



**HAL**  
open science

# ETUDE DES MECANISMES DE REGULATION DE LA SECRETION ET DE L'EXPRESSION DES MUCINES GASTROINTESTINALES PAR LA LEPTINE

Mahmoud El Homsy

► **To cite this version:**

Mahmoud El Homsy. ETUDE DES MECANISMES DE REGULATION DE LA SECRETION ET DE L'EXPRESSION DES MUCINES GASTROINTESTINALES PAR LA LEPTINE. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT : . tel-00181750

**HAL Id: tel-00181750**

**<https://theses.hal.science/tel-00181750>**

Submitted on 24 Oct 2007

**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.

THESE  
présentée  
devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1  
pour l'obtention  
du DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le Jeudi, 11 Octobre 2007

par

Mahmoud EL HOMSI

ETUDE DES MECANISMES DE REGULATION DE LA SECRETION ET DE  
L'EXPRESSION DES MUCINES GASTROINTESTINALES PAR LA LEPTINE

Directeur de thèse : Dr. Pascale PLAISANCIE

JURY : M. Jean Yves SCOAZEC	Président
Mme. Thécla LESUFFLEUR	Rapporteur
M. Robert DUCROC	Rapporteur
Mme. Pascale PLAISANCIE	Examineur

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

## **Président de l'Université**

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

## **Secrétaire Général**

**M. le Professeur L. COLLET**

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur J. LIETO

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

## ***SECTEUR SANTE***

### ***Composantes***

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

## ***SECTEUR SCIENCES***

### ***Composantes***

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

Directeur : M. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS



**Merci à mes parents et ma famille pour leur soutien tout au long de mes études. Je dédie ce travail à eux, pour leur amour, soutien et encouragements.**

## REMERCIEMENTS

Je souhaite dans un premier temps remercier ma directrice de thèse, le Docteur Pascale Plaisancié. Qu'elle reçoive ici l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, mais surtout pour son soutien, sa gentillesse, la qualité de ses conseils et de son encadrement scientifique.

Mes plus sincères remerciements vont également au Messieurs Youssef Jamil et Mustapha Kheir qui, par leurs conseils, leur soutien et leur aide précieuse, m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je tiens également à remercier le doyen de l'université libanaise, le Professeur Ali Mneimneh, pour l'attention et le soutien qu'il a porté à mon travail, ainsi que pour ses conseils judicieux et ses encouragements.

Je remercie le Professeur Jean Yves Scoazec pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse ainsi que le Docteur Thécla Lesuffleur et le Docteur Robert Ducroc pour leur participation à ce jury. Qu'ils reçoivent ici toute ma gratitude.

Je remercie également les Professeurs Jean Alain Chayvialle et Jean Yves Scoazec pour m'avoir accueilli au sein de leur unité. Je les prie de bien vouloir agréer mon grand respect.

Je souhaite remercier les Docteurs André Bado et Jean Claustre, Monsieur Gérard Jourdan, ainsi que les membres de l'unité INSERM U865 (ex U45) « Etudes des tumeurs endocrines digestives » pour l'aide qu'ils m'ont apporté et pour leur gentillesse.

Je remercie de tout mon coeur mon amour, Loyal, pour son soutien, sa présence chaleureuse, sa gentillesse et son support moral.

Enfin, merci à tous ceux qui m'ont permis de considérer ces 4 dernières années comme 4 merveilleuses années.

# Sommaire

# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>12</b>
<b>Etude Bibliographique .....</b>	<b>15</b>
<b>I - L'intestin.....</b>	<b>16</b>
1. Anatomie.....	16
1.1. L'intestin grêle .....	16
1.2. Le gros intestin.....	19
2. Structure générale de l'intestin : .....	19
3. L'épithélium intestinal.....	20
3.1. Les cellules souches .....	22
3.2. Les entérocytes.....	22
3.3. Les cellules de Paneth.....	24
3.4. Les cellules M (Microfold cells).....	24
3.5. Les cellules endocrines .....	25
3.6. Les cellules caliciformes.....	27
<b>II - Mucus et mucines gastro-intestinales.....</b>	<b>29</b>
1. Caractéristiques générales du mucus intestinal .....	29
2. Caractéristiques générales des mucines.....	30
2.1. Les chaînes glycosidiques.....	30
2.1.1. Les chaînes O-glycosidiques .....	30
2.1.2. Les chaînes N-glycosidiques .....	31
2.2. L'apomucine .....	33
3. Les mucines sécrétées : .....	34
3.1. MUC2.....	37
3.1.1. Le promoteur de MUC2 .....	37
3.1.2. L'apomucine de MUC2 .....	37
3.1.3. rMuc2.....	40
3.2. MUC5AC .....	41
3.2.1. Le promoteur de MUC5AC .....	41
3.2.2. L'apomucine de MUC5AC .....	42
3.2.3. rMUC5AC .....	43
4. Les mucines membranaires : .....	43
4.1. MUC1.....	45

4.1.1. L'apomucine de MUC1 .....	45
4.1.2. rMuc1 .....	46
4.2. MUC3 .....	48
4.2.1. Apomucine MUC3A – MUC3B.....	48
4.2.2. rMuc3.....	49
4.3. MUC4 .....	51
4.3.1. Apomucine MUC4 .....	51
4.3.2. rMuc4 ou SMC .....	52
5. Régulation de la sécrétion et de l'expression des mucines intestinales.....	55
5.1. Synthèse et dégradation des mucines .....	55
5.1.1. Synthèse .....	55
5.1.2. Dégradation.....	56
5.2. La sécrétion du mucus intestinal.....	57
5.2.1. Sécrétion basale.....	57
5.2.2. Sécrétion régulée .....	57
5.2.2.1. Accélération de la sécrétion basale.....	59
5.2.2.2. L'exocytose composée .....	59
5.3. Facteurs stimulant la sécrétion et l'expression des mucines gastro-intestinales.....	59
5.3.1. Stimulation basolatérale : .....	59
5.3.1.1. Les médiateurs du système immunitaire .....	60
5.3.1.2. Les hormones intestinales.....	61
5.3.1.3. Les neurotransmetteurs et neuropeptides .....	63
5.3.2. Stimulation apicale : .....	63
5.3.2.1. Les fibres alimentaires.....	64
5.3.2.2. Acides gras à chaîne courte : .....	65
5.3.2.3. Hydrolysats protéiques : .....	66
5.3.2.4. Peptides bioactifs du lait : les $\beta$ -casomorphines.....	67
6. Fonctions biologiques du mucus .....	69
6.1. Lubrification de la muqueuse .....	69
6.2. Barrière de diffusion des nutriments.....	69
6.3. Barrière physico-chimique.....	70
6.4. Mucus et flore endogène.....	70
6.5. Inhibiteur de l'adhésion des pathogènes.....	71
6.6. Libération de molécules actives et réparation de l'épithélium .....	72
7. Mucines et pathologies gastro-intestinales.....	73
7.1. Gastro-entérites aiguës.....	73



7.2. Les maladies inflammatoires de l'intestin .....	73
7.2.1. La colite ulcéreuse .....	74
7.2.2. La maladie de Crohn 'MC' .....	75
7.3. Mucines et cancer colorectal .....	76
7.3.1. Cas de la mucine sécrétée MUC2 .....	77
7.3.2. Cas de la mucine sécrétée MUC5AC.....	78
7.3.2.1. Expression de <i>novo</i> de MUC5AC .....	79
<b>III - La Leptine .....</b>	<b>80</b>
1. Sites de production .....	82
2. Récepteurs de la leptine.....	82
2.1. Différentes isoformes .....	83
2.2. Voies de signalisation intracellulaire .....	85
2.3. Localisation des récepteurs de la leptine dans le tractus gastrointestinal.....	86
3. Rôle de la leptine .....	88
3.1. Leptine et prise alimentaire .....	88
3.2. Régulation des réponses immunitaire .....	88
3.2.1. Rôle dans la prolifération et l'activation lymphocytaire T .....	89
3.2.2. Rôle dans la production d'hormone de croissance par les lymphocytes ..	90
3.3. Rôle de la leptine au cours de certaines maladies inflammatoires intestinales.	90
3.4. Au niveau de l'estomac .....	92
3.5. Au niveau de l'intestin .....	92
3.5.1. Facteur d'absorption.....	92
3.5.2. Facteur de sécrétion d'hormones intestinales .....	93
<b>Etudes expérimentales .....</b>	<b>95</b>
<b>1. La leptine stimule la sécrétion des mucines par les cellules en gobelet du côlon.....</b>	<b>96</b>
<b>2. La leptine module l'expression des mucines gastrointestinales dans les cellules épithéliales coliques <i>via</i> les voies de signalisation de PKC, PI3K et MAPK.....</b>	<b>106</b>
<b>Discussion générale, conclusion et perspectives .....</b>	<b>117</b>
<b>Références .....</b>	<b>125</b>

## Liste des figures et des tableaux

Figure 1: Anatomie et vascularisation des intestins.....	17
Figure 2: Structure de l'intestin grêle.....	18
Figure 3: La paroi intestinale.....	21
Figure 4: Cellules souches de l'intestin.....	23
Figure 5: Structure de la thèque des cellules caliciformes.....	28
Figure 6 : Structure des chaînes glycosidiques des mucines.....	32
Figure 7: Répartition des mucines dans le corps humain.....	35
Figure 8: les mucines de la région chromosomique 11p15.....	36
Figure 9: Le promoteur de MUC2.....	38
Figure 10: Structure peptidique de MUC2 et MUC5AC.....	39
Figure 11: Structure peptidique de MUC1.....	47
Figure 12: Structure peptidique de MUC3.....	50
Figure 13: Structure peptidique de MUC 4.....	53
Figure 14: Les deux sous unités ASPG1 et ASPG2 de rMUC4.....	53
Figure 15: Les trois types de sécrétion de mucus par la cellule caliciforme.....	58
Figure 16: Le gène ob.....	81
Figure 17: La leptine.....	81
Figure 18: Différentes isoformes des récepteurs de la leptine.....	84
Figure 19: Voies de signalisation intracellulaire.....	84
Figure 20: Le récepteur Ob-Rb.....	87
Figure 21: Action possible de la leptine sur l'expression de mucines et la sécrétion de mucus <i>via</i> les récepteurs Ob-R des cellules caliciformes.....	120
Tableau 1 : Classification et distribution des cellules endocrines chez l'homme.....	26
Tableau 2 : Altération pathologiques des mucines coliques chez les patients atteints de la colite ulcéreuse et de la maladie de Crohn.....	74

