



## RÉFÉRENCES

- Van den Pol AN. Viral infection leading to brain dysfunction: more prevalent than appreciated? *Neuron* 2009 ; 64 : 17-20.
- Honkavuori KS, Shivaprasad HL, Williams BL, et al. Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis* 2008 ; 14 : 1883-6.
- Hoffmann B, Tappe D, Höper D, et al. A variegated squirrel bornavirus associated with fatal human encephalitis. *N Engl J Med* 2015 ; 373 : 154-62.
- Hornig M, Briese T, Licinio J, et al. Absence of evidence for bornavirus infection in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 2012 ; 17 : 486-93.
- Planz O, Pleschka S, Wolff T. Borna disease virus: a unique pathogen and its interaction with intracellular signalling pathways. *Cell Microbiol* 2009 ; 11 : 872-9.
- Inta D, Lima-Djedda JM, Gass P, Fusar-Poli P. Postnatal neurogenesis and dopamine alterations in early psychosis. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2012 ; 7 : 236-42.
- Kelsom C, Lu W. Development and specification of GABAergic cortical interneurons. *Cell Biosci* 2013 ; 3 : 19.
- Das S, Basu A. Viral infection and neural stem/progenitor cell's fate: implications in brain development and neurological disorders. *Neurochem Int* 2011 ; 59 : 357-66.
- Brnic D, Stevanovic V, Cochet M, et al. Borna disease virus infects human neural progenitor cells and impairs neurogenesis. *J Virol* 2012 ; 86 : 2512-22.
- Salveti A, Baize S. Zoonoses virales et émergence : la recherche ne fait que commencer. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 1055-6.
- Renaud J, Thérien HM, Plouffe M, Martinoli MG. La neuro-inflammation : Dr Jekyll ou Mr Hyde ? *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 979-88.
- Traiffort E, Ferent J. Cellules souches neurales et signalisation Notch. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 1115-25.

## NOUVELLE

### Modification à façon des propriétés physiques du mucus

#### Preuve de concept et applications potentielles

Jean-Luc Desseyn, Valérie Gouyer, Frédéric Gottrand

Centre de recherche sur les maladies inflammatoires ;  
UMR 995 Inserm ; Université de Lille ; CHU de Lille,  
Place de Verdun, 59045 Lille, France.  
[jean-luc.desseyn@inserm.fr](mailto:jean-luc.desseyn@inserm.fr)

➤ Dans le monde, des millions de personnes souffrent d'infections microbiennes avec, pour conséquences, des morbidité et mortalité élevées, particulièrement chez les sujets à risque et les personnes les plus vulnérables comme les enfants et les personnes âgées. Les cellules épithéliales représentent la voie d'entrée principale pour de nombreux agents pathogènes. La plupart du temps ceux-ci doivent cependant, lorsqu'ils sont présents dans la lumière d'un organe, d'abord traverser un gel de mucus qui masque la surface des cellules épithéliales. Ceci est particulièrement vrai dans le vagin et dans les tractus respiratoire et digestif.

#### Composition et organisation du mucus

Le mucus est une sécrétion épaisse, collante, gluante et dynamique, qui est essentielle pour de nombreuses fonctions biologiques. Les fonctions les plus communes attribuées au mucus incluent la lubrification des tissus et l'hydratation et la protection des épithéliums sous-jacents. Le mucus est constitué d'eau (environ 95 % de sa composition) et de

nombreux composants dont des sels, des lipides et des protéines. Les propriétés physico-chimiques et visco-élastiques du mucus sont en grande partie régies par les O-glycoprotéines<sup>1</sup> qu'il contient, encore appelées mucines gélifiantes. Les caractéristiques principales de ces mucines résultent de deux composantes : (1) leur grande région très fortement O-glycosylée ; la partie sucrée de ces protéines, qui représente typiquement jusqu'à 80 % de leur masse sèche, retient l'eau ; et (2) la présence de liaisons covalentes établies entre les monomères de mucine afin de former des multimères. La forte composante aqueuse du mucus rend difficile son étude par les techniques d'imagerie reposant sur l'utilisation d'anticorps ou de lectines. En effet, ces technologies nécessitent des préparations qui dessèchent plus ou moins le mucus, et donc le modifient. Des artefacts, qui représentent autant de biais dans les interprétations des

<sup>1</sup> Les O-glycoprotéines sont des protéines qui sont glycosylées au niveau des groupements OH présentés par les acides aminés hydroxylés, la sérine et la thréonine.

images obtenues, sont ainsi introduits. Les travaux des dix dernières années permettent de mieux appréhender l'organisation du mucus, en particulier les mucus pulmonaire et intestinal. Dans l'intestin, ce mucus est constitué de deux couches. Une couche adhérente (encore appelée couche interne), collée à l'épithélium et qui, par définition, est très difficile à éliminer. Cette première couche est recouverte d'une couche non-adhérente (couche externe) qui est plus difficile à conserver pour l'observation par les techniques classiques d'histologie. Ces deux couches sont composées de plusieurs feuillettes très organisés [1].

