéries. Une augmentation de la viscosité du gel de mucus pourrait également être la cause de la diminution de la motilité de *Pseudomonas aeruginosa* et, hypothétiquement, de *Salmonella enterica* [Greenberg and Canale-Parola, 1977, Schneider and Doetsch, 1974]. Carlson *et coll.* ont étudié la motilité d'une souche d'*Escherichia coli* dans le mucus colique ou dans un tampon borate, et ont montré que la présence de mucus tend à uniformiser les déplacements bactériens [Carlson et al., 2018] tandis que Furter *et coll.* observent une répartition bi-modale des vitesses de déplacement de *Salmonella enterica* dans le mucus colique *in situ* [Furter et al., 2019]. Le dispositif expérimental, la souche bactérienne et la source de mucus doivent donc être pris en compte pour pouvoir comparer les études de motilité. À titre d'exemple, dans notre étude la vitesse moyenne de *Salmonella enterica* est de 2,41 $\mu\text{m/s}$. Celle-ci est de 15,5 $\mu\text{m/s}$ dans le mucus colique *in situ* et 43,2 $\mu\text{m/s}$ dans du milieu de culture. La vitesse moyenne de *Pseudomonas aeruginosa* est de 1,92 $\mu\text{m/s}$ dans notre étude contre 17–18 $\mu\text{m/s}$ dans du mucus cellulaire purifié [Furter et al., 2019, Pontier-Bres et al., 2012, Matsui et al., 2006]. La vitesse de déplacement d'une souche d'*Escherichia coli* est de 17,7 $\mu\text{m/s}$ dans le mucus du côlon distal *in situ* contre 5,6 $\mu\text{m/s}$ dans du mucus colique prélevé par grattage [Carlson et al., 2018, Yildiz et al., 2015a]. La procédure de prélèvement du mucus par grattage ne permet donc pas de prédire la vitesse de déplacement qu'aura un pathogène dans le mucus *in situ*. Le prélèvement du mucus par grattage induit une diminution substantielle de la vitesse de déplacement des microorganismes. Cela explique la vitesse moyenne de déplacement que nous avons mesurée dans le mucus colique murin (0,2–8,8 $\mu\text{m/s}$; moyenne : 2,41 $\mu\text{m/s}$), qui est comparable avec la vitesse de déplacement d'*Escherichia coli* (0,3–22,8 $\mu\text{m/s}$; moyenne : 5,63 $\mu\text{m/s}$). Ces éléments nous permettent de conclure que le mucus prélevé par grattage subit des modifications de structure et/ou de composition, par exemple le mucus pourrait être enrichi par l'ADN de l'épithélium, ce qui contribuerait à l'augmentation de sa viscoélasticité et induirait

des changements de la structure du gel (voir le paragraphe 1.1.2.1.7). Le protocole de prélèvement du mucus par grattage demeure néanmoins plus pertinent que les mucines gélifiantes purifiées, de part la présence du microbiote et la conservation de l'interaction des mucines gélifiantes, largement impliqué dans les propriétés rhéologiques du mucus [Meldrum et al., 2018, Demouveau et al., 2018]. Pour palier ces biais expérimentaux, l'utilisation d'explants de côlon pourrait être envisagée afin de mesurer *in situ* la motilité de bactéries dans le mucus enrichi ou non par rCYS \times 12.

4.1.3 Motilité de spermatozoïdes dans le mucus

Le mucus cervical conditionne la fécondité des mammifères, en régulant la motilité des spermatozoïdes. L'effet de la viscosité du mucus sur la motilité des spermatozoïdes semble être dépendant de l'espèce considérée. Chez l'Homme, il y a une relation inverse entre la viscosité du milieu et la motilité des spermatozoïdes ($v = 78,83\eta^{-0,14}$ où v représente la vitesse de déplacement et η la viscosité du milieu), ce phénomène est également observé dans le cas du sperme bovin ($v = 0,052e^{-0,55\eta}$) [Hyun et al., 2012, Rizvi et al., 2009]. À l'inverse, une étude récente montre qu'une augmentation de la viscosité du milieu augmente la vitesse des spermatozoïdes bovins. Cependant, l'utilisation de milieux synthétiques différents, pour créer artificiellement des milieux aux propriétés rhéologiques différentes, pourrait être un facteur confondant [Tung et al., 2017]. L'augmentation de la viscosité du milieu entraîne une résistance croissante à la déformation. Le déplacement des spermatozoïdes génère donc des forces de friction qui entravent la motilité. Les spermatozoïdes s'adaptent donc à des milieux comme le mucus, dont la viscosité atteint 200 fois celle de l'eau, en augmentant leur métabolisme glycolytique, en réduisant la motilité latérale de la tête et en adaptant la flexion du flagelle [Kirkman-Brown and Smith, 2011].

Dans notre étude, la motilité de spermatozoïdes a été mesurée dans le mucus colique de

souris de type sauvage et Tg222. Notons que la motilité des spermatozoïdes est fortement réduite dans le mucus en comparaison avec le milieu M2 dans lequel ils sont purifiés (données non montrées). Cela suggère que, comme chez l'Homme, les propriétés rhéologiques et/ou structurales du mucus génèrent une résistance à la migration des spermatozoïdes. Les résultats obtenus sont similaires à ceux acquis lors de l'analyse de la motilité de bactéries, à savoir une diminution de la vitesse et de la linéarité des spermatozoïdes dans le mucus enrichi par la molécule rCYS×12, indiquant leur piégeage et/ou adhésion. Les valeurs de vitesse mesurées sont bien inférieures à celle obtenues lors des études citées ci-dessus. Plusieurs facteurs peuvent influencer ce phénomène. La présence du microbiote colique ou l'utilisation d'un mucus obtenu par grattage composé majoritairement de la mucine gélifiante Muc2 sont des éléments ayant un impact potentiel sur la motilité des spermatozoïdes. Malgré ces biais expérimentaux, le maintien de ces conditions expérimentales pour le mucus enrichi par la molécule rCYS×12 ou non nous permet de mettre en évidence un effet de cette molécule sur la motilité des spermatozoïdes.

L'un des défis scientifiques majeurs en biologie de la reproduction sera le développement de contraceptifs non hormonaux. L'une des cibles potentielles de ces médicaments est la barrière de mucus cervical. Une substance capable de renforcer le mucus cervical, de manière à entraver l'ascension des spermatozoïdes, pourra se substituer aux contraceptifs hormonaux conventionnels. Le renforcement des gels de mucus par des molécules exogènes a déjà été publié avec l'utilisation de chitosan de faible poids moléculaire [Kootala et al., 2018], du nonoxynol-9 [Lai et al., 2009a], du TFF3 recombinant [Bastholm et al., 2017] ou des lipides alimentaires [Yildiz et al., 2015c]. D'après nos expériences, le domaine CYS pourrait également agir comme contraceptif non-hormonal, une fois la dose minimale inhibitrice de la motilité des spermatozoïdes déterminée.

4.1.4 Analyse des propriétés micro-rhéologiques des gels de mucus

Pour mieux comprendre comment la délivrance endogène de la molécule rCYS×12 impacte la motilité cellulaire dans le mucus, nous avons déterminé les propriétés rhéologiques du gel à l'échelle du nanomètre et du micromètre, par suivi de particules. Cette technique a l'avantage de rendre compte des hétérogénéités du fluide à des échelles spatiales pertinentes pour des microorganismes ou des molécules [Lai et al., 2009b]. Les particules sont recouvertes de PEG afin d'éliminer toute interaction électrostatique qui interférerait avec le processus de diffusion passive. Ainsi, la viscosité apparente, déterminée par la loi de Stokes–Einstein, est gouvernée par l'échelle spatiale à laquelle l'expérience est réalisée. D'après cette loi, la viscosité apparente du mucus colique est de 3,9 mPa.s pour les souris de type sauvage et 7,3 mPa.s pour les souris transgéniques. En considérant que l'échantillon de mucus est dilué à 50 %, ce qui porte la concentration de mucines gélifiantes à $\simeq 15$ mg/mL, le modèle de Georgiades *et coll.*, 2014 prédit une viscosité apparente 3,3–4,4 mPa.s, ce qui est en accord avec la viscosité mesurée dans le mucus de la souris de type sauvage. En revanche, il y a une nette augmentation de la viscosité dans le mucus enrichi par la molécule rCYS×12. Cette augmentation de la résistance hydrodynamique pourrait donc être une explication à la diminution de la motilité cellulaire dans le mucus colique de la souris transgénique.

La réduction du coefficient de diffusion moyen des particules muco-inertes est le résultat d'un encombrement stérique plus important dans le mucus des souris Tg222. Une dispersion importante des coefficients de diffusion est observée, typiquement entre 10^{-3} et $10^1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, et ce quelque soit le génotype des souris. Ce phénomène est le reflet de l'hétérogénéité des gels de mucus qui présentent des zones plus ou moins

riches en mucines gélifiantes, et donc, des propriétés rhéologiques variables (Figure 36) [Wagner et al., 2017, Macierzanka et al., 2014]. Cependant, la prévalence de coefficients de diffusion faibles ($D_{eff} < 10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$) dans le mucus enrichi par rCYS×12 indique un changement conformationnel des mucines gélifiantes induit par la sécrétion de rCYS×12. En effet, la molécule rCYS×12 pourrait entrer en compétition pour les sites d'interactions hydrophobes des mucines gélifiantes, et ainsi libérer des polymères de mucines gélifiantes agrégés, en faisceau par exemple, entraînant ainsi une augmentation de la réticulation du gel de mucus.

La principale limite de notre étude est l'impossibilité de déterminer à partir de quelle concentration ce renforcement du gel de mucus est observé. C'est pourquoi le développement de modèles recombinants produisant une molécule constituée de domaines CYS permettra de déterminer la concentration minimale nécessaire pour renforcer le gel de mucus, afin d'envisager la délivrance de cette molécule dans un contexte pathologique.

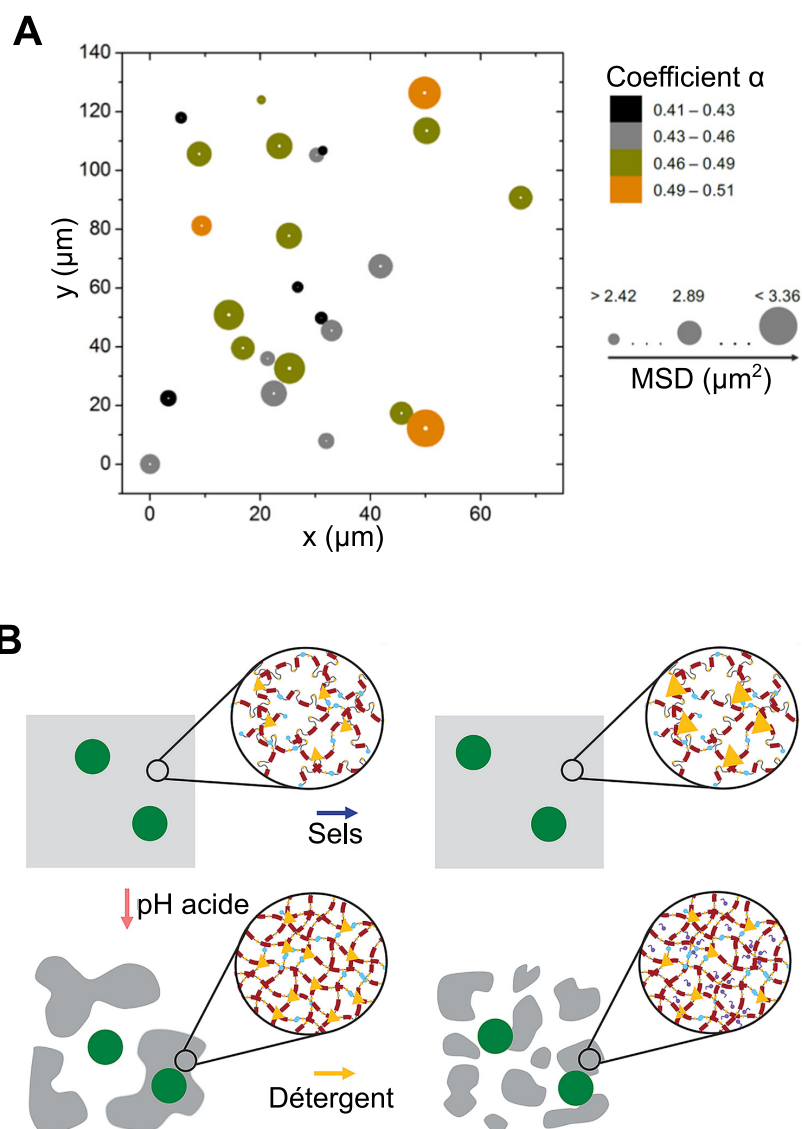


FIGURE 36 – Mise en évidence de l’hétérogénéité du mucus par micro-rhéologie

A. Représentation schématique des coefficients de diffusion et des coefficients α de particules à l’équilibre dans un gel de mucus. La dispersion de ces 2 indicateurs reflète l’hétérogénéité structurale du mucus. D’après Meldrum *et coll.*, 2018. **B.** L’acidification du milieu provoque la rupture de ponts salins entre les mucines gélifiantes, ce qui expose leurs régions hydrophobes, qui s’associent spontanément. Cela augmente l’hétérogénéité du gel en créant des zones riches ou pauvres en mucines gélifiantes (représentées en gris foncé ou en blanc, respectivement). L’ajout de détergent provoque la rupture des agrégats, par compétition pour les sites d’interactions hydrophobes. L’ajout de sels neutralise les charges négatives portées par les mucines, ce qui pérennise les interactions électrostatiques (triangles jaunes). Pour chaque situation, une représentation schématique du réseau de mucines gélifiantes est proposée. Adapté de Wagner *et coll.*, 2017.

4.2 Production de rCYS×3 par des modèles cellulaires

4.2.1 Par la levure *Pichia pastoris*

Il s'est avéré difficile de produire et de purifier la molécule rCYS×3 dans le modèle *Pichia pastoris*, de manière fiable et reproductible. Plusieurs éléments entrent en ligne de compte pour expliquer cela :

- Le premier facteur limitant lors de la production d'une protéine hétérologue est l'usage des codons [Outchkourov et al., 2002]. Afin de palier ce problème, la séquence codant rCYS×3 a été optimisée pour une production par la levure *Pichia pastoris*.
- Dans notre étude, la protéine rCYS×3 est, en grande majorité, non sécrétée. La production de protéines hétérologues par *Pichia pastoris* peut avoir pour conséquence de saturer les enzymes impliquées dans la conformation et la maturation des peptides dans le RE. Cela provoque l'accumulation de protéines mal conformées dans le RE, ce qui active la réponse UPR (*Unfolded Protein Response*). Il y a alors activation de l'endonucléase Ire1 qui élimine un intron du précurseur du gène *HAC1*. La protéine HAC1 fonctionnelle active alors les gènes de l'UPR afin de restaurer l'homéostasie du RE. L'induction par le méthanol peut, à elle seule, induire l'activation de la voie UPR [Hesketh et al., 2013]. Afin de minimiser ce phénomène, une induction plus progressive pourrait être envisagée, en exposant les levures à une concentration croissante de méthanol, lors d'une culture en bio-réacteur par exemple. Un nombre de copies du transgène trop important peut aussi être la cause d'une activation de la réponse UPR [Hohenblum et al., 2004]. Dans notre cas, les clones sont obtenus par recombinaison homologue (ADN linéarisé dans le promoteur *AOX1*), ce qui permet l'intégration d'une unique copie du transgène dans le

génomique de *Pichia pastoris*.