## Liste des abréviations

aa: acides aminés  
ADN: acide désoxyribonucléique  
AP-2: antibody panel 2  
ARN m: acide ribonucléique messenger  
ASPG: ascite sialoglycoprotéine  
CCK: cholécystokinine  
CDX1: caudal type homeobox transcription factor 1  
CK: cystine-knot  
CREB: cAMP-responsive element binding protein  
EGF: epidermal growth factor  
EMA: epithelial membrane antigen  
ErbB2: erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2  
ERK: extracellular Regulated Kinase  
GalNAc: *N*-acetylgalactosamine  
G-CSF: granulocyte colony stimulating factor  
GIP: gastric inhibitory peptide  
GlcNAc: *N*-acétylglucosamine  
GLP-1: glucagon like peptide 1  
Grb: growth factor receptor bound protein  
GRE: glucocorticoid responsive element  
HER: human epidermal growth factor receptors  
HMFG: human milk fat globule  
HNF1: hepatic nuclear factor 1  
HRAS: harvey rat sarcoma viral oncogene homolog  
HT: hydroxytryptamine  
IFN-gamma: interferon gamma  
IGF: intestinal growth factor  
IL1- $\beta$ : interleukine 1 beta  
IRS1: insuline receptor substrate 1  
JAK: janus kinases

JNK: NH<sub>2</sub>-terminal c-jun kinase  
LIF: leukemia inhibitory factor  
MAPK: mitogen-activated protein kinase  
MC: maladie de Crohn  
MCT-1: monocarboxylates de type 1  
MICI: maladies inflammatoires chroniques de l'intestin  
MLP: Mucin Like Protein  
MOD: Mucin Oligosaccharide Degrading bacteria  
MUC: mucine  
NFκB: nuclear factor κB  
NO: oxyde nitrique  
Ob: obésité  
PEM: polymorphic epithelial mucin  
Pept1: transporteur de peptides  
PG: prostaglandines  
PI3K: Phosphatidyl-inositol 3 kinase  
PKC: Protéine Kinase C  
PLC : phospholipase C  
PTS: Proline, Thréonine et Sérine  
PYY: peptide YY  
RCUH: Recto Colite Ulcéro Hémorragique  
rMuc: rat mucine  
SAPK: stress-activated protein kinase  
SEA: Sea urchin sperm protein Enterokinase and Agrin  
SERT: transporteur de la sérotonine  
SGLT-1: transporteur sodium-glucose 1  
SH2: Src homology-2  
SMC: complexe sialomucine  
SNP: single nucleotide polymorphism  
Sp1: Specificity factor 1  
Src: Steroid Receptor Co-activator  
STAT: signal transducers and activators of transcription  
TFF: Trefoil Factor  
TGFβ: tumor growth factor bêta

TNF-alpha: transforming nuclear factor alpha

TR: thyroid hormone

TTX: tétrodotoxine

UACL: Ulcer Associated Cell Lineage

VIP: Vasoactive Intestinal Peptide

VNTR: Variable Number Tandem Repeat

VWF: Facteur de Von Willebrand

# **Introduction**

## Introduction

L'épithélium gastrointestinal est revêtu d'une couche de mucus, cette barrière protectrice lui permettant de faire face à des conditions agressives de nature chimique, mécanique ou bactérienne. Les molécules structurales majeures de ce gel de mucus sont les mucines, molécules produites et secrétées par les cellules caliciformes. Dans l'intestin, l'érosion de la couche de mucus est due notamment à l'action d'enzymes et au frottement des matières en cours de digestion. Cette érosion doit être compensée par la synthèse et la sécrétion de mucines afin de garantir l'intégrité de la barrière et tout changement quantitatif ou qualitatif dans l'expression ou la libération de ces molécules peut avoir d'importantes implications physiologiques et/ou pathologiques et affecter notamment la capacité de l'intestin à se défendre. De fait, il a été montré récemment que l'inactivation du gène codant pour Muc2 chez la souris se traduit par l'apparition de tumeurs intestinales mais également de colites. Des modifications de l'expression des mucines sont également observées lors de tumeurs coliques ou de maladies inflammatoires intestinales [1,2].

Du fait de leur localisation au sein de la muqueuse intestinale, les cellules à mucus sont régulées au niveau de leur pôle apical par des facteurs luminaux (en particulier le chyme intestinal) et au niveau de leur pôle basolatéral par des facteurs nerveux, endocrines ou issus du système immunitaire [3,4].

La leptine, produit du gène Ob, est majoritairement synthétisée par le tissu adipeux mais également par l'estomac, où elle est produite par les cellules principales. Outre sa libération dans la circulation générale, elle est également sécrétée dans la lumière digestive. La leptine gastrique est résistante à l'action des enzymes protéolytiques digestives et peut atteindre l'intestin puis le côlon où elle joue un rôle physiologique dans le contrôle des fonctions gastro-intestinales. De fait, il a été montré la présence de récepteurs de la leptine le long du tractus digestif et notamment dans le côlon, ce dernier pouvant également produire et sécréter de la leptine lors d'inflammation [5].

Mon projet de thèse a eu pour but de déterminer le rôle de la leptine sur la sécrétion et sur l'expression des mucines dans le côlon et a été établi en trois parties :

1. La première partie de mon travail consistait à déterminer l'effet de la leptine, administrée par voie luminale ou artérielle, sur la sécrétion des mucines dans le côlon de rat. Cette étude a été réalisée *in vivo*.
2. Je me suis ensuite intéressé à l'effet de la leptine sur l'expression des mucines gastrointestinales. Cette étude a été abordée *in vitro* à l'aide de la lignée cellulaire mucosécrétante DHE qui est issue d'un adénocarcinome colique de rat, et la lignée mucosécrétante humaine HT29-MTX.
3. Finalement, la troisième partie de mon travail de thèse a eu pour but d'aborder les mécanismes d'action impliqués dans l'effet de la leptine sur la sécrétion et sur l'expression des mucines gastrointestinales. Ce travail a été réalisé à l'aide de la lignée HT29-MTX.



# **Etude Bibliographique**

# I - L'intestin

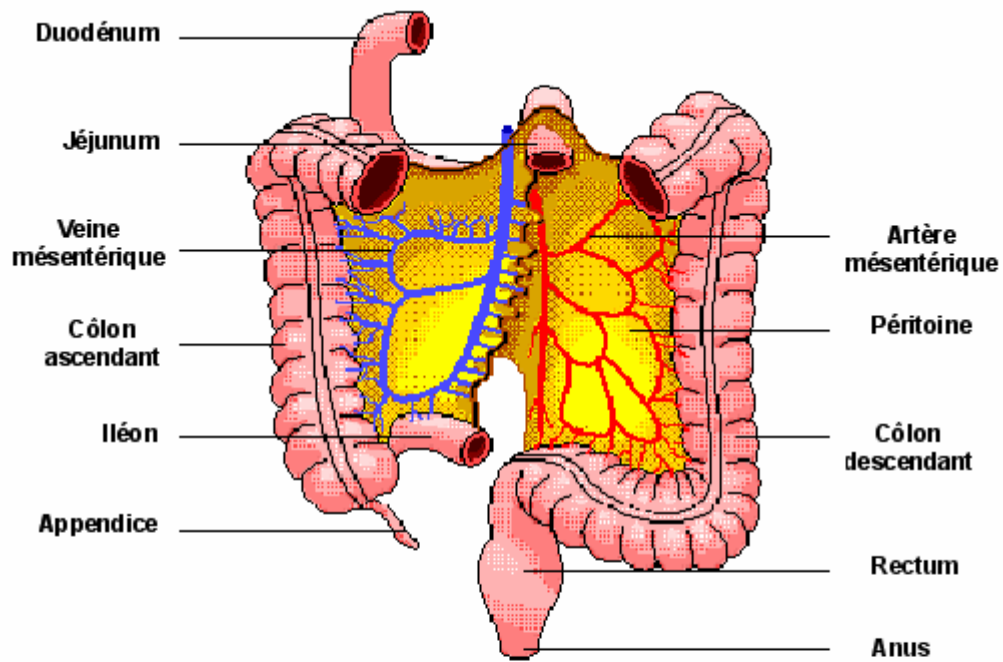
L'intestin (Figure 1) est la partie du système digestif qui s'étend de la sortie de l'estomac à l'anus. Chez l'homme et les mammifères, il est divisé en deux parties appelées l'intestin grêle et le gros intestin. C'est la partie du corps qui assure la digestion puis l'absorption dans le sang des nutriments provenant des aliments. Ces nutriments sont principalement de petits peptides, des acides aminés, des sucres, des acides gras, des vitamines et sels minéraux qui sont transportés par le sang et la lymphe, notamment au foie, où ils sont utilisés comme éléments de la synthèse des protéines essentielles, des glucides et des lipides, en réponse aux besoins énergétiques, mais également à la régulation des processus biologiques (vitamines).

## 1. Anatomie

### 1.1. L'intestin grêle

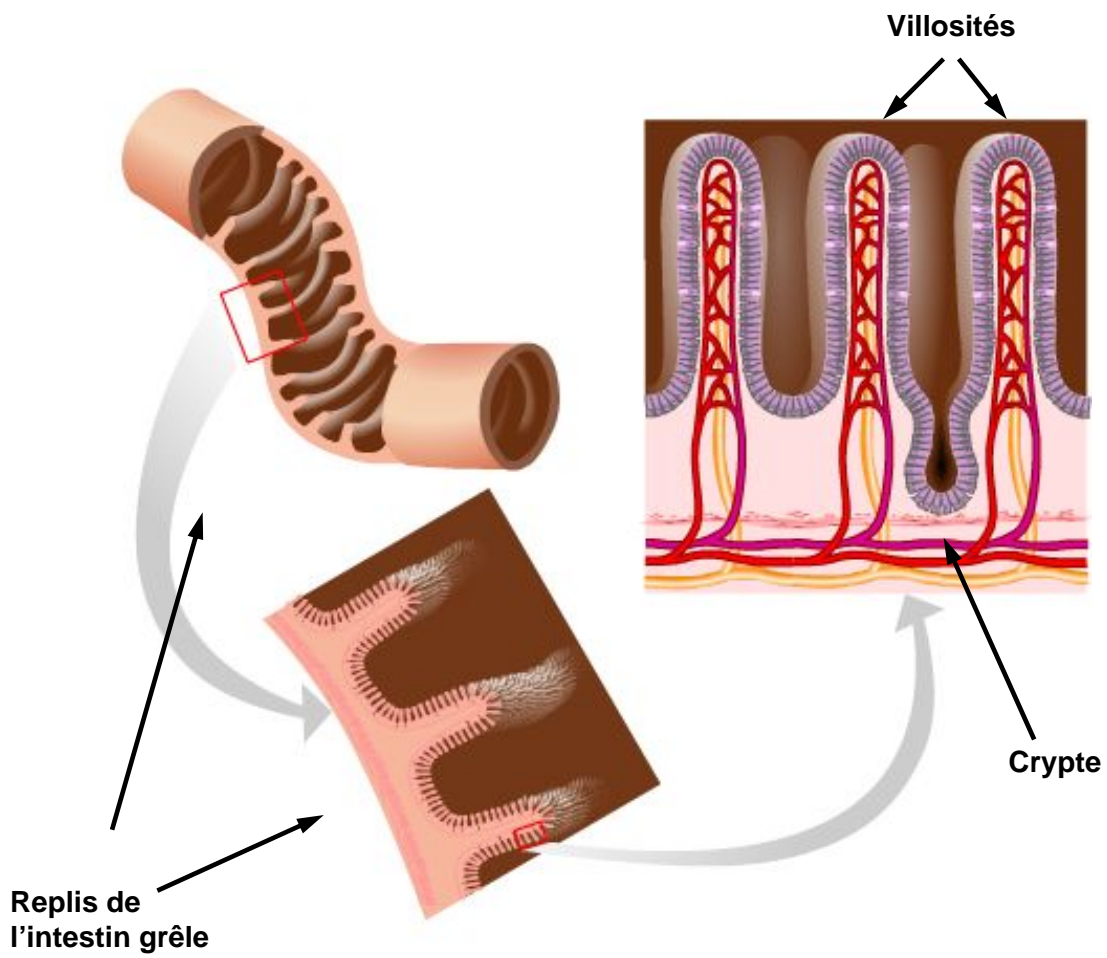
L'intestin grêle débute au pylore, limite distale de l'estomac, et se termine à la valvule iléo-caecale, limite proximale du gros intestin. Il se divise en trois parties qui sont : Le duodénum, le jéjunum et l'iléon.