#### Mucus et bactéries pathogènes

La muqueuse de la barrière intestinale est un écosystème unique et complexe. Il héberge des milliards de bactéries commensales, majoritairement au niveau du côlon. Cette barrière semi-perméable protège l'épithélium sous-jacent contre les bactéries pathogènes. Il existe un gradient de la population bactérienne décroissant entre la lumière intestinale et la limite entre le mucus non-adhérent

et le mucus adhérent, ce dernier étant considéré comme stérile [2]. Il est donc extrêmement rare de pouvoir visualiser sur des coupes histologiques, en situation non-pathologique, des bactéries dans le mucus adhérent, et encore moins des bactéries en contact direct avec l'épithélium colique où les couches de mucus sont très épaisses (Figure 1). Cependant, en situation anormale (comme dans le cas de diarrhée, inflammation intestinale, etc.), la protection de l'épithélium est amoindrie. L'accès des tissus de l'hôte aux bactéries pathogènes de la lumière intestinale est alors favorisé.

Les modifications des propriétés du mucus peuvent considérablement affecter ses fonctions. Par exemple, dans l'intestin, une couche trop mince de mucus, comme c'est le cas dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique [3]), facilite l'accès des bactéries présentes dans la lumière intestinale aux cellules épithéliales, ceci étant à l'origine des processus inflammatoires tissulaires observés dans ces pathologies [4]. Inversement, dans le poumon, un mucus trop épais rend difficile son expulsion des voies bronchiques. Ce phénomène est à l'origine des obstructions bronchiques souvent retrouvées chez les patients atteints de la mucoviscidose. Aujourd'hui, les stratégies développées afin de moduler *in vivo* les propriétés visco-élastiques du mucus sont quasi inexistantes, en grande partie en raison de la complexité des macromolécules de mucine.

### Molécules de mucines et domaines CYS

Les régions amino- et carboxy-terminales des mucines gélifiantes sont riches en résidus de cystéine. C'est par ces régions que les mucines se multimérisent, par l'intermédiaire de liaisons covalentes, afin de former de longs polymères [5] ou des structures plus complexes [6]. De nombreux travaux ont montré que d'autres interactions entre les macromolécules de mucine

coexistent avec ces liaisons covalentes : des forces ioniques, des forces de van der Waals<sup>2</sup> et des liaisons hydrogènes et hydrophobes. Ces liaisons sont réversibles. Elles sont donc difficiles à étudier, particulièrement *in vivo*, mais elles sont certainement fondamentales dans les mécanismes de gélification des gels de mucus.

Il existe très peu de travaux expérimentaux s'intéressant *in vivo* à la barrière de mucus ainsi qu'aux possibilités de modifier ses propriétés. Un faisceau d'arguments suggère qu'un domaine non-O-glycosylé des mucines gélifiantes, situé juste en amont, ou entrecoupant, la grande région fortement O-glycosylée caractéristique des mucines, participe à la formation du réseau de mucines gélifiantes [7, 8]. Ce domaine, appelé « domaine CYS » car enrichi en résidus de cystéine, long d'environ 110 acides aminés, a la particularité d'être très hydrophobe. Ce domaine a été retrouvé en deux copies dans la mucine MUC2, qui est la mucine gélifiante intestinale majeure chez l'homme et la souris. Il est également présent respectivement en sept et neuf exemplaires dans les deux mucines gélifiantes MUC5B et MUC5AC, principalement retrouvées dans le système respiratoire. En comparaison aux autres domaines peptidiques des mucines gélifiantes, le domaine CYS est très conservé dans l'évolution. Cette conservation impliquant une forte pression de sélection sur de nombreux acides aminés, cela souligne la probable fonction clé de ce domaine dans les propriétés du mucus [9]. La fonction du domaine CYS dans la multiplication des liaisons réversibles entre mucines gélifiantes, et donc dans les propriétés du mucus, n'a jamais été étudiée *in vivo*, et très peu de données existent *in vitro*. Une souris transgénique, qui sécrète, dans son mucus intestinal, une molécule recombinante constituée de douze copies identiques et consécu-