- L'absence de sécrétion de rCYS×3 peut être expliquée par l'hydrophobicité même de la protéine recombinante. En effet, lors de la traduction du peptide, les parties hydrophobes de la protéine sont exposées jusqu'à acquérir une conformation stable. Il est probable que l'exposition prolongée de régions hydrophobes de rCYS×3 (38,7 % d'acides aminés hydrophobes ; voir Tableau 3) puisse être la cause d'une activation de la réponse UPR. Ce phénomène entraînerait l'activation de la voie de dégradation associée au RE (ou ERAD pour *ER-associated degradation*) qui consiste en l'ubiquitination de la protéine néo-synthétisée, puis à sa dégradation par le protéasome. Ce phénomène a déjà été observé par ailleurs lors la production de la cutinase par la levure *Saccharomyces cerevisiae* [Sagt et al., 2002]. Il est intéressant de noter que la production de cette protéine hydrophobe provoque un stress oxydatif qui cause l'agrégation de la cutinase. Dans un milieu oxydant, ce phénomène pourrait également être observé avec le domaine CYS, riche en résidus cystéine [Perez-Vilar and Boucher, 2004].
- La protéine rCYS×3 contient 30 résidus cystéine, soit 15 ponts disulfure intrachaine potentiels. Parmi les 5 ponts disulfure intrachaine que peut former chaque domaine CYS, 3 ont été confirmés par spectrométrie de masse [Ambort et al., 2011]. La formation de ponts disulfure peut influencer le taux de sécrétion des protéines recombinantes. Cela a été démontré en mutant les deux premiers résidus cystéine d'un peptide anti-microbien par des résidus alanine, ce qui permettait d'augmenter son taux de sécrétion d'un facteur 1,4 [Yang et al., 2017]. Dans certains cas, *Pichia pastoris* produit la protéine recombinante avec plusieurs profils de ponts disulfure. Cela peut engendrer des protéines avec une structure non native qui peuvent être reconnues par le système de contrôle qualité du RE, et être dégradées par la voie ERAD [Wu et al., 2010, Tleugabulova et al., 1998].

La protéine rCYS \times 3, détectée dans le lysat cellulaire et le surnageant des levures a une masse moléculaire apparente supérieure à la masse moléculaire attendue de 39,5 kDa. Celle-ci est de \simeq 60 kDa et \simeq 50 kDa, respectivement pour les clones transformés par les vecteurs pPICZ- α -rCYS \times 3 et pPICZ- Δ FSS-rCYS \times 3 (comparer les Figures 33 B et 34 B). Ceci confirme la délétion du signal de sécrétion α -FSS dont la masse moléculaire théorique est de \simeq 10,7 kDa. Cette délétion spécifique de 10 kDa suggère que la protéine n'est pas maturée dans le RE puis dans l'appareil de Golgi. En effet, le pré-peptide et la région amino-terminale du pro-peptide du facteur α -FSS sont clivés dans le RE. Le clivage du pro-peptide dans le RE est opéré par l'enzyme Kex2. Le pro-peptide est clivé une seconde fois dans l'appareil de Golgi par l'enzyme Ste13 [Kurjan and Herskowitz, 1982]. L'absence de différence de masse moléculaire apparente entre la protéine rCYS \times 3 sous forme intracellulaire et sous forme sécrétée suggère que le facteur α -FSS n'est pas clivé, et donc que le trafic intracellulaire de la protéine est interrompu. En conséquence, les protéines rCYS \times 3 détectées dans le surnageant concentré proviennent probablement du renouvellement des levures. Une des causes possibles de l'incohérence entre la masse moléculaire théorique de rCYS \times 3 et sa masse moléculaire apparente pourrait être la glycosylation du peptide. En effet, 26 sites potentiels de *O*-glycosylation sont contenus dans la séquence peptidique des 3 domaines CYS consécutifs (Figure 37). Chez *Pichia pastoris*, la *O*-glycosylation est initiée dans le RE par la liaison d'un mannose sur les résidus sérine et thréonine. Ce mannose est ensuite élongé par 1–4 résidus mannose, liés en α -1,2 ou β -1,2, dans l'appareil de Golgi. Ce processus peut multiplier la masse moléculaire apparente de la protéine *O*-glycosylée par un facteur allant jusqu'à 1,7 [Nett et al., 2013].

Tous ces éléments ont motivé l'utilisation d'un autre modèle, susceptible de produire plus efficacement une protéine recombinante composée de domaines CYS. De part la présence dans son génome de séquences codant des domaines CYS et sa large utilisation

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVMTTTEDETA
QIPAEAVIGYS*DL***EGDFDVAVLPFS****SNSTN***NGL*
LFINTT*IASIAA***KEEGVS****SLEKREAEAEFTWPS**
RPSRIGTKL*GCEPQCAW***SEWLDYSYPMPGP**
SGGDFD*TY***SNIRAAGGAVCEQPLGLECRAQ**
AQPGVPLREL*GQVVEC***SLDFGLVCRNREQV**
GKFKMCFNYEIRVFCCNYGH*CGIEGRAS***SGCE**
PQCAW*SEWLDYSYPMPGP***SGGDFD***TY***SN**
RAAGGAVCEQPLGLECRAQAQPGVPLREL*G*
QVVEC*SLDFGLVCRNREQV***GKFKMCFNYEIRV**
FCCNYGH*CGSLVPRG***STSGCEPQCAWSEW**
LDYSYPMPGP*SGGDFD**TY***SNIRAAGGAVCE**
QPLGLECRAQAQPGVPLREL*GQVVEC***SLDF**
GLVCRNREQV*GKFKMCFNYEIRVFCCNYGH*
CGSAGPAENLYFQGALEQKLISEEDLNSAVD
HHHHHH

FIGURE 37 – Sites de glycosylation potentiels de la molécule rCYS×3 produite par *Pichia pastoris*

Le signal de sécrétion α -FSS, la séquence codant les 3 domaines CYS et le tag hexahistidine sont respectivement illustrés en rouge, en bleu et en violet. Le signal de sécrétion possède 3 sites de *N*-glycosylation (italique) et 20 sites de *O*-glycosylation (gras) potentiels. Le peptide rCYS×3 possède 26 sites de *O*-glycosylation potentiels (gras).

dans l'industrie pharmaceutique et biotechnologique, la lignée cellulaire HEK293 nous a paru particulièrement indiquée.

4.2.2 Par la lignée HEK293

Contrairement à *Pichia pastoris*, la lignée cellulaire HEK293 produit la molécule GST-rCYS×3 sous forme sécrétée. La lignée HEK293 est un hôte particulièrement adapté pour la production de protéines recombinantes de mammifères avec une structure et des modifications post-traductionnelles appropriées. Cela en fait une lignée cellulaire particulièrement utilisée en biologie structurale [Büssow, 2015]. D'après son poids moléculaire apparent, la molécule GST-rCYS×3 ne subit pas de modifications post-traductionnelles importantes (poids moléculaire apparent de $\simeq 64$ kDa en accord avec le poids moléculaire théorique de 66,3 kDa). Néanmoins, si la spectrométrie de masse mettait en évidence la présence de *N*-glycannes, la transfection d'une lignée cellulaire HEK293 déficiente en glycosyl-transférase, comme la *N*-acétyl-glucosaminyl transférase I (GnTI-) pourrait être envisagée [Unson, 2008].

Les conditions de culture cellulaire demandent à être optimisées afin de garantir un rendement optimal pour les tests de délivrance exogène. Pour cela plusieurs paramètres de culture peuvent être améliorés :

- L'effet de certains additifs pourrait être testé afin d'améliorer la production de la protéine GST-rCYS×3. Par exemple, des inhibiteurs des déacétylases des histones, comme l'acide valproïque ou le butyrate de sodium, qui permettent de décondenser la chromatine et d'améliorer l'expression du transgène. À titre d'exemple, la supplémentation du milieu de culture des cellules HEK293 par de l'acide valproïque (4 mM) ou du butyrate de sodium (3 mM) entraîne une augmentation du rendement de production d'IgG recombinants d'un facteur 5,3 et 4,5, respectivement

[Backliwal et al., 2008].

- Il serait possible d'augmenter le rendement production de GST-rCYS \times 3 en augmentant la densité cellulaire. En effet les cellules HEK293 peuvent pousser à des densités assez élevées ($> 1 \times 10^6$ cellules/mL). Pour cela, il faudrait adapter les clones à la culture en suspension, de préférence sans sérum, pour qu'il n'y ait pas d'interférence avec les éléments régulateurs des cellules ou durant le processus de purification. Des milieux de culture propriétaires ont été développés (HyClone Cell Boost, ThermoFisher Scientific).
- Il est possible de prolonger la durée de production par l'ajout de facteurs de croissance, comme le LONG R³ IGF-I ou l'insuline qui exploitent le potentiel mitogène de l'activation du récepteur IGF de type I [Voorhamme and Yandell, 2006].
- Une fois tous ces paramètres de culture optimisés, la production de GST-rCYS \times 3 dans un environnement étroitement contrôlé, comme dans un bioréacteur, avec une source de nutriments continue (*fed-batch*), permettra probablement d'atteindre les meilleurs rendements pour envisager de délivrer la molécule.

La molécule GST-rCYS \times 3, en plus de réaliser des tests de délivrance exogène pour renforcer la barrière de mucus, permettra également de déterminer la structure du domaine CYS. En effet, actuellement, une seule structure secondaire du domaine CYS, encore partielle, a été proposée, produite mais non sécrétée par la lignée cellulaire CHO. L'absence de sécrétion nous permet de nous questionner sur la véracité de la structure obtenue. C'est pourquoi la molécule produite par la lignée HEK293 nous permettra de confirmer ou d'infirmer cette structure et de la compléter. L'effet biologique du domaine CYS ne pourra être entièrement déterminé, que lorsque nous aurons la connaissance des acides aminés exposés. Cela ne sera possible qu'en déterminant la structure 3D de ce domaine, par cristallographie aux rayons X par exemple. Le couplage protéique, puis la spectrométrie de masse permettront éventuellement de déterminer quels sont les sites d'interactions

homologue et/ou hétérologue du domaine CYS. C'est sur cette base que les chercheurs en chimie structurale pourront proposer des molécules candidates capables d'interférer avec ces associations afin que les biologistes puissent en tester l'effet bénéfique dans des mucus anormalement visqueux, comme dans la mucoviscidose, les BPCO, ou la sinusite chronique, par exemple.

La spectrométrie de masse permettra également de détecter la présence de la *C*-mannosylation sur le domaine CYS. Cela viendra confirmer les résultats d'études antérieures qui mettent en évidence la *C*-mannosylation du domaine CYS par des méthodes indirectes [Gouyer et al., 2018, Perez-Vilar et al., 2004].

4.2.3 Applications potentielles de rCYS×3 en contexte pathologique

La suite de notre projet a pour objectif de déterminer si la molécule rCYS×3, produite par la lignée cellulaire HEK293, a un effet bénéfique dans un contexte pathologique où le mucus ne protège plus suffisamment l'épithélium. La rectocolite hémorragique et les infections intra-utérines liées ou non à la survenue de naissances prématurées sont deux pathologies présentant ces caractéristiques. Cependant, dans le cas de la rectocolite hémorragique, la délivrance de rCYS×3 dans le côlon semble plus difficile du fait de l'accessibilité indirecte (rectale ou orale) au tissu malade et du transit intestinal présentant un large spectre d'environnements physico-chimiques.

La lumière vaginale pourrait représenter une meilleure cible pour apporter une preuve de concept de l'effet bénéfique de rCYS×3. En situation physiologique, le microbiote vaginal est dominé par une flore lactobacillaire 1, 2, 3 ou 5 (ou CST pour *community state*

type). Les infections vaginales sont souvent associées à une prévalence d'un microbiote de type non-lactobacillaire ou CST 4, et plus particulièrement à une prévalence des genres *Gardnerella* et *Ureaplasma* [DiGiulio et al., 2015]. La survenue d'une infection bactérienne avant 20 semaines de gestation est un facteur qui multiplie par deux le risque de naissance prématurée [Leitich et al., 2003]. Le mécanisme sous-jacent impliquerait la colonisation de la cavité amniotique par des bactéries, qui déclenchent alors une signalisation pro-inflammatoire, entraînant l'expulsion du fœtus [Romero et al., 2014].

La sphère cervico-vaginale est donc particulièrement adaptée pour tester si la délivrance de rCYS×3 est capable d'induire une meilleure protection dans un contexte infectieux. Pour cela les axes suivants pourraient être explorés :

1. Tester si le modèle murin Tg222, qui exprime le transgène rCYS×12 dans le mucus cervico-vaginal, présente une meilleure implantation d'une souche de *Lactobacillus plantarum* exprimant stablement le fluorochrome mCherry (agrément OGM : 3479) permettant son suivi *in situ* [Gouyer et al., 2015].
2. Déterminer si la délivrance de rCYS×3 permet d'augmenter l'implantation de lactobacilles, dont la prévalence est associée à une flore protectrice.
3. Dans un contexte d'infection par *Gardnerella vaginalis*, mesurer si la délivrance de rCYS×3 induit un effet protecteur, par un renforcement du mucus vaginal murin et/ou une meilleure implantation des lactobacilles.
4. Quantifier la prévalence des mises bas prématurées dans le modèle murin d'infection par *Gardnerella vaginalis* et mesurer le potentiel de rCYS×3 pour prévenir celles-ci.

5 Conclusion

La conservation du domaine CYS dans toutes les mucines gélifiantes de vertébrés suggère qu'il exerce une fonction biologique importante dans la physiologie des muqueuses sécrétoires.

Dans ce travail, nous avons montré que l'enrichissement du mucus par la molécule rCYS×12, co-sécrétée avec les mucines gélifiantes, permettait de renforcer les gels de mucus dans des modèles cellulaire et murin. Ce renforcement s'opère par un remodelage de la matrice protéique du mucus, rendant le gel moins perméable aux particules et bactéries (Figure 38). La principale limite de cette étude est que nous ne pouvons déterminer à partir de quelle concentration la molécule rCYS×12 exerce son effet.

Pour répondre à cette question des modèles cellulaires recombinants ont été développés pour produire la molécule recombinante rCYS×3. La production du domaine CYS sous forme de molécule recombinante reste compliquée. Il y a donc nécessité de trouver le meilleur modèle et les conditions de culture optimales pour produire cette molécule. Cette protéine purifiée permettra de répondre à la question de l'effet dose et pourra être employée pour déterminer les structures secondaire et tertiaire du domaine CYS. C'est par l'étude de la structure du domaine CYS que des molécules interférant avec les associations CYS/CYS ou CYS/mucines pourront être mises au point afin de modifier les propriétés macro- et/ou

micro-rhéologiques du mucus.