En tant que principal organe de l'absorption, l'intestin grêle présente des modifications architecturales de sa muqueuse et de sa sous-muqueuse destinées à en accroître la surface. Muqueuse et sous-muqueuse forment un nombre considérable de replis. Ceux-ci sont plus marqués dans le jéjunum et disparaissent à la partie distale du grêle. La présence de villosités augmente également la surface de contact du tissu intestinal. Enfin, des glandes tubulaires ou cryptes s'étendent de la base de la villosité jusqu'à la musculaire muqueuse (Figure 2).



**Figure 1: Anatomie et vascularisation des intestins**

(d'après [www.innerbody.com](http://www.innerbody.com))



**Figure 2: Structure de l'intestin grêle**  
(d'après [www.uclan.ac.uk](http://www.uclan.ac.uk) )

## 1.2. Le gros intestin

Le gros intestin comprend : le caecum, le côlon et le rectum. La structure du gros intestin est assez uniforme, malgré certaines variations régionales, particulièrement entre le caecum et le rectum.

La fonction principale du gros intestin est de transformer les résidus liquides de l'intestin grêle en un matériau solide, non digestible, les fèces. Ceci se fait par une importante réabsorption hydroélectrolytique, jusqu'à ce que le contenu intestinal devienne semi-solide. Avec l'accroissement de la solidité, du mucus est nécessaire pour lubrifier le passage.

## 2. Structure générale de l'intestin :

La paroi du tube digestif varie avec chaque segment, suivant les besoins physiologiques des régions, mais présente des caractéristiques communes. Ainsi, elle peut toujours être décrite en 4 tuniques qui sont de la superficie (face à la "*lumière*") à la profondeur : la *muqueuse*, la *sous-muqueuse*, la *musculeuse* et la *séreuse* [6-9] (Figure 3).

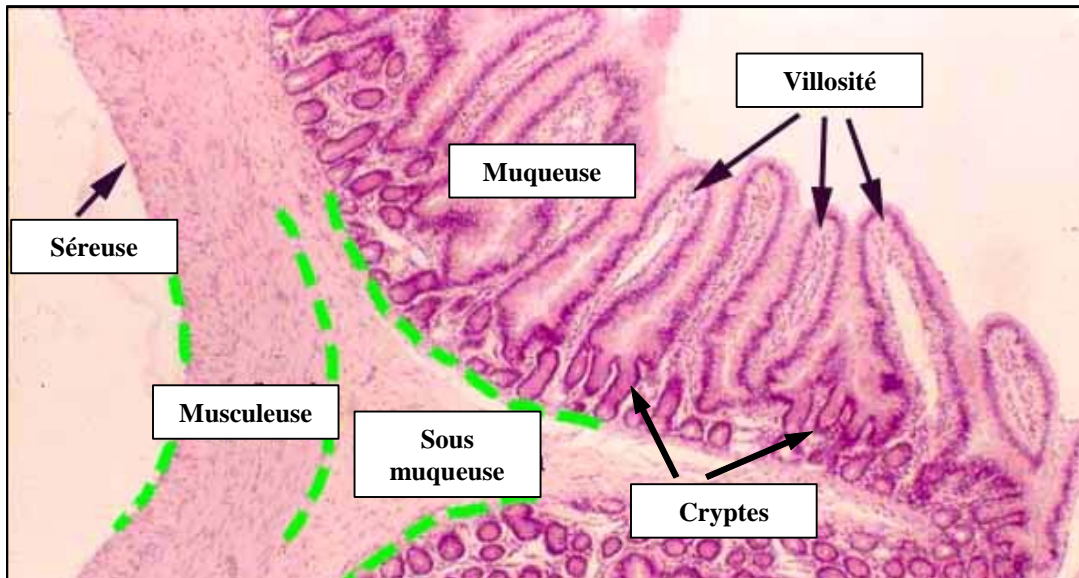
- La ***muqueuse*** est la couche la plus superficielle du tube digestif. Constituée de l'épithélium de revêtement, du chorion ou lamina propria et de la musculaire muqueuse, elle est la structure la plus variable du tractus gastro-intestinal.
  - L'épithélium de revêtement est constitué d'une monocouche cellulaire reposant sur la lamina propria et comporte généralement un mélange de différentes cellules épithéliales, tant absorbantes que sécrétrices comme les cellules entéro-endocrines ou les cellules caliciformes qui produisent le mucus pour lubrifier et protéger la surface.
  - La lamina propria, ou chorion, est un tissu de soutien renfermant les infiltrats lymphoïdes disséminés, mais également un riche réseau vasculaire et nerveux.
  - La musculaire muqueuse est une fine couche de muscles lisses longitudinaux générant les mouvements locaux et le repli de la muqueuse.

- La *sous-muqueuse* contient des fibres nerveuses et des vaisseaux pour le transport des nutriments. De nature conjonctivo-vasculaire, cette couche interne de fibres conjonctives très lâches joue le rôle de tissu de soutien de la muqueuse. Elle est traversée par de gros vaisseaux sanguins et lymphatiques. En outre, un dense réseau nerveux y est implanté : le plexus sous-muqueux. Celui-ci fonctionne de façon coordonnée avec le plexus myentérique.
- La *tunique musculaire ou musculieuse* est formée de 2 couches (circulaire interne et longitudinale externe) constituées de fibres musculaires lisses. Elles sont douées de propriété de contraction autonome, assurant le péristaltisme intestinal pour le mélange et la progression des aliments. Ce phénomène nécessite un contrôle et une coordination importants rendus possibles grâce au réseau nerveux inséré entre ces deux couches musculaires : le plexus myentérique.
- La *séreuse* est une fine membrane, feuillet viscéral du péritoine, il s'agit d'une couche externe du tissu conjonctif dont le rôle est de soutenir les gros vaisseaux sanguins ainsi que les nerfs.

### 3. L'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal possède une capacité de prolifération et de différenciation cellulaire importante. Son renouvellement s'effectue en 2-3 jours chez le rat et 4-5 jours chez l'homme, à partir de cellules souches, qui se trouvent au fond des cryptes [10]. Comme cité précédemment, cet épithélium peut être subdivisé en deux compartiments morphologiquement distincts, constituant l'unité fonctionnelle de base de l'intestin : les cryptes et les villosités. La prolifération cellulaire cryptique est suivie d'une migration et d'une différenciation des cellules le long de l'axe crypto-villositaire, pour se terminer par une desquamation à l'apex des villosités.

Les cryptes, invaginations de l'épithélium, contiennent les cellules souches, les cellules en prolifération et les cellules de Paneth. Les villosités, évaginations de l'épithélium, sont constituées de cellules différenciées. Cette organisation cellulaire reste similaire tout au long de l'intestin bien que l'épithélium colique présente des cryptes plus profondes et que les villosités de l'intestin grêle soient remplacées par des coiffes épithéliales [6, 7, 9].



**Figure 3: La paroi intestinale**

(d'après [www.siumed.edu](http://www.siumed.edu))

L'épithélium intestinal est constitué par un ensemble de cellules hautement différenciées, en renouvellement constant, spécialisées et polarisées:

### **3.1. Les cellules souches**

Ces cellules souches pluripotentes sont à l'origine des différents types cellulaires présents dans l'épithélium digestif. Leur activité intense permet un remplacement continu des cellules de l'épithélium.

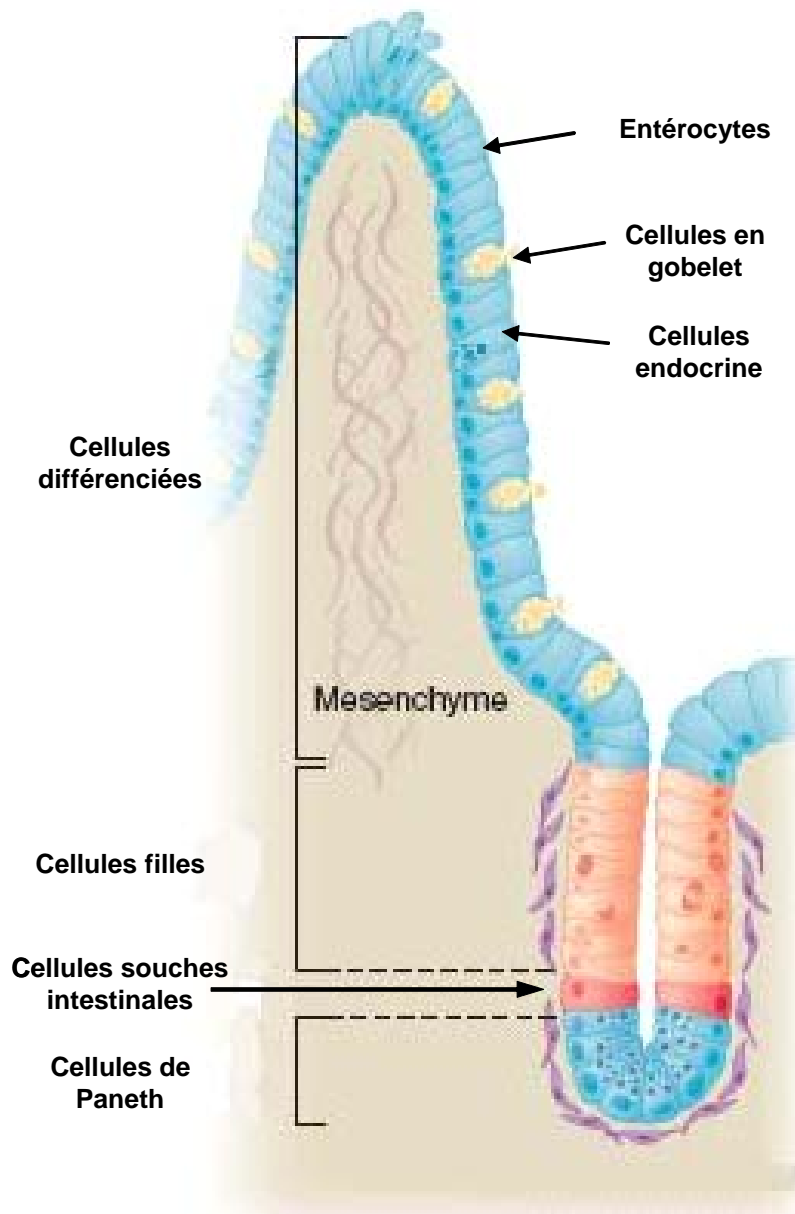
Dans l'intestin grêle, il existe quatre ou six cellules souches intestinales par crypte, localisées en cercle, à 4 cellules de hauteur par rapport au fond de la crypte. Les cellules filles, issues de ces cellules souches activées, migrent vers le haut, le long des cryptes (sauf les cellules de Paneth). Au fur et à mesure de leur migration, les cellules deviennent matures et acquièrent leur fonctionnalité. A la limite supérieure des cryptes, ces cellules arrêtent de proliférer et se différencient (Figure 4).