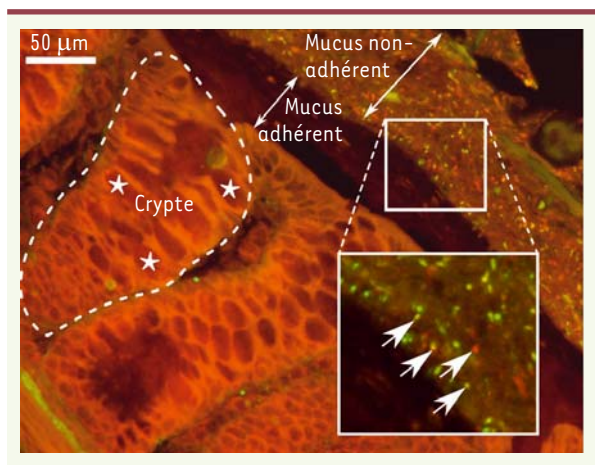
tives d'un domaine CYS emprunté à la mucine gélifiante humaine MUC5B, a été créée [8]. Comme attendu, chez cette souris, la couche de mucus intestinal est modifiée. Elle est plus robuste et moins perméable, comme l'indique des expériences réalisées avec des particules inertes fluorescentes. Les souris transgéniques sont également mieux protégées contre une colite chimiquement induite que les souris contrôles non transgéniques. Par ailleurs, après gavage, les souris transgéniques éliminent plus rapidement que les souris non transgéniques la bactérie *Citrobacter rodentium*, une bactérie pathogène spécifique du rongeur. Les souris transgéniques sont également mieux protégées contre la translocation bactérienne<sup>3</sup>, faisant suite à une infection bactérienne expérimentale par voie orale, que les souris frères/sœurs qui ont été élevées dans les mêmes cages.

### Potentiels thérapeutiques

La compromission de la barrière intestinale a de nombreuses conséquences en favorisant la translocation bactérienne. La translocation bactérienne accrue facilite la survenue de maladies comme certaines affections hépatiques chroniques, les infections intestinales, les maladies inflammatoires intestinales, les obstructions intestinales, la mucite induite par les traitements chimiothérapeutiques ou encore la pancréatite aiguë. Cette augmentation de translocation des bactéries intestinales est également retrouvée lors d'un état hypoxique des cellules épithéliales, comme c'est le cas à la suite d'un polytraumatisme, d'une blessure, d'une chirurgie ou de l'utilisation d'antibiotiques. Le modèle transgénique prouve qu'il est possible de renforcer la barrière intestinale grâce à l'administration d'un domaine spécifique, issu des mucines gélifiantes. Ceci ouvre de nouvelles stratégies pour traiter, limiter ou prévenir la translocation

<sup>2</sup> Interactions électromagnétiques de faible intensité entre molécules.

<sup>3</sup> Passage de bactéries viables d'origine digestive à travers la barrière de la muqueuse intestinale.



**Figure 1. Coupe de côlon de souris.** La mucine gélifiante intestinale est sécrétée par les cellules en calice (\*) présentes en grande quantité dans les cryptes pour former, à la surface de l'épithélium colique au contact de l'eau, deux gels de mucus : un mucus adhérent surmonté d'un mucus non adhérent qui abrite les bactéries. Les bactéries sont visualisées par des sondes FISH<sup>5</sup>. La sonde rouge reconnaît « toutes » les bactéries et la sonde verte (jaune = rouge + verte), les lactobacilles, particulièrement nombreux chez la souris (flèches). Il n'y a pas de bactérie visible en contact avec le tissu intestinal.

bactérienne, particulièrement au niveau de l'intestin qui héberge la plus grande communauté microbienne du corps humain.

L'étude récente que nous avons réalisée a également montré que la sécrétion d'une molécule constituée de domaines CYS, dans le mucus intestinal, affecte la O-glycosylation des mucines [8]. Cette modification pourrait être liée à la charge en lactobacilles qui est nettement plus importante dans l'intestin des souris transgéniques que dans celui de leurs frères/sœurs élevés dans les mêmes cages. Ces bactéries sont reconnues comme faisant partie intégrante de la barrière intestinale. Elles produisent des molécules anti-bactériennes et stimulent la production de molécules antimicrobiennes par l'hôte. Elles entrent également en compétition avec les bactéries pathogènes pour adhérer aux chaînes sucrées du mucus. Les lactobacilles retrouvés en plus grande quantité chez les souris transgéniques sont donc vraisemblablement importants dans le renforcement de la barrière intestinale. Les applications de molécules recombinantes constituées de domaines CYS sont importantes et variées. Il est ainsi possible d'envisager que la délivrance, dans le mucus vaginal, de telles molécules puisse augmenter la quantité de lactobacilles. Cela préviendrait ou limiterait les infections des appareils urinaire et reproducteur comme la vaginose bactérienne, la vaginite (qui est souvent