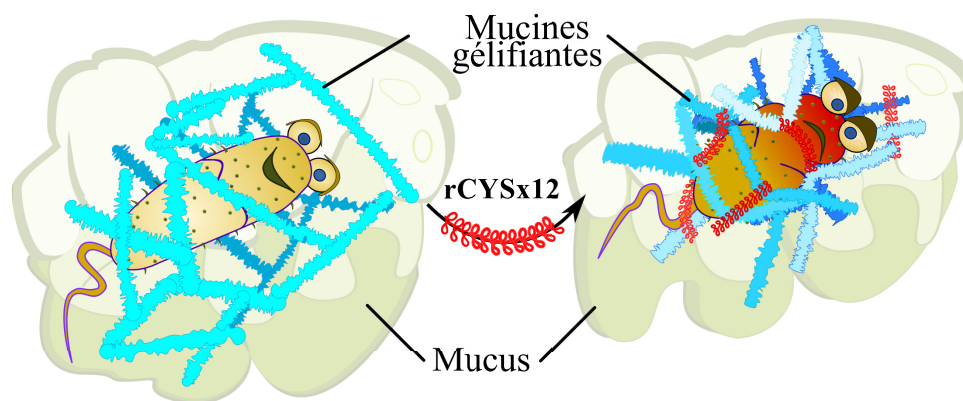


FIGURE 38 – La délivrance endogène de rCYS×12 piège les bactéries dans le réseau de mucines gélifiantes

Bibliographie

- [Abdulkarim et al., 2015] Abdulkarim, M., Agulló, N., Cattoz, B., Griffiths, P., Bernkop-Schnürch, A., Borros, S. G., and Gumbleton, M. (2015). Nanoparticle diffusion within intestinal mucus : Three-dimensional response analysis dissecting the impact of particle surface charge, size and heterogeneity across polyelectrolyte, pegylated and viral particles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 97(Pt A) :230–238.
- [Ahmad et al., 2014] Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., and Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris* : recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(12) :5301–5317.
- [Aihara et al., 2017] Aihara, E., Engevik, K. A., and Montrose, M. H. (2017). Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. *Annu. Rev. Physiol.*, 79(1) :357–380.
- [Albert et al., 2010] Albert, T. K., Laubinger, W., Müller, S., Hanisch, F.-G., Kalinski, T., Meyer, F., and Hoffmann, W. (2010). Human intestinal TFF3 forms disulfide-linked heteromers with the mucus-associated FCGBP protein and is released by hydrogen sulfide. *J. Proteome Res.*, 9(6) :3108–3117.
- [Aldini et al., 2018] Aldini, G., Altomare, A., Baron, G., Vistoli, G., Carini, M., Borsani, L., and Sergio, F. (2018). N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent : the reasons why. *Free Radic. Res.*, 52(7) :751–762.
- [Ambort et al., 2012] Ambort, D., Johansson, M. E. V., Gustafsson, J. K., Nilsson, H. E.,

-
- Ermund, A., Johansson, B. R., Koeck, P. J. B., Hebert, H., and Hansson, G. C. (2012). Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 109(15) :5645–5650.
- [Ambort et al., 2011] Ambort, D., van der Post, S., Johansson, M. E. V., Mackenzie, J., Thomsson, E., Kregel, U., and Hansson, G. C. (2011). Function of the CysD domain of the gel-forming MUC2 mucin. *Biochem. J.*, 436(1) :61–70.
- [Amsden, 1998] Amsden, B. G. (1998). Solute Diffusion within Hydrogels. Mechanisms and Models. *Macromolecules*, 31(23) :8382–8385.
- [Amsden, 1999] Amsden, B. G. (1999). An Obstruction-Scaling Model for Diffusion in Homogeneous Hydrogels. *Macromolecules*, 32(3) :874–879.
- [Arike et al., 2017] Arike, L., Holmén Larsson, J. M., and Hansson, G. C. (2017). Intestinal Muc2 mucin O-glycosylation is affected by microbiota and regulated by differential expression of glycosyltransferases. *Glycobiology*, 27(4) :318–328.
- [Asker et al., 1998a] Asker, N., Axelsson, M. A. B., Olofsson, S.-O., and Hansson, G. C. (1998a). Dimerization of the human MUC2 mucin in the endoplasmic reticulum is followed by a N-glycosylation-dependent transfer of the mono- and dimers to the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.*, 273(30) :18857–18863.
- [Asker et al., 1998b] Asker, N., Axelsson, M. A. B., Olofsson, S. O., and Hansson, G. C. (1998b). Human MUC5AC mucin dimerizes in the rough endoplasmic reticulum, similarly to the MUC2 mucin. *Biochem. J.*, 335(Pt 2) :381–387.
- [Aw and Polizzi, 2013] Aw, R. and Polizzi, K. M. (2013). Can too many copies spoil the broth? *Microb. Cell Fact.*, 12(1) :128.
- [Backliwal et al., 2008] Backliwal, G., Hildinger, M., Kuettel, I., Delegrange, F., Hacker, D. L., and Wurm, F. M. (2008). Valproic acid : A viable alternative to sodium buty-

-
- rate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 101(1) :182–189.
- [Bahari et al., 1982] Bahari, H. M., Ross, I. N., and Turnberg, L. A. (1982). Demonstration of a pH gradient across the mucus layer on the surface of human gastric mucosa in vitro. *Gut*, 23(6) :513–516.
- [Bansil and Turner, 2006] Bansil, R. and Turner, B. S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 11(2-3) :164–170.
- [Bansil and Turner, 2018] Bansil, R. and Turner, B. S. (2018). The biology of mucus : Composition, synthesis and organization. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 124 :3–15.
- [Bara et al., 1991] Bara, J., Gautier, R., Mouradian, P., Decaens, C., and Daher, N. (1991). Oncofetal mucin M1 epitope family : characterization and expression during colonic carcinogenesis. *Int. J. Cancer*, 47(2) :304–10.
- [Bastholm et al., 2017] Bastholm, S. K., Samson, M. H., Becher, N., Hansen, L. K., Stubbe, P. R., Chronakis, I. S., Nexø, E., and Uldbjerg, N. (2017). Trefoil factor peptide 3 is positively correlated with the viscoelastic properties of the cervical mucus plug. *Acta Obs. Gynecol. Scand.*, 96(1) :47–52.
- [Behrens et al., 2001] Behrens, I., Stenberg, P., Artursson, P., and Kissel, T. (2001). Transport of lipophilic drug molecules in a new mucus-secreting cell culture model based on HT29-MTX cells. *Pharm. Res.*, 18(8) :1138–1145.
- [Belenguer et al., 2006] Belenguer, A., Duncan, S. H., Calder, A. G., Holtrop, G., Louis, P., Lobley, G. E., and Flint, H. J. (2006). Two Routes of Metabolic Cross-Feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and Butyrate-Producing Anaerobes from the Human Gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(5) :3593–3599.

-
- [Bergstrom et al., 2016] Bergstrom, K. S. B., Liu, X., Zhao, Y., Gao, N., Wu, Q., Song, K., Cui, Y., Li, Y., McDaniel, J. M., McGee, S., Chen, W., Huycke, M. M., Houchen, C. W., Zenewicz, L. A., West, C. M., Chen, H., Braun, J., Fu, J., and Xia, L. (2016). Defective Intestinal Mucin-Type O-Glycosylation Causes Spontaneous Colitis-Associated Cancer in Mice. *Gastroenterology*, 151(1) :152—164.e11.
- [Bhattacharjee et al., 2017] Bhattacharjee, S., Mahon, E., Harrison, S. M., McGetrick, J., Muniyappa, M., Carrington, S. D., and Brayden, D. J. (2017). Nanoparticle passage through porcine jejunal mucus : Microfluidics and rheology. *Nanomedicine*, 13(3) :863–873.
- [Bhongir et al., 2017] Bhongir, R. K. V., Kasetty, G., Papareddy, P., Mörgelin, M., Herwald, H., and Egesten, A. (2017). DNA-fragmentation is a source of bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.*, 474(3) :411–425.
- [Bobek and Situ, 2003] Bobek, L. A. and Situ, H. (2003). MUC7 20-Mer : investigation of antimicrobial activity, secondary structure, and possible mechanism of antifungal action. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47(2) :643–652.
- [Broughton-Head et al., 2007] Broughton-Head, V. J., Smith, J. R., Shur, J., and Shute, J. K. (2007). Actin limits enhancement of nanoparticle diffusion through cystic fibrosis sputum by mucolytics. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 20(6) :708–717.
- [Brunelli et al., 2007] Brunelli, R., Papi, M., Arcovito, G., Bompiani, A., Castagnola, M., Parasassi, T., Sampaolese, B., Vincenzoni, F., and De Spirito, M. (2007). Globular structure of human ovulatory cervical mucus. *FASEB J.*, 21(14) :3872–3876.
- [Buisine et al., 1998a] Buisine, M.-P., Desseyn, J.-L., Porchet, N., Degand, P., Laine, A., and Aubert, J.-P. (1998a). Genomic organization of the 3'-region of the human MUC5AC mucin gene : additional evidence for a common ancestral gene for the 11p15.5 mucin gene family. *Biochem. J.*, 332 :729–738.

-
- [Buisine et al., 1999] Buisine, M.-P., Devisme, L., Copin, M.-C., Durand-Réville, M., Gosselin, B., Aubert, J.-P., and Porchet, N. (1999). Developmental Mucin Gene Expression in the Human Respiratory Tract. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 20(2) :209–218.
- [Buisine et al., 2000] Buisine, M.-P., Devisme, L., Maunoury, V., Deschodt, E., Gosselin, B., Copin, M.-C., Aubert, J.-P., and Porchet, N. (2000). Developmental Mucin Gene Expression in the Gastroduodenal Tract and Accessory Digestive Glands. I. Stomach : A Relationship to Gastric Carcinoma. *J. Histochem. Cytochem.*, 48(12) :1667–1676.
- [Buisine et al., 1998b] Buisine, M.-P., Devisme, L., Savidge, T. C., Gespach, C., Gosselin, B., Porchet, N., and Aubert, J.-P. (1998b). Mucin gene expression in human embryonic and fetal intestine. *Gut*, 43(4) :519–524.
- [Büssow, 2015] Büssow, K. (2015). Stable mammalian producer cell lines for structural biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 32 :81–90.
- [Caldara et al., 2012] Caldara, M., Friedlander, R. S., Kavanaugh, N. L., Aizenberg, J., Foster, K. R., and Ribbeck, K. (2012). Mucin biopolymers prevent bacterial aggregation by retaining cells in the free-swimming state. *Curr. Biol.*, 22(24) :2325–2330.
- [Cao et al., 2012] Cao, R., Wang, T. T., DeMaria, G. C., Sheehan, J. K., and Kesimer, M. (2012). Mapping the protein domain structures of the respiratory mucins : a mucin proteome coverage study. *J. Proteome Res.*, 11(8) :4013–4023.
- [Cao et al., 1999] Cao, X., Bansil, R., Bhaskar, K. R., Turner, B. S., LaMont, J. T., Niu, N., and Afdhal, N. H. (1999). pH-dependent conformational change of gastric mucin leads to sol-gel transition. *Biophys. J.*, 76(3) :1250–1258.
- [Carlson et al., 2018] Carlson, T. L., Yildiz, H., Dar, Z., Lock, J. Y., and Carrier, R. L. (2018). Lipids alter microbial transport through intestinal mucus. *PLoS One*, 13(12) :e0209151.

-
- [Celli et al., 2007] Celli, J. P., Turner, B. S., Afdhal, N. H., Ewoldt, R. H., McKinley, G. H., Bansil, R., and Erramilli, S. (2007). Rheology of gastric mucin exhibits a pH-dependent sol-gel transition. *Biomacromolecules*, 8(5) :1580–1586.
- [Celli et al., 2009] Celli, J. P., Turner, B. S., Afdhal, N. H., Keates, S., Ghiran, I., Kelly, C. P., Ewoldt, R. H., McKinley, G. H., So, P., Erramilli, S., and Bansil, R. (2009). Helicobacter pylori moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 106(34) :14321–14326.
- [Chaudhury et al., 2015] Chaudhury, N., Shirlaw, P., Pramanik, R., Carpenter, G., and Proctor, G. (2015). Changes in Saliva Rheological Properties and Mucin Glycosylation in Dry Mouth. *J. Dent. Res.*, 94(12) :1660–1667.
- [Chen et al., 2014] Chen, A., McKinley, S. A., Wang, S., Shi, F., Mucha, P. J., Forest, M. G., and Lai, S. K. (2014). Transient Antibody-Mucin Interactions Produce a Dynamic Molecular Shield against Viral Invasion. *Biophys. J.*, 106(9) :2028–2036.
- [Chen et al., 2004] Chen, Y., Zhao, Y. H., Kalaslavadi, T. B., Hamati, E., Nehrke, K., Le, A. D., Ann, D. K., and Wu, R. (2004). Genome-wide search and identification of a novel gel-forming mucin MUC19/Muc19 in glandular tissues. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 30(2) :155–165.
- [Chin et al., 2011] Chin, C. D., Laksanasopin, T., Cheung, Y. K., Steinmiller, D., Linder, V., Parsa, H., Wang, J., Moore, H., Rouse, R., Umvilighozo, G., Karita, E., Mwambarangwe, L., Braunstein, S. L., van de Wijgert, J., Sahabo, R., Justman, J. E., El-Sadr, W., and Sia, S. K. (2011). Microfluidics-based diagnostics of infectious diseases in the developing world. *Nat. med.*, 17(8) :1015–1019.
- [Chrétien, 2003] Chrétien, F. C. (2003). Involvement of the glycoproteic meshwork of cervical mucus in the mechanism of sperm orientation. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 82(5) :449–461.

-
- [Co et al., 2018] Co, J. Y., Cárcamo-Oyarce, G., Billings, N., Wheeler, K. M., Grindy, S. C., Holtén-Andersen, N., and Ribbeck, K. (2018). Mucins trigger dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 4(1) :23.
- [Coles et al., 2010] Coles, J. M., Chang, D. P., and Zauscher, S. (2010). Molecular mechanisms of aqueous boundary lubrication by mucinous glycoproteins. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 15(6) :406–416.
- [Cone, 2009] Cone, R. A. (2009). Barrier properties of mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61(2) :75–85.
- [Corfield, 2015] Corfield, A. P. (2015). Mucins : a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochim. Biophys. Acta*, 1850(1) :236–252.
- [Corfield, 2017] Corfield, A. P. (2017). Eukaryotic protein glycosylation : a primer for histochemists and cell biologists. *Histochem. Cell Biol.*, 147(2) :119–147.
- [Corfield, 2018] Corfield, A. P. (2018). The Interaction of the Gut Microbiota with the Mucus Barrier in Health and Disease in Human. *Microorganisms*, 6(3) :0078.
- [Critchfield et al., 2013] Critchfield, A. S., Yao, G., Jaishankar, A., Friedlander, R. S., Lieleg, O., Doyle, P. S., McKinley, G. H., House, M., and Ribbeck, K. (2013). Cervical mucus properties stratify risk for preterm birth. *PLoS One*, 8(8) :e69528.
- [Crocker and Varki, 2001] Crocker, P. R. and Varki, A. (2001). Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol.*, 22(6) :337–42.
- [Cu and Saltzman, 2009] Cu, Y. and Saltzman, W. M. (2009). Controlled surface modification with poly(ethylene)glycol enhances diffusion of PLGA nanoparticles in human cervical mucus. *Mol. Pharm.*, 6(1) :173–181.
- [Culp et al., 2004] Culp, D. J., Latchney, L. R., Fallon, M. A., Denny, P. A., Denny, P. C., Couwenhoven, R. I., and Chuang, S. (2004). The gene encoding mouse Muc19 : cDNA, genomic organization and relationship to Smgc. *Physiol. Genomics*, 19(3) :303–318.

-
- [Curt and Pringle, 1969] Curt, J. R. and Pringle, R. (1969). Viscosity of gastric mucus in duodenal ulceration. *Gut*, 10(11) :931–934.
- [Das et al., 2009] Das, B., Cash, M. N., Hand, A. R., Shivazad, A., and Culp, D. J. (2009). Expression of Muc19/Smgc gene products during murine sublingual gland development : cytodifferentiation and maturation of salivary mucous cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 57(4) :383–396.
- [Davies et al., 1998] Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., and Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280(5361) :295–298.
- [Davies et al., 2014] Davies, H. S., Pudney, P. D. A., Georgiades, P., Waigh, T. A., Hodson, N. W., Ridley, C. E., Blanch, E. W., and Thornton, D. J. (2014). Reorganisation of the salivary mucin network by dietary components : insights from green tea polyphenols. *PLoS One*, 9(9) :e108372.
- [Davies et al., 2016] Davies, H. S., Singh, P., Deckert-Gaudig, T., Deckert, V., Rousseau, K., Ridley, C. E., Dowd, S. E., Doig, A. J., Pudney, P. D. A., Thornton, D. J., and Blanch, E. W. (2016). Secondary Structure and Glycosylation of Mucus Glycoproteins by Raman Spectroscopies. *Anal. Chem.*, 88(23) :11609–11615.
- [Dawson et al., 2003] Dawson, M., Wirtz, D., and Hanes, J. (2003). Enhanced viscoelasticity of human cystic fibrotic sputum correlates with increasing microheterogeneity in particle transport. *J. Biol. Chem.*, 278(50) :50393–50401.
- [de Chaumont et al., 2012] de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Hervé, N., Pop, S., Provoost, T., Meas-Yedid, V., Pankajakshan, P., Lecomte, T., Le Montagner, Y., Lagache, T., Dufour, A., and Olivo-Marin, J.-C. (2012). Icy : an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat. Methods*, 9(7) :690–696.