La prolifération et régulation des cellules souches sont contrôlées par plusieurs systèmes, dont la voie WNT et Hedgehog ou certains facteurs de transcription comme CDX1, CDX2 et HNF1 [11, 12]. La voie WNT par exemple déclenche les programmes de gènes spécifiques à certains types de cellules par la stabilisation et la localisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine [13, 14]. Il a également été montré que la voie Notch avait un rôle critique dans la spécification des cellules intestinales puisque les cellules en gobelet étaient pratiquement inexistantes chez des souris transgéniques dont la voie Notch avait été activée [15].

### **3.2. Les entérocytes**

Ce contingent cellulaire représente la plus importante population cellulaire de l'épithélium intestinal et a pour fonction première l'absorption. Ce sont de grandes cellules cylindriques à noyau rond ou ovale situé dans le tiers inférieur de la cellule. Les entérocytes sont caractérisés par la présence à leur pôle apical de microvillosités constituant la bordure en brosse. Ces microvillosités sont recouvertes du glycocalyx (des glycoprotéines membranaires). De très nombreuses enzymes hydrolytiques (peptidases, aminopeptidases, disaccharidases, phosphatases alcalines, etc.) sont présentes au niveau du plateau strié des entérocytes, soit dans la membrane plasmique même des microvillosités (et il s'agit alors





**Figure 4: Cellules souches de l'intestin**

(d'après Moore *et al.*, 2006 [14])

d'enzymes synthétisées par la cellule), soit dans les mailles du glycocalyx qui les revêt (c'est le cas des enzymes provenant du chyme et surtout du suc pancréatique, qui sont donc adsorbées à la surface de l'entérocyte).

Ces diverses enzymes assurent les dernières étapes de l'hydrolyse des peptides et des glucides alimentaires et livrent ainsi aux « transporteurs » de la membrane plasmique les acides aminés et le glucose qu'ils ont pour rôle de faire pénétrer à l'intérieur des entérocytes qui les déverseront dans les capillaires sanguins.

La surface d'échange de l'entérocyte est augmentée de 14 à 40 fois par les microvillosités, et son pouvoir absorbant est facilité par la contractilité de ces dernières.

### **3.3. Les cellules de Paneth**

Les cellules de Paneth sont localisées à la base des cryptes de l'intestin grêle et plus rarement du côlon proximal où elles sont toutefois différenciées. Ce sont des cellules pyramidales avec un apex étroit et une large base où se situe le noyau. Les microvillosités apicales sont rudimentaires. Ayant un renouvellement cellulaire lent, elles possèdent une activité sécrétoire intense se traduisant par la présence de grains de sécrétion apicaux à forte activité lysozymale, le lysozyme étant une enzyme bactériolytique.

Ces sécrétions (défensines, lysozyme, phospholipase A2), associées au pouvoir phagocytaire de ces cellules, leur confèrent une fonction dans la défense innée et de contrôle de la flore bactérienne. Leur nombre augmente du duodénum vers l'iléon. Elles sont en revanche absentes dans le côlon.

### **3.4. Les cellules M (Microfold cells)**

Ces cellules épithéliales spécialisées recouvrent les îlots lymphoïdes et les plaques de Peyer. Leur rôle est immunitaire puisqu'elles ont la capacité de les transporter par endocytose les antigènes endoluminaux puis les transfèrent aux cellules dendritiques qui les présentent aux lymphocytes B.

### 3.5. Les cellules endocrines

Disséminées le long de l'épithélium intestinal, elles représentent seulement 1% des cellules épithéliales. Ce sont des cellules polarisées piriformes. La plupart atteignent la lumière intestinale par un apex étroit présentant des microvillosités. Les cellules endocrines sont sensibles à la composition du contenu luminal, ce qui suggère que leurs microvillosités contiennent des récepteurs membranaires. Elles sont spécialisées dans la synthèse et la sécrétion d'amines (sérotonine) et de polypeptides biologiquement actifs (par exemple la somatostatine). Les produits de sécrétion sont stockés dans des granules généralement concentrés dans le cytoplasme de la région basale, et sont libérés par exocytose.

Plusieurs types de cellules endocrines sont répartis tout au long du tube digestif. Chaque type sécrète une hormone spécifique et possède une localisation préférentielle (Tableau 1). Par exemple, les cellules D qui sécrètent la somatostatine sont retrouvées tout au long du tractus digestif, de l'estomac au côlon ainsi qu'au niveau du pancréas. En revanche les cellules G qui contiennent la gastrine ne sont localisées que dans l'antrum et le duodénum proximal.

Ce système de régulation endocrinien contrôle l'ensemble des fonctions digestives: motricité, sécrétions exocrines (enzymatique et hydroélectrique), sécrétions endocrines, croissance voire différenciation des cellules.

Cellule	Produit de sécrétion	Pancréas	Estomac		Intestin grêle			Gros intestin	
			Fundus	Antre	D	J	I	C	R
<b>A</b>	Glucagon	+	a						
<b>B</b>	Insuline	+							
<b>D</b>	Somatostatine	+	+	+	+	f	f	f	
<b>EC</b>	5HT	f	+	+	+	+	+	+	+
<b>ECL</b>	Histamine		+						
<b>G</b>	Gastrine			+	+				
<b>I</b>	CCK				+	+			
<b>K</b>	GIP				+	+			
<b>L</b>	PYY et peptides dérivés du proglucagon				f	+	+	+	+
<b>Mo</b>	Motiline				+	+			
<b>N</b>	Neurotensine				f	+			
<b>P</b>	Inconnu	f	+	+	+	f	f	f	f
<b>PP</b>	Polypeptide pancréatique	+			a				
<b>S</b>	Sécrétine				+	+			
<b>X</b>	Inconnu		+						

**Tableau 1 : Classification et distribution des cellules endocrines chez l'homme**

[21].

**D** = Duodénum,

**J** = Jéjunum,

**I** = Iléon,

**C** = côlon,

**R** = rectum,

**5HT** = 5-hydroxytryptamine,

**CCK** = cholécystokinine,

**GIP** = gastric inhibitory peptide,

**PYY** = peptide YY,

**a** = fœtus ou nouveau-né,

**f** = peu de cellules,

**+** = présence de cellules.

### 3.6. Les cellules caliciformes

Egalement appelées cellules à mucus, cellules en gobelet ou cellules caliciformes en raison de leur forme en calice. Fortement polarisées et disséminées entre les entérocytes dans l'ensemble de l'épithélium intestinal, elles se retrouvent surtout dans les deux tiers supérieurs des cryptes mais quelques-unes sont éparses parmi les entérocytes des villosités [7, 9]. Atteignant 10 à 15% de la population totale de l'épithélium duodéal [16], la proportion de cellules caliciformes augmente progressivement pour s'élever à 24% dans le côlon distal [16, 17].

Les mucines sécrétées à la base des cryptes sont plutôt neutres, contenant peu d'acide sialique, pour devenir de plus en plus sialylées avec la migration des cellules en gobelet le long des cryptes et villosités.

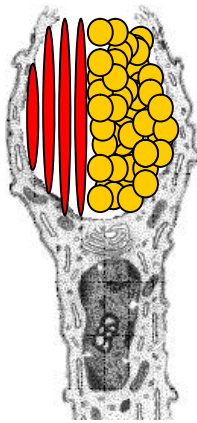
Le noyau de ces cellules se retrouve au pôle basal, surmonté de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique rugueux et volumineux, ainsi que de nombreuses mitochondries [9]. Cette région supranucléaire est le site privilégié où s'effectue la biosynthèse des mucines. La zone apicale révèle quant à elle une quantité importante de granules de sécrétion recouverts d'une fine membrane cytoplasmique. Ces granules renferment les grains de mucines [18].

Les cellules caliciformes se caractérisent également par la présence d'une thèque dont le rôle est primordial pour la sécrétion des grains de mucus par exocytose. La thèque est une structure de soutien qui permet d'isoler les granules de la membrane plasmique et de la région golgienne [19].

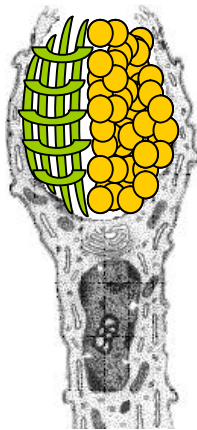
Cette thèque est composée de trois couches (Figure 5) :

- Une couche interne adjacente à la masse granulaire, et constituée de microtubules orientés dans l'axe longitudinal de la cellule.
- Une couche médiane, composée de filaments intermédiaires disposés en spirale de la base de la thèque vers l'apex de la cellule.
- Une couche externe de filaments intermédiaires disposés circonférentiellement.

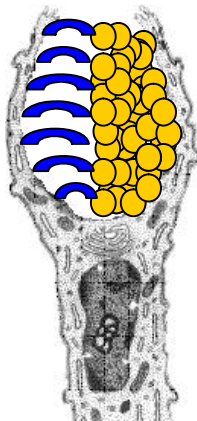
Outre ces sécrétions de mucines, les cellules en gobelet libèrent également des Trefoil Factor ou TFF, à fonction de protection et réparation de la muqueuse [20].



A: Couche interne de microtubules orientés dans l'axe longitudinal de la cellule



B: Couche médiane de filaments intermédiaires disposés en spirale, de la base à l'apex de la cellule



C: Couche externe de filaments intermédiaires disposés de façon circonférentielle

**Figure 5: Structure de la thèque des cellules caliciformes**

## **II - Mucus et mucines gastro-intestinales**

Le tractus gastro-intestinal subit les agressions journalières d'éléments extérieurs présents dans l'alimentation. Sa surface épithéliale est revêtue d'une barrière protectrice lubrifiante, le gel de mucus.

### **1. Caractéristiques générales du mucus intestinal**

Le mucus, produit par des cellules épithéliales spécialisées, est continu. Il constitue une barrière physique entre le tissu sous-jacent et les micro-organismes, les toxines qu'ils produisent et les autres substances potentiellement nocives présentes dans la lumière intestinale. Dans l'intestin normal, l'érosion mécanique ou protéolytique de la couche de mucus du côté de la lumière est due au frottement des matières en cours de digestion et à l'action d'enzymes; cette érosion doit être compensée par des sécrétions en provenance de la muqueuse pour garantir l'intégrité de la barrière, première ligne de défense contre les agressions extérieures [22].