responsable de cette maladie génétique. Cette difficulté a contribué à stimuler la recherche vers de nouveaux vecteurs de délivrance plus efficaces pour la correction de gènes comme les virus et les nanoparticules. Dans la mucoviscidose, la concentration accrue en mucines gélifiantes pulmonaires pourrait favoriser l'augmentation du nombre de liaisons réversibles entre les mucines. Or, les modifications du pH et l'augmentation du taux d'acide hypochloreux et de glutathion dans sa forme réduite pourraient, en parallèle, contribuer à l'établissement de liaisons irréversibles entre les mucines gélifiantes dans le mucus pulmonaire, contribuant ainsi à l'augmentation de sa viscosité [12]. Il est donc tout à fait possible que de telles liaisons irréversibles puissent exister entre les domaines CYS des mucines gélifiantes dans le mucus pulmonaire des patients atteints de la mucoviscidose. Ces liaisons seraient d'autant plus nombreuses que les deux mucines gélifiantes respiratoires principales, MUC5B et MUC5AC, sont riches en domaines CYS. Les modifications physico-chimiques et l'augmentation, dangereuse, de la viscosité du mucus expliquent sa stagnation, qui favorise la colonisation par des agents microbiens opportunistes ainsi que l'obstruction des voies aériennes menant à la destruction progressive du tissu pulmonaire. Une meilleure compréhension des interactions entre les domaines CYS et entre

d'étiologie infectieuse) ou, plus généralement, les infections urinaires et les maladies sexuellement transmissibles [10]. Une autre application potentielle de la molécule transgénique concerne la contraception puisque cette molécule recombinante serait capable de modifier les propriétés du mucus cervical. La délivrance de domaines CYS devrait ainsi favoriser les interactions réversibles entre les macromolécules de mucines gélifiantes de l'endocervix<sup>4</sup> et donc modifier la perméabilité/pénétrabilité du mucus aux spermatozoïdes [11]. D'autres applications d'enrichissement d'un mucus avec des molécules constituées de domaines CYS peuvent être envisagées. Néanmoins, une trop grande concentration en domaines CYS dans un gel de mucus pourrait se révéler délétère, justement parce qu'il rend plus difficile l'accès aux cellules épithéliales par leur côté apical. Ceci a pour conséquence directe de limiter l'efficacité de drogues apportées à l'organisme par voie orale ou par aérosol, comme c'est le cas, par exemple, dans la mucoviscidose où le mucus respiratoire est déshydraté et plus visqueux. Ceci a d'ailleurs tempéré les premiers espoirs de thérapie génique puisque le mucus, trop visqueux chez les malades atteints de la mucoviscidose, limitait l'accès des vecteurs de délivrance à l'épithélium pulmonaire, pour corriger le gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel*) défectueux et

<sup>4</sup> Muqueuse du col de l'utérus.

<sup>5</sup> FISH (*fluorescence in situ hybridization*) : méthode d'hybridation fluorescente *in situ* qui repose sur la complémentarité de séquence entre de l'ADN ou de l'ARN endogène et une sonde nucléique marquée par fluorochrome. L'hybridation spécifique est visualisée par microscopie.

les acides aminés impliqués dans ces interactions aiderait considérablement à trouver de nouvelles stratégies capables de fluidifier un mucus anormal comme celui que l'on retrouve dans la mucoviscidose et dans d'autres affections pulmonaires obstructives chroniques. Cependant, ces études dépendent principalement de la disponibilité de molécules recombinantes, constituées d'une ou plusieurs copies du domaine CYS, et produites par des méthodes de culture cellulaire, ce qui semble encore aujourd'hui particulièrement difficile à obtenir [13]. ♦