-
- [Dekker and Strous, 1990] Dekker, J. and Strous, G. J. (1990). Covalent oligomerization of rat gastric mucin occurs in the rough endoplasmic reticulum, is N-glycosylation-dependent, and precedes initial O-glycosylation. *J. Biol. Chem.*, 265(30) :18116–18122.
- [Delmotte et al., 2002] Delmotte, P., Degroote, S., Lafitte, J.-J., Lamblin, G., Perini, J.-M., and Roussel, P. (2002). Tumor Necrosis Factor α Increases the Expression of Glycosyltransferases and Sulfotransferases Responsible for the Biosynthesis of Sialylated and/or Sulfated Lewis x Epitopes in the Human Bronchial Mucosa. *J. Biol. Chem.*, 277(1) :424–431.
- [Demouveau et al., 2018] Demouveau, B., Gouyer, V., Gottrand, F., Narita, T., and Desseyn, J.-L. (2018). Gel-forming mucin interactome drives mucus viscoelasticity. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 252 :69–82.
- [Desai et al., 2016] Desai, M. S., Seekatz, A. M., Koropatkin, N. M., Kamada, N., Hickey, C. A., Wolter, M., Pudlo, N. A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V. B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T. S., Núñez, G., and Martens, E. C. (2016). A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*, 167(5) :1339–1353.
- [Desseyn, 2009] Desseyn, J.-L. (2009). Mucin CYS domains are ancient and highly conserved modules that evolved in concert. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 52(2) :284–292.
- [Desseyn et al., 2000] Desseyn, J.-L., Aubert, J.-P., Porchet, N., and Laine, A. (2000). Evolution of the large secreted gel-forming mucins. *Mol. Biol. Evol.*, 17(8) :1175–1184.
- [Desseyn et al., 1998] Desseyn, J.-L., Buisine, M.-P., Porchet, N., Aubert, J.-P., and Laine, A. (1998). Genomic organization of the human mucin gene MUC5B. cDNA and genomic sequences upstream of the large central exon. *J. Biol. Chem.*, 273(46) :30157–30164.

-
- [Desseyn et al., 2016] Desseyn, J.-L., Gouyer, V., and Gottrand, F. (2016). Biological modeling of mucus to modulate mucus barriers. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 310(4) :G225–227.
- [Desseyn et al., 2008] Desseyn, J.-L., Gouyer, V., and Tetaert, D. (2008). *The epithelial mucins : structure/function. Role in cancer and inflammatory diseases*. Research Signpost.
- [Desseyn et al., 1997] Desseyn, J.-L., Guyonnet-Dupérat, V., Porchet, N., Aubert, J.-P., and Laine, A. (1997). Human mucin gene MUC5B, the 10.7-kb large central exon encodes various alternate subdomains resulting in a super-repeat. Structural evidence for a 11p15.5 gene family. *J. Biol. Chem.*, 272(6) :3168–3178.
- [Desseyn and Laine, 2003] Desseyn, J.-L. and Laine, A. (2003). Characterization of mouse Muc6 and evidence of conservation of the gel-forming mucin gene cluster between human and mouse. *Genomics*, 81(4) :433–436.
- [Dickerhof et al., 2017] Dickerhof, N., Pearson, J. F., Hoskin, T. S., Berry, L. J., Turner, R., Sly, P. D., and Kettle, A. J. (2017). Oxidative stress in early cystic fibrosis lung disease is exacerbated by airway glutathione deficiency. *Free Radic. Biol. Med.*, 113 :236–243.
- [Dieleman et al., 1998] Dieleman, L. A., Palmen, M. J., Akol, H., Bloemena, E., Peña, A. S., Meuwissen, S. G., and Van Rees, E. P. (1998). Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin. Exp. Immunol.*, 114(3) :385–391.
- [DiGiulio et al., 2015] DiGiulio, D. B., Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Costello, E. K., Lyell, D. J., Robaczewska, A., Sun, C. L., Goltsman, D. S. A., Wong, R. J., Shaw, G., Stevenson, D. K., Holmes, S. P., and Relman, D. A. (2015). Temporal and spatial

-
- variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 112(35) :11060–5.
- [Dobrynin et al., 1995] Dobrynin, A. V., Colby, R. H., and Rubinstein, M. (1995). Scaling Theory of Polyelectrolyte Solutions. *Macromolecules*, 28(6) :1859–1871.
- [Dolan et al., 2012] Dolan, B., Naughton, J., Tegtmeyer, N., May, F. E. B., and Clyne, M. (2012). The Interaction of *Helicobacter pylori* with the Adherent Mucus Gel Layer Secreted by Polarized HT29-MTX-E12 Cells. *PLoS ONE*, 7(10) :e47300.
- [Donaldson et al., 2006] Donaldson, S. H., Bennett, W. D., Zeman, K. L., Knowles, M. R., Tarran, R., and Boucher, R. C. (2006). Mucus Clearance and Lung Function in Cystic Fibrosis with Hypertonic Saline. *N. Engl. J. Med.*, 354(3) :241–250.
- [Duncan et al., 2016] Duncan, G. A., Jung, J., Joseph, A., Thaxton, A. L., West, N. E., Boyle, M. P., Hanes, J., and Suk, J. S. (2016). Microstructural alterations of sputum in cystic fibrosis lung disease. *JCI insight*, 1(18) :e88198.
- [Dunican et al., 2018] Dunican, E. M., Elicker, B. M., Gierada, D. S., Nagle, S. K., Schiebeler, M. L., Newell, J. D., Raymond, W. W., Lachowicz-Scroggins, M. E., Di Maio, S., Hoffman, E. A., Castro, M., Fain, S. B., Jarjour, N. N., Israel, E., Levy, B. D., Erzurum, S. C., Wenzel, S. E., Meyers, D. A., Bleecker, E. R., Phillips, B. R., Mauger, D. T., Gordon, E. D., Woodruff, P. G., Peters, M. C., and Fahy, J. V. (2018). Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction. *J. Clin. Invest.*, 128(3) :997–1009.
- [Dünnhaupt et al., 2011] Dünnhaupt, S., Barthelmes, J., Hombach, J., Sakloetsakun, D., Arkhipova, V., and Bernkop-Schnürch, A. (2011). Distribution of thiolated mucoadhesive nanoparticles on intestinal mucosa. *Int. J. Pharm.*, 408(1-2) :191–199.
- [Dupont et al., 2014] Dupont, A., Heinbockel, L., Brandenburg, K., and Hornef, M. W. (2014). Antimicrobial peptides and the enteric mucus layer act in concert to protect

- the intestinal mucosa. *Gut microbes*, 5(6) :761–765.
- [Ehehalt et al., 2004] Ehehalt, R., Wagenblast, J., Erben, G., Lehmann, W.-D., Hinz, U., Merle, U., and Stremmel, W. (2004). Phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in intestinal mucus of ulcerative colitis patients. A quantitative approach by nanoelectrospray-tandem mass spectrometry. *Scand. J. Gastroenterol.*, 39(8) :737–742.
- [Ehre et al., 2019] Ehre, C., Rushton, Z. L., Wang, B., Hothem, L. N., Morrison, C. B., Fontana, N. C., Markovetz, M. R., Delion, M. F., Kato, T., Villalon, D., Thelin, W. R., Esther, C. R., Hill, D. B., Grubb, B. R., Livraghi-Butrico, A., Donaldson, S. H., and Boucher, R. C. (2019). An Improved Inhaled Mucolytic to Treat Airway Muco-obstructive Diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 199(2) :171–180.
- [Ensign et al., 2013] Ensign, L. M., Henning, A., Schneider, C. S., Maisel, K., Wang, Y.-Y., Porosoff, M. D., Cone, R., and Hanes, J. (2013). Ex Vivo Characterization of Particle Transport in Mucus Secretions Coating Freshly Excised Mucosal Tissues. *Mol. Pharm.*, 10(6) :2176–2182.
- [Ensign et al., 2014] Ensign, L. M., Lai, S. K., Wang, Y.-Y., Yang, M., Mert, O., Hanes, J., and Cone, R. (2014). Pretreatment of Human Cervicovaginal Mucus with Pluronic F127 Enhances Nanoparticle Penetration without Compromising Mucus Barrier Properties to Herpes Simplex Virus. *Biomacromolecules*, 15(12) :4403–4409.
- [Ermund et al., 2015] Ermund, A., Meiss, L. N., Gustafsson, J. K., and Hansson, G. C. (2015). Hyper-osmolarity and calcium chelation : Effects on cystic fibrosis mucus. *Eur. J. Pharmacol.*, 764 :109–117.
- [Ermund et al., 2017] Ermund, A., Meiss, L. N., Rodriguez-Pineiro, A. M., Bähr, A., Nilsson, H. E., Trillo-Muyo, S., Ridley, C., Thornton, D. J., Wine, J. J., Hebert, H., Klymiuk, N., and Hansson, G. C. (2017). The normal trachea is cleaned by MUC5B

- mucin bundles from the submucosal glands coated with the MUC5AC mucin. *Biochem Biophys Res Commun*, 492(3) :331–337.
- [Ernst et al., 2018] Ernst, J., Klinger-Strobel, M., Arnold, K., Thamm, J., Hartung, A., Pletz, M. W., Makarewicz, O., and Fischer, D. (2018). Polyester-based particles to overcome the obstacles of mucus and biofilms in the lung for tobramycin application under static and dynamic fluidic conditions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 131 :120–129.
- [Escande et al., 2004] Escande, F., Porchet, N., Bernigaud, A., Petitprez, D., Aubert, J.-P., and Buisine, M.-P. (2004). The mouse secreted gel-forming mucin gene cluster. *Biochim. Biophys. Acta*, 1676(3) :240–250.
- [Esther et al., 2019] Esther, C. R., Muhlebach, M. S., Ehre, C., Hill, D. B., Wolfgang, M. C., Kesimer, M., Ramsey, K. A., Markovetz, M. R., Garbarine, I. C., Forest, M. G., Seim, I., Zorn, B., Morrison, C. B., Delion, M. F., Thelin, W. R., Villalon, D., Sabater, J. R., Turkovic, L., Ranganathan, S., Stick, S. M., and Boucher, R. C. (2019). Mucus accumulation in the lungs precedes structural changes and infection in children with cystic fibrosis. *Sci. Transl. Med.*, 11(486) :eaav3488.
- [Fahrbach et al., 2013] Fahrbach, K. M., Malykhina, O., Stieh, D. J., and Hope, T. J. (2013). Differential Binding of IgG and IgA to Mucus of the Female Reproductive Tract. *PLoS One*, 8(10) :e76176.
- [Fernández-Blanco et al., 2018] Fernández-Blanco, J. A., Fakhri, D., Arike, L., Rodríguez-Piñero, A. M., Martínez-Abad, B., Skansebo, E., Jackson, S., Root, J., Singh, D., McCrae, C., Evans, C. M., Åstrand, A., Ermund, A., and Hansson, G. C. (2018). Attached stratified mucus separates bacteria from the epithelial cells in COPD lungs. *JCI Insight*, 3(17) :e120994.
- [Fukui et al., 2018] Fukui, Y., Fukuda, M., and Fujimoto, K. (2018). Generation of mucin gel particles with self-degradable and -releasable properties. *J. Mater. Chem. B*,

6(5) :781–788.

- [Furter et al., 2019] Furter, M., Sellin, M. E., Hansson, G. C., and Hardt, W.-D. (2019). Mucus Architecture and Near-Surface Swimming Affect Distinct Salmonella Typhimurium Infection Patterns along the Murine Intestinal Tract. *Cell Rep.*, 27(9) :2665–2678.
- [Georgiades et al., 2014] Georgiades, P., Pudney, P. D. A., Thornton, D. J., and Waigh, T. A. (2014). Particle tracking microrheology of purified gastrointestinal mucins. *Biopolymers*, 101(4) :366–377.
- [Gipson et al., 2001] Gipson, I. K., Moccia, R., Spurr-Michaud, S. J., Argüeso, P., Gargiulo, A. R., Hill, J. A., Offner, G. D., and Keutmann, H. T. (2001). The Amount of MUC5B Mucin in Cervical Mucus Peaks at Midcycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86(2) :594–600.
- [Girod et al., 1992a] Girod, S., Galabert, C., Lecuire, A., Zahm, J. M., and Puchelle, E. (1992a). Phospholipid composition and surface-active properties of tracheobronchial secretions from patients with cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary diseases. *Pediatr. Pulmonol.*, 13(1) :22–27.
- [Girod et al., 1992b] Girod, S., Zahm, J. M., Plotkowski, C., Beck, G., and Puchelle, E. (1992b). Role of the physiochemical properties of mucus in the protection of the respiratory epithelium. *Eur. Respir. J.*, 5(4) :477–487.
- [Godl et al., 2002] Godl, K., Johansson, M. E. V., Lidell, M. E., Mörgelin, M., Karlsson, H., Olson, F. J., Gum, J. R., Kim, Y. S., and Hansson, G. C. (2002). The N terminus of the MUC2 mucin forms trimers that are held together within a trypsin-resistant core fragment. *J. Biol. Chem.*, 277(49) :47248–47256.
- [Goodrich et al., 2018] Goodrich, C. P., Brenner, M. P., and Ribbeck, K. (2018). Enhanced diffusion by binding to the crosslinks of a polymer gel. *Nat. Commun.*, 9 :4348.