Le mucus est un gel viscoélastique tapissant la face luminale de l'épithélium intestinal. Il est constitué de deux couches [23]:

- Un mucus insoluble adhérent aux cellules épithéliales, situé au-dessus du glycocalyx, d'épaisseur comprise entre 50 et 60  $\mu\text{m}$ , et dont le rôle est d'assurer la protection de l'épithélium.

- Un mucus hydrosoluble dit « flottant », d'épaisseur beaucoup plus importante (200 à 400  $\mu\text{m}$  chez le rat) et constamment renouvelé. Il a une fonction lubrificatrice et protectrice.

Le mucus est composé à 95% d'eau, environ 5% de mucines et moins de 1% molécules diverses (IgA, TFF, protéines cellulaires, cellules épithéliales exfoliées, etc.)

## **2. Caractéristiques générales des mucines**

Le principal composant structural du mucus, responsable de ses propriétés visco-élastiques et gélifiantes, sont les mucines. Les différentes mucines rencontrées chez les mammifères ont des caractéristiques communes: Ce sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire (entre 250 et 30 000 kDa) formées d'un squelette peptidique (l'apomucine) et de chaînes glucidiques (environs 60 à 80% du poids de la mucine) rattachées au squelette par des liaisons O-Glycosidiques (liaisons majoritaires) ou N-Glycosidiques [24]. Ces chaînes hérissées de part et d'autre de l'apoprotéine donnent aux mucines une forme d'écouvillon, présentant des régions fortement glycosylées résistantes aux protéases. Cette glycosylation confère également aux mucines une forte densité et une grande viscosité.

### **2.1. Les chaînes glycosidiques (Figure 6):**

#### **2.1.1. Les chaînes O-glycosidiques**

Les chaînes sucrées sont fixées à l'apomucine à 80% par une liaison O-glycosidique via une *N*-acetylgalactosamine (GalNAc). Elles sont composées de monosaccharides dont le L-fucose, D-galactose, *N*-acetyl-D-galactosamine, *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) et l'acide *N*-acetylneuraminique ou acide sialique [25]. La longueur de ces chaînes varie de 1 à 20 oses, sauf pour les mucines coliques, dont les chaînes vont de 2 à 12 sucres.

Les chaînes oligosaccharidiques sont construites par addition, étape par étape, de sucres. Les enzymes qui catalysent ces réactions sont les glycosyltransférases. L'étape d'initiation correspond à la fixation d'un GalNAc sur un résidu sérine ou thréonine de l'axe peptidique.



Ces chaînes peuvent être découpées en trois parties :

- Le **Core**, qui est la région la plus proche du corps peptidique. Elle contient le GalNAc d'initiation et les deux ou trois sucres qui lui sont attachés. La séquence protéique à laquelle est fixée la chaîne glycosidique, ainsi que la concentration en glycosyltransférases influencent fortement la composition de chaque core, et ce, de manière tissu spécifique.
- Un domaine intermédiaire : Le **Backbone**. C'est le squelette structural de la chaîne oligosaccharidique. Il est soit linéaire, soit ramifié. Ces articulations osidiques confèrent une grande diversité aux chaînes et donc aux mucines.
- Le **domaine périphérique** est la région distale, composée de sucres périphériques reliés au backbone. Ce domaine est le siège de nombreuses substitutions : sulfatations, fucosylations et sialylations. En effet, au cours de la migration des cellules caliciformes, les mucines sont ainsi progressivement sialylées, et donc acidifiées, la charge des mucines contribuant à leur rôle de protection de la muqueuse intestinale. La sialylation serait également requise pour la sécrétion de mucine ainsi que l'adressage correct des glycoprotéines membranaires et notamment de MUC1 [26, 27].

Robbe *et al.* on mis en évidence en 2003 l'existence d'un gradient de glycosylation avec une augmentation du gradient d'acide sialique allant de l'iléum vers le côlon et un gradient inverse de fucose [28].

### 2.1.2. Les chaînes N-glycosidiques

Beaucoup moins abondantes et plus linéaires que les chaînes de nature O-glycosidique, les chaînes N-glycosidiques sont réparties au niveau des extrémités N et C terminales de l'axe peptidique [29].

Ces chaînes sont composées de trois sucres : N-acétylglucosamine (GlcNAc), galactose (Gal) et mannose (M) (qu'on ne retrouve pas dans les chaînes O-glycosylées) [30]. L'initiation du squelette osidique s'effectue grâce à une liaison entre un GlcNAc et un résidu asparagine du corps protéique. La suite de la chaîne est essentiellement composée de mannose. Quelques GlcNAc et Gal sont également présents.

Belle *et al* se sont penchés sur les fonctions possibles des chaînes N-glycosylées et ont mis en évidence leur importance dans la dimérisation des mucines, notamment de la mucine MUC2 [29, 31]. Parry *et al* parlent également de rôle dans la sécrétion, la stabilité, la fonction et le transport des glycoprotéines [32].

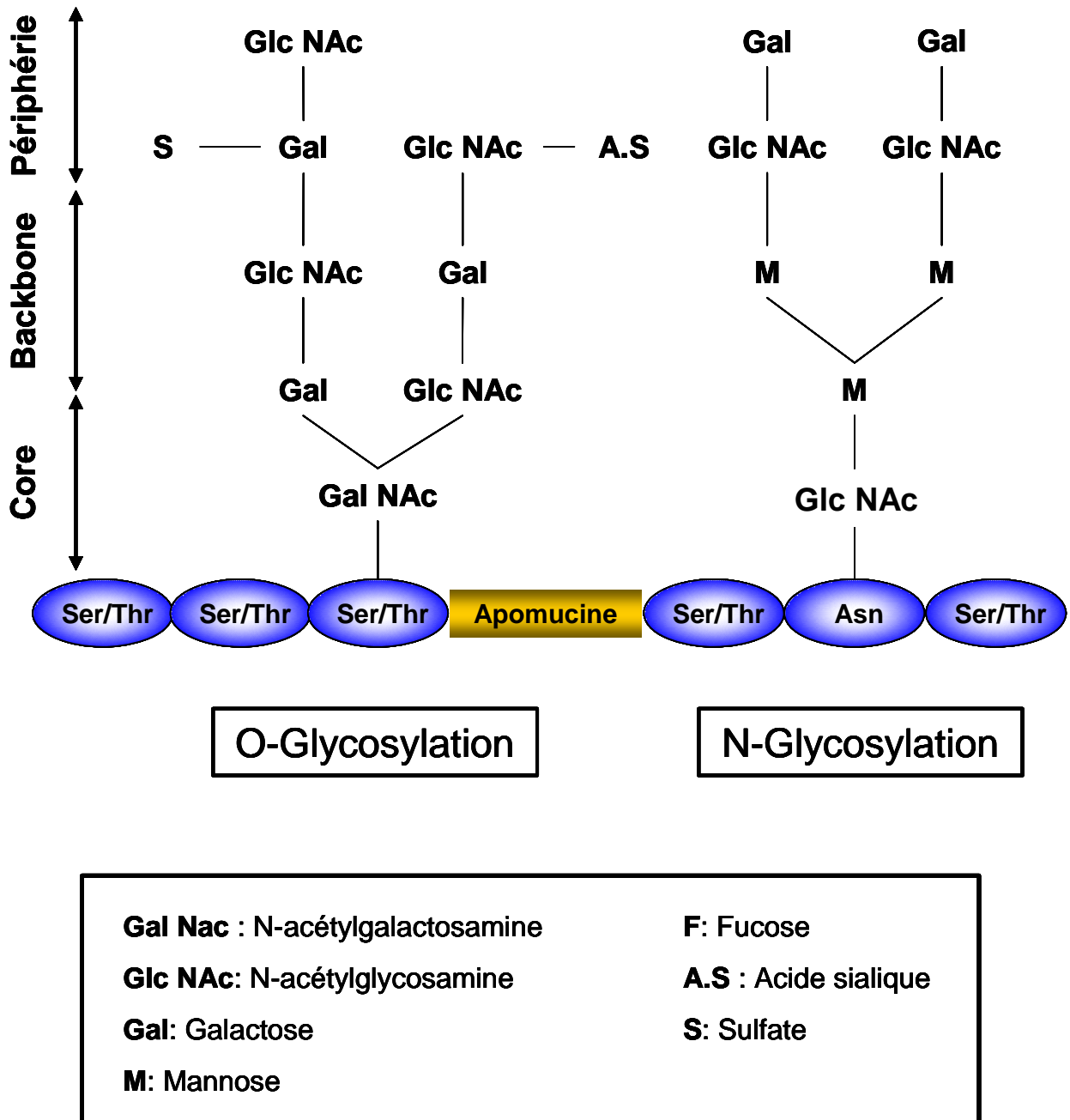


Figure 6 : Structure des chaînes glycosidiques des mucines

## 2.2. L'apomucine

Les mucines sont constituées d'un axe peptidique, appelé « apomucine ». L'apomucine (400 à 7000 acides aminés) contient dans une région centrale, qui représente à elle seule 50% du corps protéique, des séquences peptidiques répétées en tandem (appelées TR pour *Tandem Repeat*), riches en sérine, thréonine et proline, dont la séquence initiale est, chez l'homme, composée de 8 à 169 acides aminés selon les mucines. Ces domaines, variables en longueur et en séquences, sont propres à chaque mucine (8 acides aminés pour la mucine MUC5AC et 20 pour MUC1) et à chaque espèce. La région centrale est appelée Variable Number Tandem Repeat (VNTR) du fait du nombre variable de répétitions en tandem selon les individus. Elle est également appelée région PTS à cause de sa richesse en Proline, Thréonine et Sérine. Ces unités répétitives sont donc potentiellement O-glycosilables.

Aux extrémités N- et C-terminales de l'apomucine se situent des séquences uniques, riches en cystéines dans le cas des mucines sécrétées. A ce niveau, les chaînes oligosaccharidiques sont rares et sont fixées à l'axe peptidique par des liaisons N-glycosidiques (Figure 6). La rareté des chaînes glucidiques dans ces régions (par contraste avec les régions hautement glycosylées) les rend sensibles aux protéases bactériennes et endogènes.

Ces extrémités contiennent les caractéristiques permettant de distinguer deux classes de mucines :

- Les mucines sécrétées qui possèdent des domaines semblables à ceux du facteur de coagulation Von Willebrand (VWF) et appelés domaines D. Ces domaines, riches en cystéines, jouent un rôle dans l'oligomérisation des monomères de mucines et dans l'emballage dans des vésicules de sécrétion [33].

- Les mucines membranaires qui possèdent au niveau C-terminal une zone transmembranaire, hydrophobe, et responsable de leur ancrage dans la double couche lipidique de la membrane plasmique.