**Custom modification *in vivo* of mucus properties: proof of concept and potential applications**

#### LIENS D'INTÉRÊT

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

#### RÉFÉRENCES

- Gouyer V, Gottrand F, Desseyn JL. The extraordinarily complex but highly structured organization of intestinal mucus-gel unveiled in multicolor images. *PLoS One* 2011; 6 : e18761.
- Johansson ME, Hansson GC. Microbiology. Keeping bacteria at a distance. *Science* 2011; 334 : 182-3.
- Zouiten-Mekki L, Serghini M, Fekih M, et al. Rôle de la cellule épithéliale dans l'homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Med Sci (Paris)* 2013; 29 : 1145-50.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, et al. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* 2007; 56 : 343-50.
- Ridley C, Kouvatsos N, Raynal BD, et al. Assembly of the respiratory mucin MUC5B: a new model for a gel-forming mucin. *J Biol Chem* 2014; 289 : 16409-20.
- Johansson ME, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10 : 352-61.
- Bansil R and Turner BS. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr Opin Colloid Interface* 2006; 11 : 164-70.
- Gouyer V, Dubuquoy L, Robbe-Masselot C, et al. Delivery of a mucin domain enriched in cysteine residues strengthens the intestinal mucous barrier. *Sci Rep* 2015; 5 : 9577.
- Desseyn JL. Mucin CYS domains are ancient and highly conserved modules that evolved in concert. *Mol Phylogenet Evol* 2009; 52 : 284-92.
- Borges S, Silva J, Teixeira P. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch Gynecol Obstet* 2014; 289 : 479-89.
- Brunelli R, Papi M, Arcovito G, et al. Globular structure of human ovulatory cervical mucus. *FASEB J* 2007; 21 : 3872-6.
- Perez-Vilar J and Boucher RC. Reevaluating gel-forming mucins' roles in cystic fibrosis lung disease. *Free Radic Biol Med* 2004; 37 : 1564-77.
- Bäckström M, Ambort D, Thomsson E, et al. Increased understanding of the biochemistry and biosynthesis of MUC2 and other gel-forming mucins through the recombinant expression of their protein domains. *Mol Biotechnol* 2013; 54 : 250-6.

## NOUVELLE

### Effacité et sécurité du traitement par thérapie génique des patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich

Anne Galy<sup>1,2</sup>, Guillaume Corre<sup>1,2</sup>, Marina Cavazzana<sup>3-5</sup>, Salima Hacein-Bey-Abina<sup>3,4,6,7</sup>

> Le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) est un déficit immunitaire primaire rare faisant l'objet de plusieurs essais de thérapie génique dans différents pays. L'essai de thérapie génique publié récemment et réalisé à Paris et à Londres, présente la particularité d'avoir montré une efficacité thérapeutique sur une population de patients pédiatriques relativement âgés et sévèrement atteints [1]. L'approche par transfert de gène à l'aide d'un vecteur lentiviral dans les cellules souches hématopoïétiques autologues s'est révélée robuste et dénuée d'effets secondaires liés au vecteur « self-inactivé » (ou

*self inactivating* [SIN] ; les promoteurs viraux sont modifiés pour éviter le risque lié à la dérégulation de gènes adjacents) qui a été utilisé. Alors que les études se poursuivent sur un plus grand nombre de patients et dans d'autres centres, la thérapie génique pourrait désormais être considérée comme un futur traitement alternatif à la greffe allogénique de cellules souches chez les patients WAS ne pouvant pas bénéficier d'un donneur HLA-compatible. La maladie WAS est bien caractérisée. Ce déficit immunitaire primaire lié à l'X est causé par l'absence de la protéine WASp (*Wiskott Aldrich syndrome protein*) dans

<sup>1</sup>Généthon, unité mixte de recherche Integrare UMR S951, 1bis, rue de l'Internationale, F-91000 Évry, France ; <sup>2</sup>Inserm UMR S951 ; université d'Évry Val d'Essonne ; EPHE ; Généthon, 1bis, rue de l'Internationale, F-91000 Évry, France ; <sup>3</sup>Département de biothérapies, hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France ; <sup>4</sup>CIC biothérapies, groupe hospitalier universitaire Ouest, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Inserm, Paris, France ; <sup>5</sup>Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité Université, Institut Imagine, Paris, France ; <sup>6</sup>UTCBS CNRS 8258-Inserm U1022, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, université Paris Descartes, Paris, France ; <sup>7</sup>Service d'Immunologie Biologique, Groupe Hospitalier Universitaire Paris-Sud, Le-Kremlin-Bicêtre, France. [galy@genethon.fr](mailto:galy@genethon.fr) [salima.hacein-bey@aphp.fr](mailto:salima.hacein-bey@aphp.fr)

les cellules sanguines. Dans sa forme classique, les patients souffrent d'infections bactériennes et virales récurrentes, d'eczéma sévère, de saignements allant jusqu'aux hémorragies et certains développent des manifestations