-
- [Goto et al., 2014] Goto, Y., Obata, T., Kunisawa, J., Sato, S., Ivanov, I. I., Lamichhane, A., Takeyama, N., Kamioka, M., Sakamoto, M., Matsuki, T., Setoyama, H., Imaoka, A., Uematsu, S., Akira, S., Domino, S. E., Kulig, P., Becher, B., Renauld, J.-C., Sasakawa, C., Umesaki, Y., Benno, Y., and Kiyono, H. (2014). Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science*, 345(6202) :1254009.
- [Gouveia and Tiffany, 2005] Gouveia, S. M. and Tiffany, J. M. (2005). Human tear viscosity : An interactive role for proteins and lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1753(2) :155–163.
- [Gouyer et al., 2018] Gouyer, V., Demouveau, B., Lacroix, G., Valque, H., Gottrand, F., and Desseyn, J.-L. (2018). Non-C-mannosylable mucin CYS domains hindered proper folding and secretion of mucin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 506(4) :812–818.
- [Gouyer et al., 2015] Gouyer, V., Dubuquoy, L., Robbe-Masselot, C., Neut, C., Singer, E., Plet, S., Geboes, K., Desreumaux, P., Gottrand, F., and Desseyn, J.-L. (2015). Delivery of a mucin domain enriched in cysteine residues strengthens the intestinal mucous barrier. *Sci. Rep.*, 5(1) :9577.
- [Gouyer et al., 2011] Gouyer, V., Gottrand, F., and Desseyn, J.-L. (2011). The extraordinarily complex but highly structured organization of intestinal mucus-gel unveiled in multicolor images. *PLoS One*, 6(4) :e18761.
- [Gouyer et al., 2001] Gouyer, V., Wiede, A., Buisine, M.-P., Dekeyser, S., Moreau, O., Lesuffleur, T., Hoffmann, W., and Huet, G. (2001). Specific secretion of gel-forming mucins and TFF peptides in HT-29 cells of mucin-secreting phenotype. *Biochim. Biophys. Acta*, 1539(1-2) :71–84.
- [Grande et al., 2015] Grande, G., Milardi, D., Vincenzoni, F., Pompa, G., Biscione, A., Astorri, A. L., Fruscella, E., De Luca, A., Messana, I., Castagnola, M., and Marana, R. (2015). Proteomic characterization of the qualitative and quantitative differences

-
- in cervical mucus composition during the menstrual cycle. *Mol. BioSyst.*, 11(6) :1717–1725.
- [Greenberg and Canale-Parola, 1977] Greenberg, E. P. and Canale-Parola, E. (1977). Motility of flagellated bacteria in viscous environments. *J. Bacteriol.*, 132(1) :356–358.
- [Guichard et al., 2018] Guichard, M.-J., Kinoo, D., Aubriot, A.-S., Bauwens, N., Gougué, J., Vermeulen, F., Lebecque, P., Leal, T., and Vanbever, R. (2018). Impact of PEGylation on the mucolytic activity of recombinant human deoxyribonuclease I in cystic fibrosis sputum. *Clin. Sci.*, 132(13) :1439–1452.
- [Gustafsson et al., 2012] Gustafsson, J. K., Ermund, A., Ambort, D., Johansson, M. E. V., Nilsson, H. E., Thorell, K., Hebert, H., Sjövall, H., and Hansson, G. C. (2012). Bicarbonate and functional CFTR channel are required for proper mucin secretion and link cystic fibrosis with its mucus phenotype. *J. Exp. Med.*, 209(7) :1263–1272.
- [Hadjiev and Amsden, 2015] Hadjiev, N. A. and Amsden, B. G. (2015). An assessment of the ability of the obstruction-scaling model to estimate solute diffusion coefficients in hydrogels. *J. Control. Release*, 199 :10–16.
- [Hanisch et al., 2014] Hanisch, F.-G., Bonar, D., Schloerer, N., and Schroten, H. (2014). Human trefoil factor 2 is a lectin that binds α -GlcNAc-capped mucin glycans with antibiotic activity against *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.*, 289(40) :27363–27375.
- [Hansen et al., 2014] Hansen, L. K., Becher, N., Bastholm, S. K., Glavind, J., Ramsing, M., Kim, C. J., Romero, R., Jensen, J. S., and Uldbjerg, N. (2014). The cervical mucus plug inhibits, but does not block, the passage of ascending bacteria from the vagina during pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 93(1) :102–108.
- [Hansson et al., 1988] Hansson, G. C., Sheehan, J. K., and Carlstedt, I. (1988). Only trace amounts of fatty acids are found in pure mucus glycoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 266(1) :197–200.

-
- [Harada et al., 1997] Harada, N., Iijima, S., Kobayashi, K., Yoshida, T., Brown, W. R., Hibi, T., Oshima, A., and Morikawa, M. (1997). Human IgG Fc binding protein (Fc-gammaBP) in colonic epithelial cells exhibits mucin-like structure. *J. Biol. Chem.*, 272(24) :15232–15241.
- [Hardcastle et al., 2017] Hardcastle, T., Jain, R., Radcliff, F., Waldvogel-Thurlow, S., Zoing, M., Biswas, K., and Douglas, R. (2017). The in vitro mucolytic effect of xyloitol and dornase alfa on chronic rhinosinusitis mucus. *Int. Forum Allergy Rhinol.*, 7(9) :889–896.
- [Hattori et al., 1993] Hattori, M., Ukai, K., Majima, Y., and Sakakura, Y. (1993). Effects of Nasal Allergen Challenge on Dynamic Viscoelasticity of Nasal Mucus. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 102(4) :314–317.
- [Hein et al., 2002] Hein, M., Valore, E. V., Helmig, R. B., Ulbjerg, N., and Ganz, T. (2002). Antimicrobial factors in the cervical mucus plug. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 187(1) :137–144.
- [Henke and Ratjen, 2007] Henke, M. O. and Ratjen, F. (2007). Mucolytics in cystic fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.*, 8(1) :24–29.
- [Hesketh et al., 2013] Hesketh, A. R., Castrillo, J. I., Sawyer, T., Archer, D. B., and Oliver, S. G. (2013). Investigating the physiological response of *Pichia* (*Komagataella*) *pastoris* GS115 to the heterologous expression of misfolded proteins using chemostat cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(22) :9747–9762.
- [Heyder, 2004] Heyder, J. (2004). Deposition of Inhaled Particles in the Human Respiratory Tract and Consequences for Regional Targeting in Respiratory Drug Delivery. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 1(4) :315–320.
- [Hill et al., 2014] Hill, D. B., Vasquez, P. A., Mellnik, J., McKinley, S. A., Vose, A., Mu, F., Henderson, A. G., Donaldson, S. H., Alexis, N. E., Boucher, R. C., and Forest, M. G.

-
- (2014). A Biophysical Basis for Mucus Solids Concentration as a Candidate Biomarker for Airways Disease. *PLoS One*, 9(2) :e87681.
- [Hilton et al., 1996] Hilton, D. J., Watowich, S. S., Katz, L., and Lodish, H. F. (1996). Saturation mutagenesis of the WSXWS motif of the erythropoietin receptor. *J. Biol. Chem.*, 271(9) :4699–4708.
- [Ho et al., 2004] Ho, S. B., Takamura, K., Anway, R., Shekels, L. L., Toribara, N. W., and Ota, H. (2004). The adherent gastric mucous layer is composed of alternating layers of MUC5AC and MUC6 mucin proteins. *Dig. Dis. Sci.*, 49(10) :1598–1606.
- [Hohenblum et al., 2004] Hohenblum, H., Gasser, B., Maurer, M., Borth, N., and Matanovich, D. (2004). Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.*, 85(4) :367–375.
- [Hong et al., 2005] Hong, Z., Chasan, B., Bansil, R., Turner, B. S., Bhaskar, K. R., and Afdhal, N. H. (2005). Atomic force microscopy reveals aggregation of gastric mucin at low pH. *Biomacromolecules*, 6(6) :3458–3466.
- [Hopkins et al., 2001] Hopkins, S. A., Niedergang, F., Corthesy-Theulaz, I. E., and Kraehenbuhl, J. P. (2001). A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer’s patch dendritic cells. *Cell. Microbiol.*, 2(1) :59–68.
- [Huang et al., 2000] Huang, Y., Leobandung, W., Foss, A., and Peppas, N. A. (2000). Molecular aspects of muco- and bioadhesion : tethered structures and site-specific surfaces. *J. Control. Release*, 65(1-2) :63–71.
- [Huckaby and Lai, 2017] Huckaby, J. T. and Lai, S. K. (2017). PEGylation for enhancing nanoparticle diffusion in mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 124 :125–139.
- [Hyun et al., 2012] Hyun, N., Chandsawangbhuwana, C., Zhu, Q., Shi, L. Z., Yang-Wong, C., and Berns, M. W. (2012). Effects of viscosity on sperm motility studied with optical tweezers. *J. Biomed. Opt.*, 17(2) :25005.

-
- [Jakobsson et al., 2015] Jakobsson, H. E., Rodriguez-Piñeiro, A. M., Schütte, A., Ermund, A., Boysen, P., Bemark, M., Sommer, F., Bäckhed, F., Hansson, G. C., and Johansson, M. E. V. (2015). The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep.*, 16(2) :164–177.
- [Janmey et al., 2007] Janmey, P. A., Georges, P. C., and Hvidt, S. (2007). Basic Rheology for Biologists. In *Methods Cell Biol.*, volume 83, pages 1–27.
- [Jeffries et al., 2016] Jeffries, J. L., Jia, J., Choi, W., Choe, S., Miao, J., Xu, Y., Powell, R., Lin, J., Kuang, Z., Gaskins, H. R., and Lau, G. W. (2016). Pseudomonas aeruginosa pyocyanin modulates mucin glycosylation with sialyl-Lewis(x) to increase binding to airway epithelial cells. *Mucosal Immunol.*, 9(4) :1039–1050.
- [Johansson et al., 2014] Johansson, M. E. V., Gustafsson, J. K., Holmén Larsson, J. M., Jabbar, K. S., Xia, L., Xu, H., Ghishan, F. K., Carvalho, F. A., Gewirtz, A. T., Sjövall, H., and Hansson, G. C. (2014). Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*, 63(2) :281–291.
- [Johansson et al., 2015] Johansson, M. E. V., Jakobsson, H. E., Holmén Larsson, J. M., Schütte, A., Ermund, A., Rodriguez-Piñeiro, A. M., Arike, L., Wising, C., Svensson, F., Bäckhed, F., and Hansson, G. C. (2015). Normalization of Host Intestinal Mucus Layers Requires Long-Term Microbial Colonization. *Cell Host Microbe*, 18(5) :582–592.
- [Johansson et al., 2011] Johansson, M. E. V., Larsson, J. M. H., and Hansson, G. C. (2011). The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 108(Suppl 1) :4659–4665.
- [Johansson et al., 2009] Johansson, M. E. V., Thomsson, K. A., and Hansson, G. C. (2009). Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that

-
- their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein. *J. Proteome Res.*, 8(7) :3549–3557.
- [Johnson and Murphy, 2004] Johnson, M. E. and Murphy, P. J. (2004). Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome. *Prog. Retin. Eye Res.*, 23(4) :449–474.
- [Kamphuis et al., 2017] Kamphuis, J. B. J., Mercier-Bonin, M., Eutamène, H., and Theodorou, V. (2017). Mucus organisation is shaped by colonic content ; a new view. *Sci. Rep.*, 7(1) :8527.
- [King and Macklem, 1977] King, M. and Macklem, P. T. (1977). Rheological properties of microliter quantities of normal mucus. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.*, 42(6) :797–802.
- [Kirkman-Brown and Smith, 2011] Kirkman-Brown, J. C. and Smith, D. J. (2011). Sperm motility : is viscosity fundamental to progress? *Mol. Hum. Reprod.*, 17(8) :539–544.
- [Ko and Dixon, 2018] Ko, P. and Dixon, S. J. (2018). Protein palmitoylation and cancer. *EMBO Rep.*, 19(10) :e46666.
- [Kong et al., 2015] Kong, Y., Joshi, H. J., Schjoldager, K. T.-B. G., Madsen, T. D., Gerken, T. A., Vester-Christensen, M. B., Wandall, H. H., Bennett, E. P., Lavery, S. B., Vakhrushev, S. Y., and Clausen, H. (2015). Probing polypeptide GalNAc-transferase isoform substrate specificities by in vitro analysis. *Glycobiology*, 25(1) :55–65.
- [Kootala et al., 2018] Kootala, S., Filho, L., Srivastava, V., Linderberg, V., Moussa, A., David, L., Trombotto, S., and Crouzier, T. (2018). Reinforcing Mucus Barrier Properties with Low Molar Mass Chitosans. *Biomacromolecules*, 19(3) :872–882.
- [Kramer et al., 2015] Kramer, J. R., Onoa, B., Bustamante, C., and Bertozzi, C. R. (2015). Chemically tunable mucin chimeras assembled on living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 112(41) :12574–12579.

-
- [Krieg et al., 1998a] Krieg, J., Hartmann, S., Vicentini, A., Gläsner, W., Hess, D., and Hofsteenge, J. (1998a). Recognition signal for C-mannosylation of Trp-7 in RNase 2 consists of sequence Trp-x-x-Trp. *Mol. Biol. Cell*, 9(2) :301–309.
- [Krieg et al., 1998b] Krieg, J., Hartmann, S., Vicentini, A., Gläsner, W., Hess, D., and Hofsteenge, J. (1998b). Recognition signal for C-mannosylation of Trp-7 in RNase 2 consists of sequence Trp-x-x-Trp. *Mol. Biol. Cell*, 9(2) :301–309.
- [Kurjan and Herskowitz, 1982] Kurjan, J. and Herskowitz, I. (1982). Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha) : a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor. *Cell*, 30(3) :933–943.
- [Lai et al., 2007] Lai, S. K., O’Hanlon, D. E., Harrold, S., Man, S. T., Wang, Y.-Y., Cone, R. A., and Hanes, J. (2007). Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 104(5) :1482–1487.
- [Lai et al., 2011a] Lai, S. K., Suk, J. S., Pace, A., Wang, Y.-Y., Yang, M., Mert, O., Chen, J., Kim, J., and Hanes, J. (2011a). Drug carrier nanoparticles that penetrate human chronic rhinosinusitis mucus. *Biomaterials*, 32(26) :6285–6290.
- [Lai et al., 2011b] Lai, S. K., Suk, J. S., Pace, A., Wang, Y.-Y., Yang, M., Mert, O., Chen, J., Kim, J., and Hanes, J. (2011b). Drug carrier nanoparticles that penetrate human chronic rhinosinusitis mucus. *Biomaterials*, 32(26) :6285–6290.
- [Lai et al., 2009a] Lai, S. K., Wang, Y.-Y., Cone, R. A., Wirtz, D., and Hanes, J. (2009a). Altering mucus rheology to "solidify" human mucus at the nanoscale. *PLoS One*, 4(1) :e4294.
- [Lai et al., 2010] Lai, S. K., Wang, Y.-Y., Hida, K., Cone, R. A., and Hanes, J. (2010). Nanoparticles reveal that human cervicovaginal mucus is riddled with pores larger than viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 107(2) :598–603.

-
- [Lai et al., 2009b] Lai, S. K., Wang, Y.-Y., Wirtz, D., and Hanes, J. (2009b). Micro- and macrorheology of mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61(2) :86–100.
- [Landry et al., 2006] Landry, R. M., An, D., Hupp, J. T., Singh, P. K., and Parsek, M. R. (2006). Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol. Microbiol.*, 59(1) :142–151.
- [Lang et al., 2007] Lang, T., Hansson, G. C., and Samuelsson, T. (2007). Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 104(41) :16209–16214.
- [Lang et al., 2016] Lang, T., Klasson, S., Larsson, E., Johansson, M. E. V., Hansson, G. C., and Samuelsson, T. (2016). Searching the Evolutionary Origin of Epithelial Mucus Protein Components - Mucins and FCGBP. *Mol. Biol. Evol.*, 33(8) :1921–1936.
- [Leal et al., 2018] Leal, J., Dong, T., Taylor, A., Siegrist, E., Gao, F., Smyth, H. D., and Ghosh, D. (2018). Mucus-penetrating phage-displayed peptides for improved transport across a mucus-like model. *Int. J. Pharm.*, 553(1-2) :57–64.
- [Leal et al., 2017] Leal, J., Smyth, H. D. C., and Ghosh, D. (2017). Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 532(1) :555–572.
- [Leitich et al., 2003] Leitich, H., Bodner-Adler, B., Brunbauer, M., Kaider, A., Egarter, C., and Husslein, P. (2003). Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery : A meta-analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 189(1) :139–147.
- [Lesuffleur et al., 1993] Lesuffleur, T., Porchet, N., Aubert, J.-P., Swallow, D. M., Gum, J. R., Kim, Y. S., Real, F. X., and Zweibaum, A. (1993). Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J. Cell Sci.*, 106(Pt 3) :771–783.