Chez l'homme, une vingtaine de mucines ont été identifiées à ce jour, réparties selon les différents organes comme le montre la Figure 7, allant de MUC1 à MUC20, certaines sont sécrétées et d'autres membranaires. Chez le rat, des homologues de ces mucines ont été mis

en évidence. Ce sont rMuc1 (pour rat Muc1), rMuc2, rMuc3, rMuc4, rMuc5AC et rMuc6. Au niveau gastro-intestinal, les mucines majoritaires sont MUC1, MUC2, MUC3, MUC4 et MUC5AC, MUC2 étant la mucine principale du gel de mucus intestinal.

### 3. Les mucines sécrétées :

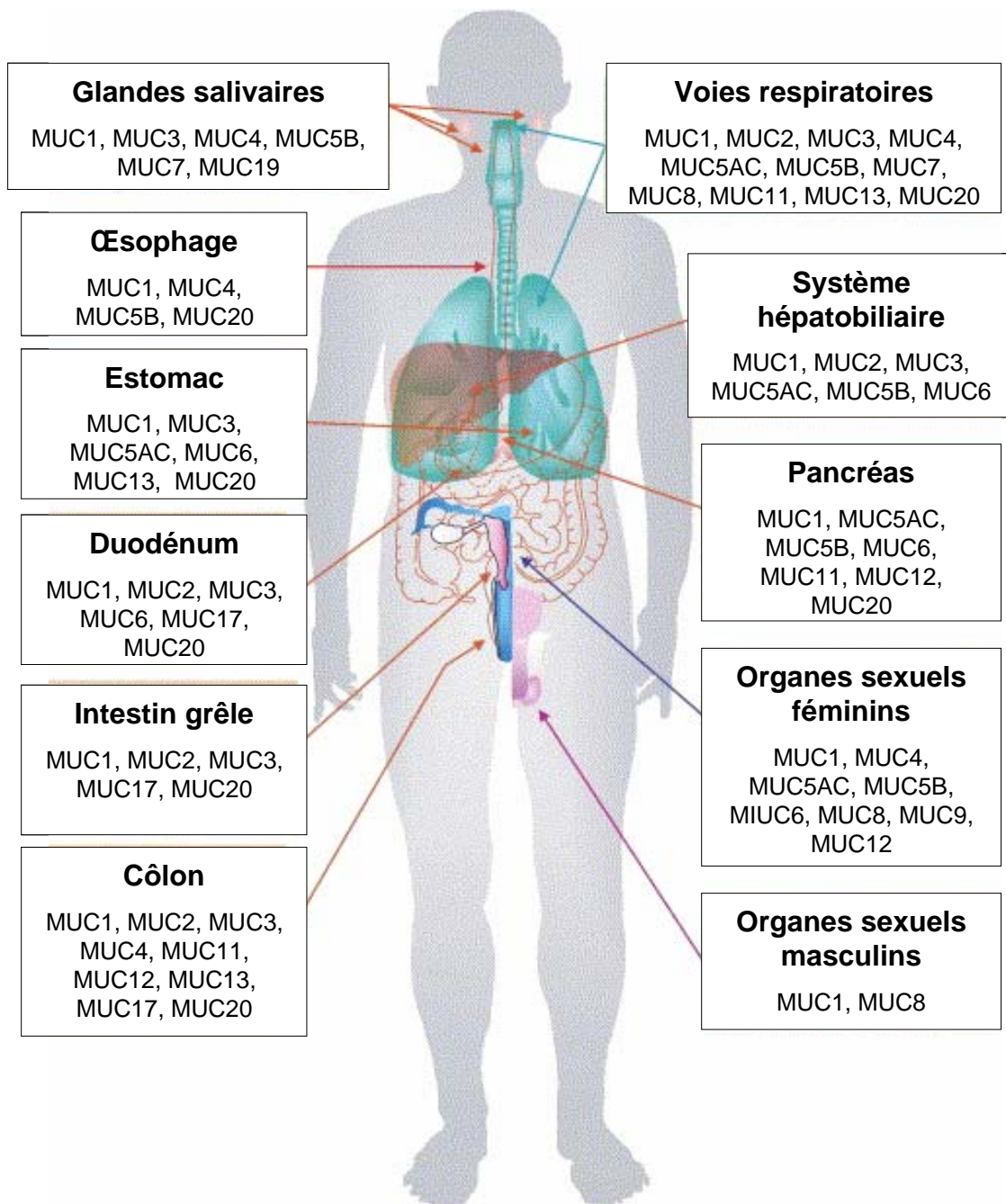
Selon le Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>), il existe cinq mucines sécrétées :

**MUC2**, **MUC5AC**, **MUC5B** et **MUC6**, dont les gènes sont localisés sur le chromosome 11 au niveau p15 dans une zone longue de 400 kb [34]. Le gène de MUC6 se situe du côté le plus télomérique, alors que MUC5B se rapproche du centromère (Figure 8).

Elles présentent de très grandes homologies et dérivent probablement d'un gène ancestral commun. Leurs séquences peptidiques sont organisées selon un même schéma structural, avec un domaine TGF $\beta$ -like en position C-terminale [35]. Elles comportent toutes des domaines majeurs riches en cystéine (les domaines D1, D2, D3, D', D4 et C) semblables au facteur de von Willebrand (vWF) et un domaine cystine-knot (CK), qui les différencient des mucines membranaires. Les domaines CK sont impliqués dans les phénomènes de dimérisation [36].

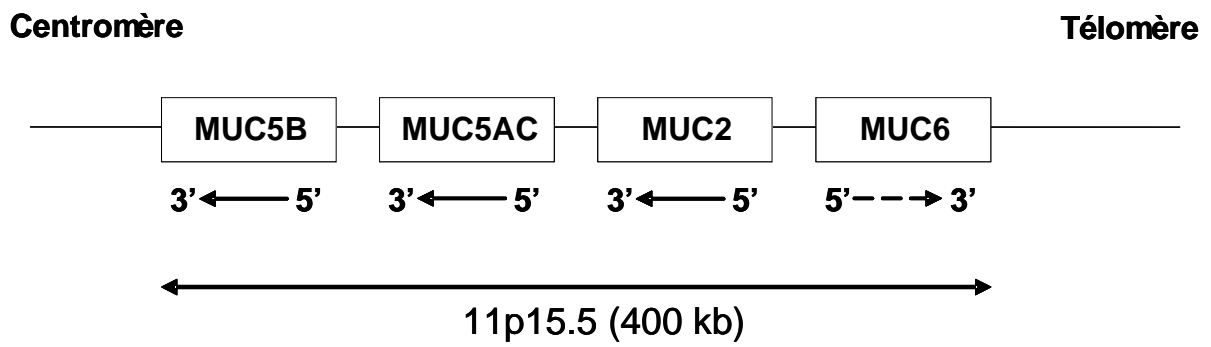
La région 11p15 est riche en îlots CpG, en gènes suppresseurs de tumeurs (WTI), facteurs de croissances (IGF-II) et oncogènes (HRAS) [37, 38]. La plupart des gènes de cette région sont régulés par méthylation lors des cancers [39, 40].

En 2004, Chen *et al* [36] ont cloné une autre mucine, baptisée **MUC19**, localisée sur le chromosome 12 au niveau q12. Cette mucine sécrétée présente également des domaines vWF et CK.



**Figure 7: Répartition des mucines dans le corps humain**

(d'après Andrianifahana et al., 2006)



**Figure 8 : les mucines de la région chromosomique 11p 15**  
(d'après Van Seuningen *et al.*, 2001)

Nos études ayant porté sur MUC2 et MUC5AC, la description qui suit sera axée sur ces mucines et leurs homologues chez le rat.

### **3.1. MUC2**

MUC2 est la principale mucine sécrétée de l'intestin grêle et du côlon. Isolée par Gum *et al* en 1989 [41] à partir d'une banque d'ADNc, c'est le premier gène codant pour une mucine humaine à avoir été entièrement séquencé [42, 43].

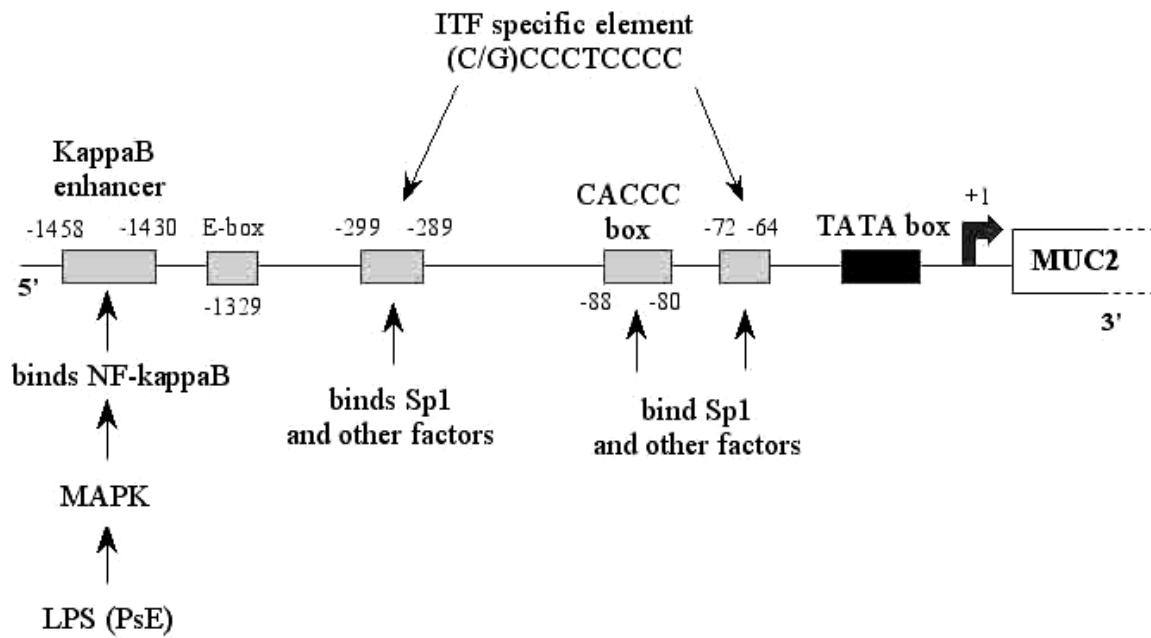
#### **3.1.1. Le promoteur de MUC2**

Le promoteur de MUC2 est caractérisé par la présence d'une boîte TATA localisée à 25 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, ainsi que d'un motif CACCC au niveau -88/-80 sur lequel se fixeraient des facteurs de transcription comme les Sp1 [44]. Le promoteur est séparé en deux régions : l'une riche en AT (-8000/-4000) et l'autre riche en GC (en aval de -4000) [45]. Enfin, différentes régions en amont de la boîte TATA sont des sites de liaisons des protéines AP-1 et 2, CREB (cAMP-responsive element binding protein), TR (thyroid hormone) etc [46] (Figure 9).

#### **3.1.2. L'apomucine de MUC2 (Figure 10)**

Le gène MUC2 code pour une protéine de plus de 5100 acides aminés dans sa forme allélique la plus courante [42], considérée comme l'archétype structural des mucines sécrétées.

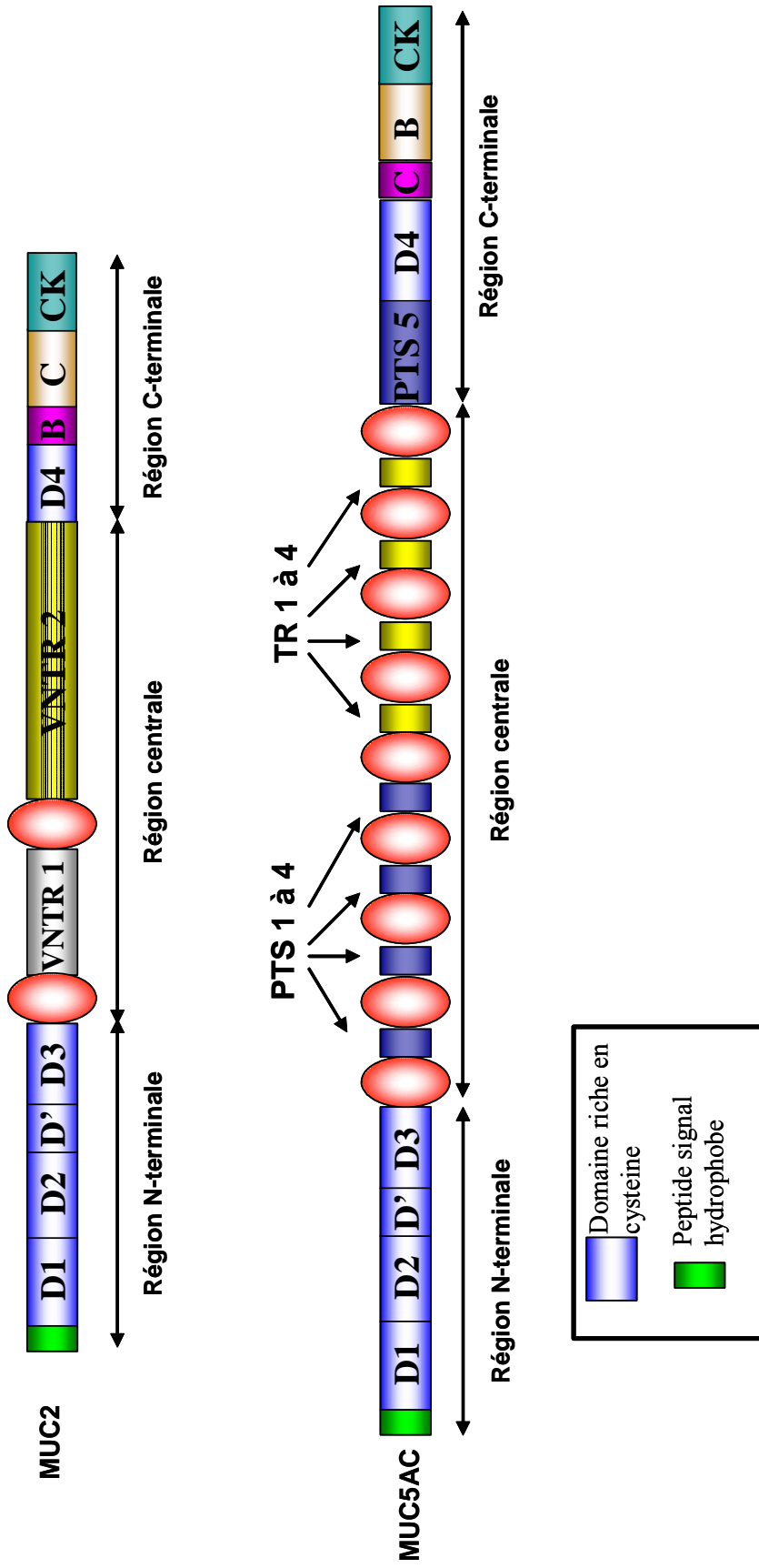
**La région centrale** est composée de deux séquences de répétitions d'acides aminés (VNTR). La première, en position centrale, est caractérisée par la répétition parfaite d'un motif de 23 acides aminés. Ce domaine possède entre 51 et 115 répétitions selon l'allèle [47]. La deuxième séquence de VNTR, située plus vers le côté N-terminal, est composée de 347 acides aminés et contient des séquences répétées de façon imparfaite [24]. Les deux régions VNTR sont riches en sérine, proline et thréonine sont séparées par un segment de 148 acides aminés [42]. Ce segment, riche en résidus cystéine, permettrait à la mucine de former, en plus de la forme linéaire habituelle, des polymères réticulés nécessaires à la constitution du



**Figure 9: Le promoteur de MUC2**

(d'après Van Seuningen *et al.*, 2001)





de MUC2 et MUC5AC

gel de mucus [16]. MUC2 posséderait plus de 1000 chaînes oligosaccharidiques au niveau de ces VNTRs [48].

MUC2 possède cinq domaines D, appelés ainsi à cause de leur homologie avec le domaine D du facteur Von Willebrand. D1, D2, D' et D3 sont localisés au niveau N-terminal alors que le D4 est en position C-terminale [42]. Ces domaines ont un rôle primordial pour l'aspect fonctionnel de MUC2, à savoir la formation, *via* des ponts disulfures intermoléculaires, de vastes polymères qui, une fois sécrétés, élaborent un véritable gel de mucus.

En aval du D4, trois autres séquences à forte teneur en cystéine ont également une similarité avec les domaines du facteur de Von Willebrand : un domaine C, un domaine B et un domaine CK (Cystin Knot). Ce dernier est formé de 85 acides aminés, dont 11 sont des cystéines et possède une structure tridimensionnelle proche de celle des TGF- $\beta$  [49].

Enfin, 31 sites potentiels de N-glycosylation sont également disséminés le long de l'apomucine [42], la plupart aux niveaux N- et C-terminal.

### 3.1.3. rMuc2

Comme son homologue humain MUC2, Rat Muc2 (rMuc2) s'affiche comme le constituant principal du gel de mucus intestinal chez le rat. Mais sa structure reste peu connue.

Anciennement appelée MLP, pour Mucin Like Protein [50], rMuc2 est localisée sur le chromosome 1 du rat [51].

Son expression tissulaire se limite surtout à l'intestin grêle et au côlon, mais également à l'oreille et à la trachée. Des expériences d'hybridation *in situ* réalisées par Xu *et al.* ont permis de montrer que rMuc2 est bien exprimée par les cellules caliciformes intestinales et colique du rat [50].

La région C-terminale de la protéine rMuc2 est formée de domaines riches en cystéine, structurellement homologues aux domaines D4, B, C et CK du facteur de Von Willebrand [52, 53]. Elle est subdivisée en 4 régions :

- ⇒ Une partie de 54 acides aminés renfermant 4,5 séquences de 11 à 12 acides aminés répétés en tandem,

- ⇒ Une région PTS, riche en proline, thréonine et sérine, de 258 acides aminés.
- ⇒ Entre ces deux régions, on trouve une séquence de 42 acides aminés, renfermant de nombreux résidus cystéine.
- ⇒ Enfin, on note l'existence d'un second domaine riche en cystéine, composé de 767 acides aminés.

Le domaine C-terminale renferme également 13 sites potentiels pour la fixation des chaînes N-glycosidiques.

Le clonage de la partie N-terminale de rMuc2 a été réalisé par Ohmori *et al.* en 1994 [54] : Cette séquence contient une partie non-VNTR de 1391 acides aminés suivie d'une séquence de 122 acides riches en résidus sérine, thréonine et proline. Elles ont respectivement 80 et 38% d'homologie avec MUC2.

Dans la continuité de ces deux séquences se trouve le clone VR-1A isolé par Hansson *et al.* [51]. Il se compose de deux régions: Un domaine non-VNTR de 182 acides aminés, dépourvu de cystéine et contenant 64% de résidus sérine et thréonine et 14% de proline. Une séquence finale de 53 acides aminés avec 7 résidus cystéine et une sérine.

## **3.2. MUC5AC**

MUC5AC est la mucine majoritaire du tractus trachéo-bronchique et de l'estomac. Elle est exprimée également dans les épithélia de l'œil, de la vésicule biliaire et de l'endomètre [55].

Synthétisée par les cellules à mucus des glandes gastriques, elle forme un gel de mucus recouvrant la muqueuse gastrique.

Au début des années 90, l'équipe de Guyonnet Duperat *et al.* pensa cloner l'ADNc de MUC5A, MUC5B et MUC5C. Cette même équipe démontra en 1995 que MUC5A et MUC5C étaient issus du même gène, d'où le nom de MUC5AC [56].

### **3.2.1. Le promoteur de MUC5AC**

La séquence en amont du site d'initiation de la transcription contient une boîte TATA au niveau -29/-23, ainsi que des sites de liaisons à NFκB, SP1, GRE, AP-2 et un motif

CACCC [57]. Il a été montré que MUC5AC serait régulé par *Pseudomonas aeruginosa*, avec une augmentation de la transcription pouvant aller jusqu'à 20 fois. D'ailleurs plusieurs sites de réponse à *P. aeruginosa* ont été identifiés sur fragment d'ADN de 4 kb en amont du site de transcription de MUC5AC [24].

### 3.2.2. L'apomucine de MUC5AC (Figure 10)

Le gène MUC5AC code pour une grosse mucine, caractéristique des mucines sécrétées. Le squelette protéique peut se résumer à trois ensembles majeurs [58-60] :

La région centrale se compose de 3500 acides aminés, agencés en 17 éléments majeurs :

- Neuf domaines-Cys de 110 acides aminés, riches en cystéines (10 résidus) et similaires à ceux observés chez MUC2 [47].
- Entre les domaines Cys 1 à 5 s'intercalent des régions PTS ne présentant aucune séquence répétée, ni résidu cystéine. Les domaines Cys 5 à 9 sont quant à eux entrecoupés par 4 domaines PTS renfermant des séquences répétées en tandem de 8 acides aminés chacune : il s'agit des TRs (tandem repeat) 1 à 4 [59]. Ces TRs montrent un polymorphisme important de taille et de séquence : ils forment donc un véritable VNTR.
- Comme tout VNTR, ce domaine est fortement glycosylé. Il contient ainsi pas moins de 95 séquences TXXP, site prédominant pour l'addition des GalNAc, et, au minimum, un site potentiel de N-glycosylation [59].

La région N-terminale :

Composée de 1370 acides aminés, elle présente une grande homologie (43% environ) avec la région N-terminale de MUC2 [59, 60]. Riche en cystéine (environ 9%) et en sites de N-glycosylations (7 sites potentiels), elle renferme les 4 domaines D : D1, D2, D' et D3 décrits chez MUC2, ainsi qu'une séquence signal putative de 19 acides aminés.

En outre, il existe un motif « leucine zipper » entre les acides aminés 273 et 300, dont le rôle serait de faciliter la dimérisation de MUC5AC [60].