-
- [Lethem et al., 1990] Lethem, M. I., James, S. L., Marriott, C., and Burke, J. F. (1990). The origin of DNA associated with mucus glycoproteins in cystic fibrosis sputum. *Eur. Respir. J.*, 3(1) :19–23.
- [Li et al., 2012] Li, L., Lieleg, O., Jang, S., Ribbeck, K., and Han, J. (2012). A microfluidic in vitro system for the quantitative study of the stomach mucus barrier function. *Lab Chip*, 12(20) :4071–4079.
- [Li et al., 2013] Li, L. D., Crouzier, T., Sarkar, A., Dunphy, L., Han, J., and Ribbeck, K. (2013). Spatial configuration and composition of charge modulates transport into a mucin hydrogel barrier. *Biophysical Journal*, 105(6) :1357–1365.
- [Lichtenberger, 1995] Lichtenberger, L. M. (1995). The Hydrophobic Barrier Properties of Gastrointestinal Mucus. *Annu. Rev. Physiol.*, 57(1) :565–583.
- [Lieleg et al., 2010] Lieleg, O., Vladescu, I., and Ribbeck, K. (2010). Characterization of particle translocation through mucin hydrogels. *Biophys. J.*, 98(9) :1782–1789.
- [Lin-Cereghino et al., 2013] Lin-Cereghino, G. P., Stark, C. M., Kim, D., Chang, J., Shaheen, N., Poerwanto, H., Agari, K., Moua, P., Low, L. K., Tran, N., Huang, A. D., Nattestad, M., Oshiro, K. T., Chang, J. W., Chavan, A., Tsai, J. W., and Lin-Cereghino, J. (2013). The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene*, 519(2) :311–317.
- [Liu et al., 2000] Liu, B., Rayment, S. A., Gyurko, C., Oppenheim, F. G., Offner, G. D., and Troxler, R. F. (2000). The recombinant N-terminal region of human salivary mucin MG2 (MUC7) contains a binding domain for oral streptococci and exhibits candidacidal activity. *Biochem. J.*, 345(3) :557–564.
- [Livraghi-Butrico et al., 2017] Livraghi-Butrico, A., Grubb, B. R., Wilkinson, K. J., Volmer, A. S., Burns, K. A., Evans, C. M., O’Neal, W. K., and Boucher, R. C. (2017).

-
- Contribution of mucus concentration and secreted mucins Muc5ac and Muc5b to the pathogenesis of muco-obstructive lung disease. *Mucosal Immunol.*, 10(2) :395–407.
- [Lock et al., 2018] Lock, J. Y., Carlson, T. L., Wang, C.-M., Chen, A., and Carrier, R. L. (2018). Acute Exposure to Commonly Ingested Emulsifiers Alters Intestinal Mucus Structure and Transport Properties. *Sci. Rep.*, 8(1) :10008.
- [Löffler et al., 1996] Löffler, A., Doucey, M. A., Jansson, A. M., Müller, D. R., De Beer, T., Hess, D., Meldal, M., Richter, W. J., Vliegenthart, J. F. G., and Hofsteenge, J. (1996). Spectroscopic and protein chemical analyses demonstrate the presence of C-mannosylated tryptophan in intact human RNase 2 and its isoforms. *Biochemistry*, 35(37) :12005–12014.
- [Lorand and Graham, 2003] Lorand, L. and Graham, R. M. (2003). Transglutaminases : crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4(2) :140–156.
- [Lousinian et al., 2018] Lousinian, S., Mackie, A. R., Rigby, N. M., Panayiotou, C., and Ritzoulis, C. (2018). Microcalorimetry of the intestinal mucus : Hydrogen bonding and self-assembly of mucin. *Int. J. Biol. Macromol.*, 112 :555–560.
- [Lüdeking et al., 1998] Lüdeking, A., Fegert, P., Blin, N., and Gött, P. (1998). Osmotic changes and ethanol modify TFF gene expression in gastrointestinal cell lines. *FEBS Lett.*, 439(1-2) :180–184.
- [Lugea et al., 2000] Lugea, A., Salas, A., Casalot, J., Guarner, F., and Malagelada, J. R. (2000). Surface hydrophobicity of the rat colonic mucosa is a defensive barrier against macromolecules and toxins. *Gut*, 46(4) :515–521.
- [Ma et al., 2018] Ma, J., Rubin, B. K., and Voinow, J. A. (2018). Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest*, 154(1) :169–176.

-
- [Maccani et al., 2014] Maccani, A., Landes, N., Stadlmayr, G., Maresch, D., Leitner, C., Maurer, M., Gasser, B., Ernst, W., Kunert, R., and Mattanovich, D. (2014). *Pichia pastoris* secretes recombinant proteins less efficiently than Chinese hamster ovary cells but allows higher space-time yields for less complex proteins. *Biotechnol. J.*, 9(4) :526–537.
- [Macierzanka et al., 2014] Macierzanka, A., Mackie, A. R., Bajka, B. H., Rigby, N. M., Nau, F., and Dupont, D. (2014). Transport of particles in intestinal mucus under simulated infant and adult physiological conditions : impact of mucus structure and extracellular DNA. *PLoS One*, 9(4) :e95274.
- [Madsen et al., 2007] Madsen, J., Nielsen, O., Tornøe, I., Thim, L., and Holmskov, U. (2007). Tissue Localization of Human Trefoil Factors 1, 2, and 3. *J. Hist. Soc.*, 55(5) :505–513.
- [Maisel et al., 2016] Maisel, K., Reddy, M., Xu, Q., Chattopadhyay, S., Cone, R., Ensign, L. M., and Hanes, J. (2016). Nanoparticles coated with high molecular weight PEG penetrate mucus and provide uniform vaginal and colorectal distribution *in vivo*. *Nanomedicine*, 11(11) :1337–1343.
- [Maleki et al., 2008] Maleki, A., Lafitte, G., Kjøniksen, A.-L., Thuresson, K., and Nyström, B. (2008). Effect of pH on the association behavior in aqueous solutions of pig gastric mucin. *Carbohydr. Res.*, 343(2) :328–340.
- [Martínez et al., 2016] Martínez, L. E., Hardcastle, J. M., Wang, J., Pincus, Z., Tsang, J., Hoover, T. R., Bansil, R., and Salama, N. R. (2016). *Helicobacter pylori* strains vary cell shape and flagellum number to maintain robust motility in viscous environments. *Mol. Microbiol.*, 99(1) :88–110.
- [Mason et al., 1997] Mason, T. G., Ganesan, K., Van Zanten, J. H., Wirtz, D., and Kuo, S. C. (1997). Particle tracking microrheology of complex fluids. *Physical Review Letters*,

79(17) :3282–3285.

- [Matsui et al., 2006] Matsui, H., Wagner, V. E., Hill, D. B., Schwab, U. E., Rogers, T. D., Button, B., Taylor, R. M., Superfine, R., Rubinstein, M., Iglewski, B. H., and Boucher, R. C. (2006). A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103(48) :18131–18136.
- [McCullagh et al., 1995] McCullagh, C. M., Jamieson, A. M., Blackwell, J., and Gupta, R. (1995). Viscoelastic properties of human tracheobronchial mucin in aqueous solution. *Biopolymers*, 35(2) :149–159.
- [McGuckin et al., 2011] McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P., and Florin, T. H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.*, 9(4) :265–278.
- [McKenzie et al., 2000] McKenzie, C., Thim, L., and Parsons, M. E. (2000). Topical and intravenous administration of trefoil factors protect the gastric mucosa from ethanol-induced injury in the rat. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 14(8) :1033–1040.
- [Mehrotra et al., 1998] Mehrotra, R., Thornton, D. J., and Sheehan, J. K. (1998). Isolation and physical characterization of the MUC7 (MG2) mucin from saliva : evidence for self-association. *Biochem. J.*, 334(Pt 2) :415–422.
- [Meldrum et al., 2018] Meldrum, O. W., Yakubov, G. E., Bonilla, M. R., Deshmukh, O., McGuckin, M. A., and Gidley, M. J. (2018). Mucin gel assembly is controlled by a collective action of non-mucin proteins, disulfide bridges, Ca²⁺-mediated links, and hydrogen bonding. *Sci. Rep.*, 8(1) :5802.
- [Murty et al., 1984] Murty, V. L., Sarosiek, J., Slomiany, A., and Slomiany, B. L. (1984). Effect of lipids and proteins on the viscosity of gastric mucus glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 121(2) :521–529.
- [Muskett et al., 2003] Muskett, F. W., May, F. E. B., Westley, B. R., and Feeney, J. (2003). Solution structure of the disulfide-linked dimer of human intestinal trefoil

-
- factor (TFF3) : the intermolecular orientation and interactions are markedly different from those of other dimeric trefoil proteins. *Biochemistry*, 42(51) :15139–15147.
- [Nakamura et al., 2004] Nakamura, Y., Yokoi, N., Tokushige, H., and Kinoshita, S. (2004). Sialic Acid in Human Tear Fluid Decreases in Dry Eye. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 48(6) :519–523.
- [Narita and Indei, 2016] Narita, T. and Indei, T. (2016). Microrheological Study of Physical Gelation in Living Polymeric Networks. *Macromolecules*, 49(12) :4634–4646.
- [Nett et al., 2013] Nett, J. H., Cook, W. J., Chen, M.-T., Davidson, R. C., Bobrowicz, P., Kett, W., Brevnova, E., Potgieter, T. I., Mellon, M. T., Prinz, B., Choi, B.-K., Zha, D., Burnina, I., Bukowski, J. T., Du, M., Wildt, S., and Hamilton, S. R. (2013). Characterization of the *Pichia pastoris* protein-O-mannosyltransferase gene family. *PLoS One*, 8(7) :e68325.
- [Niwa et al., 2016] Niwa, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., and Simizu, S. (2016). Identification of DPY19L3 as the C-mannosyltransferase of R-spondin1 in human cells. *Mol. Biol. Cell*, 27(5) :744–756.
- [Nyström et al., 2018] Nyström, E. E., Birchenough, G. M., van der Post, S., Arike, L., Gruber, A. D., Hansson, G. C., and Johansson, M. E. (2018). Calcium-activated Chloride Channel Regulator 1 (CLCA1) Controls Mucus Expansion in Colon by Proteolytic Activity. *EBioMedicine*, 33 :134–143.
- [Offner et al., 1998] Offner, G. D., Nunes, D. P., Keates, A. C., Afdhal, N. H., and Troxler, R. F. (1998). The amino-terminal sequence of MUC5B contains conserved multifunctional D domains : implications for tissue-specific mucin functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251(1) :350–355.
- [Okumura et al., 2016] Okumura, R., Kurakawa, T., Nakano, T., Kayama, H., Kinoshita, M., Motooka, D., Gotoh, K., Kimura, T., Kamiyama, N., Kusu, T., Ueda, Y., Wu,

-
- H., Iijima, H., Barman, S., Osawa, H., Matsuno, H., Nishimura, J., Ohba, Y., Nakamura, S., Iida, T., Yamamoto, M., Umemoto, E., Sano, K., and Takeda, K. (2016). Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. *Nature*, 532(7597) :117–121.
- [Olmsted et al., 2001] Olmsted, S. S., Padgett, J. L., Yudin, A. I., Whaley, K. J., Moench, T. R., and Cone, R. A. (2001). Diffusion of macromolecules and virus-like particles in human cervical mucus. *Biophys. J.*, 81(4) :1930–1937.
- [Osman et al., 2018] Osman, G., Rodriguez, J., Chan, S. Y., Chisholm, J., Duncan, G., Kim, N., Tatler, A. L., Shakesheff, K. M., Hanes, J., Suk, J. S., and Dixon, J. E. (2018). PEGylated enhanced cell penetrating peptide nanoparticles for lung gene therapy. *J. Control. Release*, 285 :35–45.
- [Ostedgaard et al., 2017] Ostedgaard, L. S., Moninger, T. O., McMenimen, J. D., Sawin, N. M., Parker, C. P., Thornell, I. M., Powers, L. S., Gansemer, N. D., Bouzek, D. C., Cook, D. P., Meyerholz, D. K., Abou Alaiwa, M. H., Stoltz, D. A., and Welsh, M. J. (2017). Gel-forming mucins form distinct morphologic structures in airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 114(26) :6842–6847.
- [Outchkourov et al., 2002] Outchkourov, N. S., Stiekema, W. J., and Jongasma, M. A. (2002). Optimization of the Expression of Equisatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, 24(1) :18–24.
- [Park et al., 2007] Park, M.-S., Chung, J.-W., Kim, Y.-K., Chung, S.-C., and Kho, H.-S. (2007). Viscosity and wettability of animal mucin solutions and human saliva. *Oral Dis.*, 13(2) :181–186.
- [Partenhauser et al., 2015] Partenhauser, A., Laffleur, F., Rohrer, J., and Bernkop-Schnürch, A. (2015). Thiolated silicone oil : Synthesis, gelling and mucoadhesive properties. *Acta Biomater.*, 16 :169–177.

-
- [Perez-Vilar and Boucher, 2004] Perez-Vilar, J. and Boucher, R. C. (2004). Reevaluating gel-forming mucins' roles in cystic fibrosis lung disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 37(10) :1564–1577.
- [Perez-Vilar et al., 2005] Perez-Vilar, J., Olsen, J. C., Chua, M., and Boucher, R. C. (2005). pH-dependent intraluminal organization of mucin granules in live human mucous/goblet cells. *J. Biol. Chem.*, 280(17) :16868–16881.
- [Perez-Vilar et al., 2004] Perez-Vilar, J., Randell, S. H., and Boucher, R. C. (2004). C-Mannosylation of MUC5AC and MUC5B Cys subdomains. *Glycobiology*, 14(4) :325–337.
- [Petersson et al., 2011] Petersson, J., Schreiber, O., Hansson, G. C., Gendler, S. J., Velcich, A., Lundberg, J. O., Roos, S., Holm, L., and Phillipson, M. (2011). Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 300(2) :327–333.
- [Petrou and Crouzier, 2018] Petrou, G. and Crouzier, T. (2018). Mucins as multifunctional building blocks of biomaterials. *Biomater. Sci.*, 6(9) :2282–2297.
- [Pezzulo et al., 2012] Pezzulo, A. A., Tang, X. X., Hoegger, M. J., Abou Alaiwa, M. H., Ramachandran, S., Moninger, T. O., Karp, P. H., Wohlford-Lenane, C. L., Haagsman, H. P., van Eijk, M., Bánfi, B., Horswill, A. R., Stoltz, D. A., McCray, P. B., Welsh, M. J., and Zabner, J. (2012). Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature*, 487(7405) :109–113.
- [Podolsky et al., 1993] Podolsky, D. K., Lynch-Devaney, K., Stow, J. L., Oates, P., Murgue, B., DeBeaumont, M., Sands, B. E., and Mahida, Y. R. (1993). Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J. Biol. Chem.*, 268(9) :6694–6702.

-
- [Ponchel and Irache, 1998] Ponchel, G. and Irache, J.-M. (1998). Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 34(2-3) :191–219.
- [Pontier-Bres et al., 2012] Pontier-Bres, R., Prodon, F., Munro, P., Rampal, P., Lemichez, E., Peyron, J. F., and Czerucka, D. (2012). Modification of salmonella typhimurium motility by the probiotic yeast strain *saccharomyces boulardii*. *PLoS One*, 7(3) :e33796.
- [Pozzi et al., 2014] Pozzi, D., Colapicchioni, V., Caracciolo, G., Piovesana, S., Capriotti, A. L., Palchetti, S., De Grossi, S., Riccioli, A., Amenitsch, H., and Laganà, A. (2014). Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio-nano-interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids : from nanostructure to uptake in cancer cells. *Nanoscale*, 6(5) :2782–2792.
- [Rantamäki et al., 2012] Rantamäki, A. H., Javanainen, M., Vattulainen, I., and Holopainen, J. M. (2012). Do lipids retard the evaporation of the tear fluid? *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 53(10) :6442–6447.
- [Raynal et al., 2002] Raynal, B., D, Hardingham, T. E., Thornton, D. J., and Sheehan, J. K. (2002). Concentrated solutions of salivary MUC5B mucin do not replicate the gel-forming properties of saliva. *Biochem. J.*, 362(2) :289–296.
- [Raynal et al., 2003] Raynal, B. D. E., Hardingham, T. E., Sheehan, J. K., and Thornton, D. J. (2003). Calcium-dependent Protein Interactions in MUC5B Provide Reversible Cross-links in Salivary Mucus. *J. Biol. Chem.*, 278(31) :28703–28710.
- [Recktenwald and Hansson, 2016] Recktenwald, C. V. and Hansson, G. C. (2016). The Reduction-insensitive Bonds of the MUC2 Mucin Are Isopeptide Bonds. *J. Biol. Chem.*, 291(26) :13580–13590.
- [Revoredo et al., 2016] Revoredo, L., Wang, S., Bennett, E. P., Clausen, H., Moremen, K. W., Jarvis, D. L., Ten Hagen, K. G., Tabak, L. A., and Gerken, T. A. (2016).

-
- Mucin-type O-glycosylation is controlled by short- and long-range glycopeptide substrate recognition that varies among members of the polypeptide GalNAc transferase family. *Glycobiology*, 26(4) :360–376.
- [Ridley et al., 2016] Ridley, C. E., Kirkham, S., Williamson, S. J., Davis, C. W., Woodman, P., and Thornton, D. J. (2016). Biosynthesis of the polymeric gel-forming mucin MUC5B. *Am. J. Phys. Lung Cell. Mol. Phys.*, 310(10) :L993—1002.
- [Ridley et al., 2014] Ridley, C. E., Kouvatsos, N., Raynal, B. D., Howard, M., Collins, R. F., Desseyn, J.-L., Jowitt, T. A., Baldock, C., Davis, C. W., Hardingham, T. E., and Thornton, D. J. (2014). Assembly of the respiratory mucin MUC5B : a new model for a gel-forming mucin. *J. Biol. Chem.*, 289(23) :16409–16420.
- [Rizvi et al., 2009] Rizvi, A. A., Quraishi, M. I., Sarkar, V., DuBois, C., Biro, S., and Mulhall, J. (2009). The effect of pH and viscosity on bovine spermatozoa motility under controlled conditions. *Int. Urol. Nephrol.*, 41(3) :523–530.
- [Robbe-Masselot et al., 2003] Robbe-Masselot, C., Capon, C., Maes, E., Rousset, M., Zweibaum, A., Zanetta, J.-P., and Michalski, J.-C. (2003). Evidence of regio-specific glycosylation in human intestinal mucins : presence of an acidic gradient along the intestinal tract. *J. Biol. Chem.*, 278(47) :46337–46348.
- [Robbe-Masselot et al., 2009] Robbe-Masselot, C., Maes, E., Rousset, M., Michalski, J.-C., and Capon, C. (2009). Glycosylation of human fetal mucins : a similar repertoire of O-glycans along the intestinal tract. *Glycoconj. J.*, 26(4) :397–413.
- [Romero et al., 2014] Romero, R., Dey, S. K., and Fisher, S. J. (2014). Preterm labor : One syndrome, many causes. *Science.*, 345(6198) :760–765.
- [Rose, 2006] Rose, M. C. (2006). Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease. *Physiol. Rev.*, 86 :245–278.

-
- [Rousseau et al., 2004] Rousseau, K., Byrne, C., Kim, Y. S., Gum, J. R., Swallow, D. M., and Toribara, N. W. (2004). The complete genomic organization of the human MUC6 and MUC2 mucin genes. *Genomics*, 83(5) :936–939.
- [Rousseau et al., 2003] Rousseau, K., Claes, W., Whitehouse, D. B., Carlstedt, I., and Dallas, M. S. (2003). New Monoclonal Antibodies to Non-Glycosylated Domains of the Secreted Mucins MUC5B and MUC7. *Hybrid. Hybridomics*, 22(5) :293–299.
- [Rubin et al., 2000] Rubin, D. C., Swietlicki, E. A., Iordanov, H., Fritsch, C., and Levin, M. S. (2000). Novel goblet cell gene related to IgGFcgammaBP is regulated in adapting gut after small bowel resection. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 279(5) :1003–1010.
- [Ruchaud-Sparagano et al., 2004] Ruchaud-Sparagano, M.-H., Westley, B. R., and May, F. E. B. (2004). The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in humangastric mucosa. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61(15) :1946–1954.
- [Russell et al., 1977] Russell, W. C., Graham, F. L., Smiley, J., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.*, 36(1) :59–74.
- [Sackmann et al., 2014] Sackmann, E. K., Fulton, A. L., and Beebe, D. J. (2014). The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, 507(7491) :181–189.
- [Sadasivan et al., 2011] Sadasivan, V. D., Narpala, S. R., Budil, D. E., Sacco, A., and Carrier, R. L. (2011). Modeling the human intestinal mucin (MUC2) C-terminal cystine knot dimer. *J. Mol. Model.*, 17(11) :2953–2963.
- [Sagt et al., 2002] Sagt, C. M. J., Muller, W. H., van der Heide, L., Boonstra, J., Verkleij, A. J., and Verrips, C. T. (2002). Impaired Cutinase Secretion in *Saccharomyces cerevi-*

-
- siae Induces Irregular Endoplasmic Reticulum (ER) Membrane Proliferation, Oxidative Stress, and ER-Associated Degradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5) :2155–2160.
- [Saltzman et al., 1994] Saltzman, W. M., Radomsky, M. L., Whaley, K. J., and Cone, R. A. (1994). Antibody diffusion in human cervical mucus. *Biophys. J.*, 66(2) :508–515.
- [Schick and Kassen, 2018] Schick, A. and Kassen, R. (2018). Rapid diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung-like conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 115(42) :10714–10719.
- [Schindelin et al., 2012] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012). Fiji : an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, 9(7) :676–682.
- [Schneider et al., 2018] Schneider, H., Pelaseyed, T., Svensson, F., and Johansson, M. E. V. (2018). Study of mucin turnover in the small intestine by in vivo labeling. *Sci. Rep.*, 8(1) :5760.
- [Schneider and Doetsch, 1974] Schneider, W. R. and Doetsch, R. N. (1974). Effect of viscosity on bacterial motility. *J. Bacteriol.*, 117(2) :696–701.
- [Schroeder et al., 2018] Schroeder, H. A., Nunn, K. L., Schaefer, A., Henry, C. E., Lam, F., Pauly, M. H., Whaley, K. J., Zeitlin, L., Humphrys, M. S., Ravel, J., and Lai, S. K. (2018). Herpes simplex virus-binding IgG traps HSV in human cervicovaginal mucus across the menstrual cycle and diverse vaginal microbial composition. *Mucosal Immunology*, 11(5) :1477–1486.
- [Schultz et al., 2017] Schultz, A., Puvvadi, R., Borisov, S. M., Shaw, N. C., Klimant, I., Berry, L. J., Montgomery, S. T., Nguyen, T., Kreda, S. M., Kicic, A., Noble, P. B.,

-
- Button, B., and Stick, S. M. (2017). Airway surface liquid pH is not acidic in children with cystic fibrosis. *Nat. Commun.*, 8(1) :1409.
- [Schuster et al., 2013] Schuster, B. S., Suk, J. S., Woodworth, G. F., and Hanes, J. (2013). Nanoparticle diffusion in respiratory mucus from humans without lung disease. *Bio-materials*, 34(13) :3439–3446.
- [Schütte et al., 2014] Schütte, A., Ermund, A., Becker-Pauly, C., Johansson, M. E. V., Rodriguez-Pineiro, A. M., Bäckhed, F., Müller, S., Lottaz, D., Bond, J. S., and Hansson, G. C. (2014). Microbial-induced meprin β cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 111(34) :12396–12401.
- [Schwartz, 2014] Schwartz, J. L. (2014). Fcgbp - A Potential Viral Trap in RV144. *Open AIDS J.*, 8(1) :21–24.
- [Selvaggi et al., 2010] Selvaggi, L., Salemme, M., Vaccaro, C., Pesce, G., Rusciano, G., Sasso, A., Campanella, C., and Carotenuto, R. (2010). Multiple-Particle-Tracking to investigate viscoelastic properties in living cells. *Methods*, 51(1) :20–26.
- [Shak et al., 1990] Shak, S., Capon, D. J., Hellmiss, R., Marsters, S. A., and Baker, C. L. (1990). Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 87(23) :9188–92.
- [Shan et al., 2016] Shan, W., Zhu, X., Tao, W., Cui, Y., Liu, M., Wu, L., Li, L., Zheng, Y., and Huang, Y. (2016). Enhanced Oral Delivery of Protein Drugs Using Zwitterion-Functionalized Nanoparticles to Overcome both the Diffusion and Absorption Barriers. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8(38) :25444–25453.
- [Shcherbakova et al., 2017] Shcherbakova, A., Tiemann, B., Buettner, F. F. R., and Bakker, H. (2017). Distinct C-mannosylation of netrin receptor thrombospondin type 1

-
- repeats by mammalian DPY19L1 and DPY19L3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 114(10) :2574–2579.
- [Sheehan et al., 1991] Sheehan, J. K., Boot-Handford, R. P., Chantler, E., Carlstedt, I., and Thornton, D. J. (1991). Evidence for shared epitopes within the 'naked' protein domains of human mucus glycoproteins. A study performed by using polyclonal antibodies and electron microscopy. *Biochem. J.*, 274 :293–296.
- [Sheehan et al., 2004] Sheehan, J. K., Kirkham, S., Howard, M., Woodman, P., Kutay, S., Brazeau, C., Buckley, J., and Thornton, D. J. (2004). Identification of molecular intermediates in the assembly pathway of the MUC5AC mucin. *J. Biol. Chem.*, 279(15) :15698–15705.
- [Sheehan et al., 1986] Sheehan, J. K., Oates, K., and Carlstedt, I. (1986). Electron microscopy of cervical, gastric and bronchial mucus glycoproteins. *Biochem. J.*, 239(1) :147–153.
- [Sheils et al., 1996] Sheils, C. A., Käs, J., Travassos, W., Allen, P. G., Janmey, P. A., Wohl, M. E., and Stossel, T. P. (1996). Actin filaments mediate DNA fiber formation in chronic inflammatory airway disease. *Am. J. Pathol.*, 148(3) :919–927.
- [Shi et al., 2014] Shi, L., Zhou, P.-H., Xi, J. L., Yu, H.-G., and Zhang, B.-H. (2014). Recombinant human trefoil factor 3 ameliorates bowel injury : Its anti-inflammatory effect on experimental necrotizing enterocolitis. *Int. J. Pept.*, 2014 :634135.
- [Simonin et al., 2019] Simonin, J., Bille, E., Crambert, G., Noel, S., Dreano, E., Edwards, A., Hatton, A., Pranke, I., Villeret, B., Cottart, C.-H., Vrel, J.-P., Urbach, V., Baatallah, N., Hinzpeter, A., Golec, A., Touqui, L., Nassif, X., Galiotta, L. J. V., Planelles, G., Sallenave, J.-M., Edelman, A., and Sermet-Gaudelus, I. (2019). Airway surface liquid acidification initiates host defense abnormalities in Cystic Fibrosis. *Sci. Rep.*, 9(1) :6516.

-
- [Slomiany et al., 1978] Slomiany, A., Yano, S., Slomiany, B. L., and Glass, G. B. J. (1978). Lipid composition of the gastric mucous barrier in the rat. *J. Biol. Chem.*, 253(11) :3785–3791.
- [Slomiany and Slomiany, 2006] Slomiany, B. and Slomiany, A. (2006). Cytosolic phospholipase A 2 activation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-induced interference with gastric mucin synthesis. *IUBMB Life*, 58(4) :217–223.
- [Slomiany et al., 1988] Slomiany, B. L., Mury, V. L. N., Sarosiek, J., Piotrowski, J., and Slomiany, A. (1988). Role of associated and covalently bound lipids in salivary mucin hydrophobicity : effect of proteolysis and disulfide bridge reduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151(3) :1046–1053.
- [Smith-Dupont et al., 2017] Smith-Dupont, K. B., Wagner, C. E., Witten, J., Conroy, K., Rudoltz, H., Pagidas, K., Snegovskikh, V., House, M., and Ribbeck, K. (2017). Probing the potential of mucus permeability to signify preterm birth risk. *Sci. Rep.*, 7(1) :10302.
- [Spada et al., 2001] Spada, F., Steen, H., Troedsson, C., Kallesoe, T., Spriet, E., Mann, M., and Thompson, E. M. (2001). Molecular Patterning of the Oikoplasmic Epithelium of the Larvacean Tunicate *Oikopleura dioica*. *J. Biol. Chem.*, 276(23) :20624–20632.
- [Stecher et al., 2004] Stecher, B., Hapfelmeier, S., Muller, C., Kremer, M., Stallmach, T., and Hardt, W.-D. (2004). Flagella and Chemotaxis Are Required for Efficient Induction of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Colitis in Streptomycin-Pretreated Mice. *Infect. Immun.*, 72(7) :4138–4150.
- [Stetefeld et al., 2016] Stetefeld, J., McKenna, S. A., and Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering : a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys. Rev.*, 8(4) :409–427.
- [Su et al., 2018] Su, C., Padra, M., Constantino, M. A., Sharba, S., Thorell, A., Lindén, S. K., and Bansil, R. (2018). Influence of the viscosity of healthy and diseased human

-
- mucins on the motility of *Helicobacter pylori*. *Sci. rep.*, 8(1) :9710.
- [Suemori et al., 1991] Suemori, S., Lynch-Devaney, K., and Podolsky, D. K. (1991). Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor : tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 88(24) :11017–11021.
- [Suk et al., 2014] Suk, J. S., Kim, A. J., Trehan, K., Schneider, C. S., Cebotaru, L., Woodward, O. M., Boylan, N. J., Boyle, M. P., Lai, S. K., Guggino, W. B., and Hanes, J. (2014). Lung gene therapy with highly compacted DNA nanoparticles that overcome the mucus barrier. *J. Control. Release*, 178 :8–17.
- [Suk et al., 2009] Suk, J. S., Lai, S. K., Wang, Y.-Y., Ensign, L. M., Zeitlin, P. L., Boyle, M. P., and Hanes, J. (2009). The penetration of fresh undiluted sputum expectorated by cystic fibrosis patients by non-adhesive polymer nanoparticles. *Biomaterials*, 30(13) :2591–2597.
- [Svensson et al., 2018] Svensson, F., Lang, T., Johansson, M. E. V., and Hansson, G. C. (2018). The central exons of the human MUC2 and MUC6 mucins are highly repetitive and variable in sequence between individuals. *Sci. Rep.*, 8(1) :17503.
- [Tailford et al., 2015] Tailford, L. E., Crost, E. H., Kavanaugh, D., and Juge, N. (2015). Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front. Genet.*, 6 :81.
- [Talbot et al., 2018] Talbot, P., Radziwill-Bienkowska, J. M., Kamphuis, J. B. J., Steenkeste, K., Bettini, S., Robert, V., Noordine, M.-L., Mayeur, C., Gaultier, E., Langella, P., Robbe-Masselot, C., Houdeau, E., Thomas, M., and Mercier-Bonin, M. (2018). Food-grade TiO₂ is trapped by intestinal mucus in vitro but does not impair mucin O-glycosylation and short-chain fatty acid synthesis in vivo : implications for gut barrier protection. *J. Nanobiotechnology*, 16(1) :53.
- [Tang et al., 1999] Tang, J. X., Janmey, P. A., Stossel, T. P., and Ito, T. (1999). Thiol oxidation of actin produces dimers that enhance the elasticity of the F-actin network.

Biophys. J., 76(4) :2208–15.

- [Tang et al., 2016] Tang, X. X., Ostedgaard, L. S., Hoegger, M. J., Moninger, T. O., Karp, P. H., McMenimen, J. D., Choudhury, B., Varki, A., Stoltz, D. A., and Welsh, M. J. (2016). Acidic pH increases airway surface liquid viscosity in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.*, 126(3) :879–891.
- [Tarran et al., 2006] Tarran, R., Button, B., and Boucher, R. C. (2006). Regulation of normal and cystic fibrosis airway surface liquid volume by phasic shear stress. *Annu. Rev. Physiol.*, 68(1) :543–561.
- [Thim et al., 2002] Thim, L., Madsen, F., and Poulsen, S. S. (2002). Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur. J. Clin. Invest.*, 32(7) :519–527.
- [Thomázy and Fésüs, 1989] Thomázy, V. and Fésüs, L. (1989). Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.*, 255(1) :215–224.
- [Tinevez et al., 2017] Tinevez, J.-Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G. M., Reynolds, G. D., Laplantine, E., Bednarek, S. Y., Shorte, S. L., and Eliceiri, K. W. (2017). Track-Mate : An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*, 115 :80–90.
- [Tleugabulova et al., 1998] Tleugabulova, D., Falcón, V., Sewer, M., and Pentón, E. (1998). Aggregation of recombinant hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 716(1-2) :209–219.
- [Tomaiuolo et al., 2014] Tomaiuolo, G., Rusciano, G., Caserta, S., Carciati, A., Carnovale, V., Abete, P., Sasso, A., and Guido, S. (2014). A new method to improve the clinical evaluation of cystic fibrosis patients by mucus viscoelastic properties. *PLoS One*, 9(1) :e82297.

-
- [Tomasetto et al., 2000] Tomasetto, C., Masson, R., Linares, J. L., Wendling, C., Lefebvre, O., Chenard, M. P., and Rio, M. C. (2000). pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. *Gastroenterology*, 118(1) :70–80.
- [Trillo-Muyo et al., 2018] Trillo-Muyo, S., Nilsson, H. E., Recktenwald, C. V., Ermund, A., Ridley, C., Meiss, L. N., Bähr, A., Klymiuk, N., Wine, J. J., Koeck, P. J. B., Thornton, D. J., Hebert, H., and Hansson, G. C. (2018). Granule-stored MUC5B mucins are packed by the non-covalent formation of N-terminal head-to-head tetramers. *J. Biol. Chem.*, 293(15) :5746–5754.
- [Trottmann et al., 2015] Trottmann, M., Stepp, H., Sroka, R., Heide, M., Liedl, B., Reese, S., Becker, A. J., Stief, C. G., and Kölle, S. (2015). Probe-based confocal laser endomicroscopy (pCLE) - a new imaging technique for in situ localization of spermatozoa. *J. Biophotonics*, 8(5) :415–421.
- [Tung et al., 2017] Tung, C.-K., Lin, C., Harvey, B., Fiore, A. G., Ardon, F., Wu, M., and Suarez, S. S. (2017). Fluid viscoelasticity promotes collective swimming of sperm. *Sci. Rep.*, 7(1) :3152.
- [Unson, 2008] Unson, C. G. (2008). Expression of glucagon receptors in tetracycline-inducible HEK293S GnT1- stable cell lines : An approach toward purification of receptor protein for structural studies. *Biopolymers*, 90(3) :287–296.
- [Valque et al., 2012] Valque, H., Gouyer, V., Gottrand, F., and Desseyn, J.-L. (2012). MUC5B Leads to Aggressive Behavior of Breast Cancer MCF7 Cells. *PLoS One*, 7(10) :e46699.
- [Van Klinken et al., 1998] Van Klinken, B. J. W., Einerhand, A. W. C., Büller, H. A., and Dekker, J. (1998). The oligomerization of a family of four genetically clustered human gastrointestinal mucins. *Glycobiology*, 8(1) :67–75.

-
- [Varisli et al., 2008] Varisli, O., Uguz, C., Agca, C., and Agca, Y. (2008). Various Physical Stress Factors on Rat Sperm Motility, Integrity of Acrosome, and Plasma Membrane. *J. Androl.*, 30(1) :75–86.
- [Vasconcellos et al., 1994] Vasconcellos, C. A., Allen, P. G., Wohl, M. E., Drazen, J. M., Janmey, P. A., and Stossel, T. P. (1994). Reduction in Viscosity of Cystic Fibrosis Sputum in Vitro by Gelsolin. *Science*, 263(2) :969–972.
- [Verdugo, 2012] Verdugo, P. (2012). Supramolecular dynamics of mucus. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2(11) :a009597.
- [Viergiver and Pommerenke, 1946] Viergiver, E. and Pommerenke, W. (1946). Cyclic Variations in the Viscosity of Cervical Mucus and its Correlation with amount of Secretion and Basal Temperature. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 51(2) :192–200.
- [Vinall et al., 1998] Vinall, L. E., Hill, A. S., Pigny, P., Pratt, W. S., Toribara, N. W., Gum, J. R., Kim, Y. S., Porchet, N., Aubert, J.-P., and Swallow, D. M. (1998). Variable number tandem repeat polymorphism of the mucin genes located in the complex on 11p15.5. *Hum. Genet.*, 102(3) :357–366.
- [Vincent et al., 2007] Vincent, A., Perrais, M., Desseyn, J.-L., Aubert, J.-P., Pigny, P., and Van Seuningem, I. (2007). Epigenetic regulation (DNA methylation, histone modifications) of the 11p15 mucin genes (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) in epithelial cancer cells. *Oncogene*, 26(45) :6566–6576.
- [Vliegthart and Casset, 1998] Vliegthart, J. F. G. and Casset, F. (1998). Novel forms of protein glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8(5) :565–571.
- [Voorhamme and Yandell, 2006] Voorhamme, D. and Yandell, C. A. (2006). LONG R3IGF-I as a more potent alternative to insulin in serum-free culture of HEK293 cells. *Mol. Biotechnol.*, 34(2) :201–204.

-
- [Vukosavljevic et al., 2017] Vukosavljevic, B., Murgia, X., Schwarzkopf, K., Schaefer, U. F., Lehr, C.-M., and Windbergs, M. (2017). Tracing molecular and structural changes upon mucolysis with N-acetyl cysteine in human airway mucus. *Int. J. Pharm.*, 533(2) :373–376.
- [Wagner et al., 2017] Wagner, C. E., Turner, B. S., Rubinstein, M., McKinley, G. H., and Ribbeck, K. (2017). A rheological study of the association and dynamics of MUC5AC gels. *Biomacromolecules*, 18(11) :3654–3664.
- [Wang et al., 2015a] Wang, X., Du, M., Han, H., Song, Y., and Zheng, Q. (2015a). Boundary lubrication by associative mucin. *Langmuir*, 31(16) :4733–4740.
- [Wang et al., 2013] Wang, Y.-Y., Lai, S. K., Ensign, L. M., Zhong, W., Cone, R. A., and Hanes, J. (2013). The microstructure and bulk rheology of human cervicovaginal mucus are remarkably resistant to changes in pH. *Biomacromolecules*, 14(12) :4429–4435.
- [Wang et al., 2011] Wang, Y.-Y., Lai, S. K., So, C., Schneider, C. S., Cone, R. A., and Hanes, J. (2011). Mucoadhesive nanoparticles may disrupt the protective human mucus barrier by altering its microstructure. *PLoS One*, 6(6) :e21547.
- [Wang et al., 2015b] Wang, Y.-Y., Nunn, K. L., Harit, D., McKinley, S. A., and Lai, S. K. (2015b). Minimizing biases associated with tracking analysis of submicron particles in heterogeneous biological fluids. *J. Control. Release*, 220(Pt A) :37–43.
- [Wang et al., 2016] Wang, Y.-Y., Schroeder, H. A., Nunn, K. L., Woods, K., Anderson, D. J., Lai, S. K., and Cone, R. A. (2016). Diffusion of Immunoglobulin G in Shed Vaginal Epithelial Cells and in Cell-Free Regions of Human Cervicovaginal Mucus. *PLoS One*, 11(6) :e0158338.
- [Wei et al., 2012] Wei, X., Yang, Z., Rey, F. E., Ridaura, V. K., Davidson, N. O., Gordon, J. I., and Semenkovich, C. F. (2012). Fatty acid synthase modulates intestinal barrier function through palmitoylation of mucin 2. *Cell Host Microbe*, 11(2) :140–152.

-
- [Wichert et al., 2017] Wichert, R., Ermund, A., Schmidt, S., Schweinlin, M., Ksiazek, M., Arnold, P., Knittler, K., Wilkens, F., Potempa, B., Rabe, B., Stirnberg, M., Lucius, R., Bartsch, J. W., Nikolaus, S., Falk-Paulsen, M., Rosenstiel, P., Metzger, M., Rose-John, S., Potempa, J., Hansson, G. C., Dempsey, P. J., and Becker-Pauly, C. (2017). Mucus Detachment by Host Metalloprotease Meprin β Requires Shedding of Its Inactive Pro-form, which Is Abrogated by the Pathogenic Protease RgpB. *Cell Rep.*, 21(8) :2090–2103.
- [Wirtz, 2009] Wirtz, D. (2009). Particle-tracking microrheology of living cells : principles and applications. *Annu. Rev. Biophys.*, 38(1) :301–326.
- [Witas et al., 1983] Witas, H., Sarosiek, J., Aono, M., Mury, V. L. N., Slomiany, A., and Slomiany, B. L. (1983). Lipids associated with rat small-intestinal mucus glycoprotein. *Carbohydr. Res.*, 120 :67–76.
- [Witten and Ribbeck, 2017] Witten, J. and Ribbeck, K. (2017). The particle in the spider’s web : transport through biological hydrogels. *Nanoscale*, 9(24) :8080–8095.
- [Witten et al., 2018] Witten, J., Samad, T., and Ribbeck, K. (2018). Selective permeability of mucus barriers. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 52 :124–133.
- [Witten et al., 2019] Witten, J., Samad, T., and Ribbeck, K. (2019). Molecular characterization of mucus binding. *Biomacromolecules*, page acs.biomac.8b01467.
- [Wu et al., 2010] Wu, D., Ma, D., Hao, Y.-Y., Chu, J., Wang, Y.-H., Zhuang, Y.-P., and Zhang, S.-L. (2010). Incomplete formation of intramolecular disulfide bond triggers degradation and aggregation of human consensus interferon-alpha mutant by *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85(6) :1759–1767.
- [Xia et al., 2005] Xia, B., Royall, J. A., Damera, G., Sachdev, G. P., and Cummings, R. D. (2005). Altered O-glycosylation and sulfation of airway mucins associated with cystic fibrosis. *Glycobiology*, 15(8) :747–775.

-
- [Xian et al., 1999] Xian, C. J., Howarth, G. S., Mardell, C. E., Cool, J. C., Familiari, M., Read, L. C., and Giraud, A. S. (1999). Temporal changes in TFF3 expression and jejunal morphology during methotrexate-induced damage and repair. *Am. J. Phys.*, 277(4 Pt 1) :G785—795.
- [Xu et al., 2016] Xu, D., Pavlidis, P., Thamadilok, S., Redwood, E., Fox, S., Blekhman, R., Ruhl, S., and Gokcumen, O. (2016). Recent evolution of the salivary mucin MUC7. *Sci. Rep.*, 6(1) :31791.
- [Xu et al., 2013] Xu, Q., Boylan, N. J., Suk, J. S., Wang, Y.-Y., Nance, E. A., Yang, J.-C., McDonnell, P. J., Cone, R. A., Duh, E. J., and Hanes, J. (2013). Nanoparticle diffusion in, and microrheology of, the bovine vitreous ex vivo. *J. Control. Release*, 167(1) :76–84.
- [Yang et al., 2017] Yang, N., Wang, X., Teng, D., Mao, R., Hao, Y., Feng, X., and Wang, J. (2017). Deleting the first disulphide bond in an arenicin derivative enhances its expression in *Pichia pastoris*. *Let. Appl. Microbiol.*, 65(3) :241–248.
- [Yildiz et al., 2015a] Yildiz, H. M., Carlson, T. L., Goldstein, A. M., and Carrier, R. L. (2015a). Mucus Barriers to Microparticles and Microbes are Altered in Hirschsprung’s Disease. *Macromol. Biosci.*, 15(5) :712–718.
- [Yildiz et al., 2015b] Yildiz, H. M., McKelvey, C. A., Marsac, P. J., and Carrier, R. L. (2015b). Size selectivity of intestinal mucus to diffusing particulates is dependent on surface chemistry and exposure to lipids. *J. Drug Target.*, 23(7-8) :768–774.
- [Yildiz et al., 2015c] Yildiz, H. M., Speciner, L., Ozdemir, C., Cohen, D. E., and Carrier, R. L. (2015c). Food-associated stimuli enhance barrier properties of gastrointestinal mucus. *Biomaterials*, 54 :1–8.
- [Yuan et al., 2015] Yuan, S., Hollinger, M., Lachowicz-Scroggins, M. E., Kerr, S. C., Dunican, E. M., Daniel, B. M., Ghosh, S., Erzurum, S. C., Willard, B., Hazen, S. L., Huang,

-
- X., Carrington, S. D., Oscarson, S., and Fahy, J. V. (2015). Oxidation increases mucin polymer cross-links to stiffen airway mucus gels. *Sci. Transl. Med.*, 7(276) :276ra27.
- [Zahm et al., 1998] Zahm, J. M., Galabert, C., Chaffin, A., Chazalette, J. P., Grosskopf, C., and Puchelle, E. (1998). Improvement of cystic fibrosis airway mucus transportability by recombinant human DNase is related to changes in phospholipid profile. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157(6 PART I) :1779–1784.
- [Zanetta et al., 2004] Zanetta, J.-P., Pons, A., Richet, C., Huet, G., Timmerman, P., Leroy, Y., Bohin, A., Bohin, J. P., Trinel, P. A., Poulain, D., and Hofsteenge, J. (2004). Quantitative gas chromatography/mass spectrometry determination of C-mannosylation of tryptophan residues in glycoproteins. *Anal. Biochem.*, 329(2) :199–206.
- [Zarepour et al., 2013] Zarepour, M., Bhullar, K., Montero, M., Ma, C., Huang, T., Velcich, A., Xia, L., and Vallance, B. A. (2013). The Mucin Muc2 Limits Pathogen Burdens and Epithelial Barrier Dysfunction during *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Colitis. *Infection and Immunity*, 81(10) :3672–3683.
- [Zhang et al., 2018] Zhang, H., Bahamondez-Canas, T. F., Zhang, Y., Leal, J., and Smyth, H. D. (2018). PEGylated Chitosan for Nonviral Aerosol and Mucosal Delivery of the CRISPR/Cas9 System in Vitro. *Mol. Pharm.*, 15(11) :4814–4826.
- [Zhou et al., 1995] Zhou, F., Kraehenbuhl, J. P., and Neutra, M. R. (1995). Mucosal IgA response to rectally administered antigen formulated in IgA-coated liposomes. *Vaccine*, 13(7) :637–644.
- [Zhu et al., 2011] Zhu, L., Lee, P., Yu, D., Tao, S., and Chen, Y. (2011). Cloning and characterization of human MUC19 gene. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 45(2) :348–358.
- [Zhu et al., 2015] Zhu, Y., Abdullah, L. H., Doyle, S. P., Nguyen, K., Ribeiro, C. M. P., Vasquez, P. A., Forest, M. G., Lethem, M. I., Dickey, B. F., and Davis, C. W. (2015).

Baseline Goblet Cell Mucin Secretion in the Airways Exceeds Stimulated Secretion over Extended Time Periods, and Is Sensitive to Shear Stress and Intracellular Mucin Stores.

PLoS One, 10(5) :e0127267.