La région C terminale [58] :

Elle est constituée de 1227 acides aminés, répartis en trois grandes régions :

- Le « Cys-Domain » 9
- Une région PTS de 50 acides aminés
- Un domaine de 874 acides aminés, riche en résidus cystéine (10%). Ce dernier renferme les domaines D4, B, C et CK présents chez MUC2.

Cette région C-terminale possède également 12 sites potentiels de N-glycosylation.

### **3.2.3. rMUC5AC**

Cette mucine est sécrétée par les cellules à mucus de l'épithélium gastrique et conjonctival [55].

Clonée partiellement en 1996 par Guzman et al [61], Inatomi et al rapportent l'année suivante la séquence complète de la région C-terminale de rMuc5ac, ainsi que le début de la région centrale située du côté C-terminal [55].

La région centrale du côté C-terminal est constituée de séquences répétées en tandem de 16 acides aminés dont 7 seulement sont conservés, révélant un polymorphisme de séquence.

La région C-terminale est composée de 1140 acides aminés, elle se compose de quatre domaines majeurs similaires aux domaines D du facteur Von Willebrand. Ces domaines présentent 64% d'homologie de séquence avec ceux présents chez MUC5AC.

## **4. Les mucines membranaires :**

Les mucines membranaires sont MUC1, MUC3A et B, MUC4, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 et MUC20. MUC1 est localisée sur le chromosome 1q22, MUC3A et B, MUC11, MUC12 et MUC17 au niveau 7q22, MUC4 et MUC20 en 3q29, MUC13 en 3q13, MUC15 en 11p14 et MUC16 en 19q13 (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>).

Ces mucines partagent la caractéristique de pouvoir être exprimés sous la forme de volumineuses glycoprotéines membranaires. Elles ne forment pas de polymères comme les mucines sécrétées. Elles sont fixées au niveau apical des cellules de manière transmembranaire, avec le côté N-terminal extracellulaire, suivi d'un domaine de répétition en tandem, d'une séquence hydrophobe transmembranaire leur permettant de s'insérer dans la membrane apicale et d'une extrémité C-terminale intra-cytoplasmique qui peut être phosphorylée et qui lie les protéines du cytosquelette. Elles sont caractérisées par un domaine SEA (Sea urchin sperm protein Enterokinase and Agrin), localisé entre les régions VNTR et le domaine transmembranaire, sauf pour la mucine MUC4 qui ne possède pas de domaine SEA [62].

Les mucines membranaires peuvent être retrouvées sous différentes formes [63-66]:

Forme membranaire classique

Forme soluble (suite au clivage protéolytique de forme membranaire)

Sécrétée (splicing alternatif)

Sans région à répétition d'acides aminés (splicing alternatif également)

Au niveau intestinal, les homologues des mucines membranaires chez le rat sont rMuc1, rMuc3 et rMuc4.

MUC1, MUC3, MUC4, rMuc1, rMuc3 et rMuc4 demeurant les mucines membranaires intestinales les plus exprimées respectivement chez l'homme et chez le rat.

Sont décrites ci-dessous la mucine MUC1, principale mucine membranaire, et les mucines MUC3 et MUC4, qui nous ont plus intéressés dans nos études et leurs homologues respectifs chez le rat.

#### **4.1. MUC1**

C'est la première mucine membranaire humaine identifiée et séquencée [67]. Elle est connue sous différents noms : PEM (Polymorphic Epithelial Mucin), episialin, DUPAN-2, DF3, HMFG (Human Milk Fat Globule), EMA (epithelial membrane antigen), CD227 et MUC1 [68].

Sa distribution tissulaire est quasiment ubiquitaire : voies aériennes, voies digestives etc. [69, 70]. Elle a un très large domaine extracellulaire (1000 à 2000 acides aminés) qui s'étend 200 à 500nm au-dessus de la membrane plasmique et 10nm au dessus du glycocalyx [69]. Le gène de MUC1 est composé de 7 exons dont le deuxième correspond à la région VNTR de la mucine.

#### **4.1.1. L'apomucine de MUC1 (Figure 11) :**

Du côté extracellulaire, la région N-terminale est relativement courte, elle renferme la séquence signal.

Vient ensuite la région centrale qui contient des séquences répétées en tandem de 20 acides aminés chacune. Le nombre de ces TRs peut varier de 20 à 120, avec une fréquence plus élevée pour des répétitions comprises entre 40 et 80 [70]. MUC1 possède donc un véritable VNTR, représentant 50 à 80% de la protéine. Comme tout domaine renfermant des séquences répétées, le VNTR de MUC1 est riche en résidus sérine (10%), thréonine (15%) et proline (25%), et donc fortement glycosylé.

De chaque côté de cette région VNTR, MUC1 possède deux autres régions PTS. De petite taille, ces dernières correspondent à des séquences répétées en tandem dégénérées ; en effet, leur séquence est différente de celle retrouvée au sein du VNTR [67, 70]. Ces deux régions contiennent également cinq sites potentiels de N-glycosylation.

La région C-terminale est très étendue. Elle est scindée en deux parties reliées de façon non covalente, mais stable [70]. En effet, elle renferme un site de clivage protéolytique post-traductionnel, situé 60 à 67 acides aminés en amont du domaine transmembranaire (composé de 31 acides aminés). Sa séquence est : Phe-Arg-Pro-Gly-Ser-(Val)<sub>3</sub>. La coupure s'effectue entre les résidus Gly et Ser. Ce clivage protéolytique s'effectue dans l'appareil de Golgi mais les deux parties de la molécule restent associées de manière non covalente, aboutissant à la formation d'un hétérodimère membranaire [69].

Les raisons de l'existence de cette forme hétérodimérique ne sont pas encore connues mais Gendler y voit un mécanisme pour la dissociation rapide de la mucine qui servirait ainsi de signal en cas d'altération du milieu extracellulaire [69].

La partie intracellulaire de MUC1 est très courte. Formée de 69 acides aminés, elle se situe à l'extrémité C-terminale.

Il existe deux autres isoformes de MUC1 issues de l'épissage alternatif : MUC1/Y qui n'a pas de région de répétition en tandem [71], est transmembranaire et se lie à une autre isoforme de MUC1 : la protéine MUC1/SEC sécrétée, qui, elle, contient une région VNTR [72], les deux régions PTS dégénérées et une partie C-terminale correspondant à l'intron 2 de MUC1. Elle peut être détectée grâce à des anticorps spécifiques SEC lors de cancers [70].

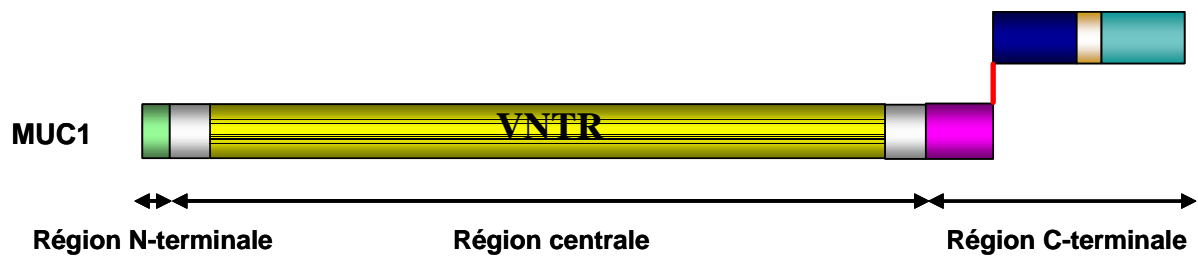
#### **4.1.2. rMuc1**








Depuis le séquençage partiel de sa région C-terminale par Desouza *et al.* en 1998 [73], peu de choses nouvelles ont été rapportées sur la structure de rMuc1.

Ainsi, on sait seulement que le domaine séquencé présente 89 à 91% d'identité avec la région équivalente chez la mucine murine Muc1, tant au niveau de la séquence nucléotidique que protéique. La région cytoplasmique offre également 85% d'identité avec celle de MUC1, avec seulement 7 acides aminés substitués.

Enfin, on sait récemment que la mucine rMuc1 existe aussi sous les formes membranaires ou solubles. Comme pour MUC1 humaine, les isoformes solubles ne seraient pas issues d'un épissage alternatif, mais plutôt d'un clivage protéolytique.





- |   |   |
|---|---|
|    | Peptide signal hydrophobe                           |
|    | Région PTS  |
|   | Domaine C-terminal extracellulaire                  |
|  | Liaison entre les deux sous unité c-terminales      |
|  | Sous unité de la partie C-terminale extracellulaire |
|  | Domaine transmembranaire                            |
|  | Domaine cytoplasmique                               |

**Figure 11 : Structure peptidique de MUC1**

## 4.2. MUC3 (Figure 12)

### 4.2.1 Apomucine MUC3A - MUC3B

Le gène de MUC3, situé sur le chromosome 7q22, code pour une large mucine, produite au niveau intestinal aussi bien par les cellules en gobelet que les entérocytes [65].

Pratt *et al.* ont prouvé qu'il existait en fait deux gènes MUC3, nommés MUC3A et MUC3B mais identiques à environ 95% [74]. Les séquences promotrices sont hautement conservées, ne possèdent pas de boîte TATA et ont des sites d'initiation multiples [75].

Les deux gènes codent pour des protéines pratiquement identiques, dont les caractéristiques sont :

- Une région N-terminale, décrite pour la première fois par Gum *et al.* en 2003 [75], qui contient un peptide signal de 21 acides aminés, suivi d'une séquence unique contenant plus de 40% de proline, sérine et thréonine, mais pas de séquences de répétitions d'acides aminés.
- Une région centrale est formée de deux régions VNTRs. La première, du côté N-terminal, est composée de séquences dégénérées de 59 acides aminés répétés 13 fois. La seconde est formée de 17 acides aminés répétés 5 fois [76].
- Une région C-terminale des mucines MUC3 se caractérise par la présence de [75] :
  - deux domaines EGF-like de 44 acides aminés chacun (la conservation inter-espèce de ces domaines suggère des fonctions capitales dans l'interaction protéine/protéine et récepteur/ligand),
  - une région SEA [65, 74, 77]. Cette dernière région, située entre les deux domaines EGF-like, est un site de clivage protéolytique.
  - un domaine transmembranaire,
  - et enfin, la région cytoplasmique, à l'extrémité C-terminale. Elle est composée de 75 acides aminés. Elle contient des résidus Tyr, et une séquence YVAL [65], semblable aux motifs reconnus par les protéines contenant un domaine SH2 (Src Homology-2), domaines connus pour être impliqués dans la transduction du signal.

### 4.2.2. rMuc3

La structure de rMuc3 n'est encore que partiellement dévoilée. Seuls les 381 acides aminés du domaine C-terminal, ainsi qu'une partie de la région centrale ont été séquencés jusqu'à présent [78].

Ainsi, rMuc3 partage un grand nombre de caractéristiques avec les mucines membranaires humaines MUC3, MUC4, MUC12, MUC13 et MUC17 [78-80].

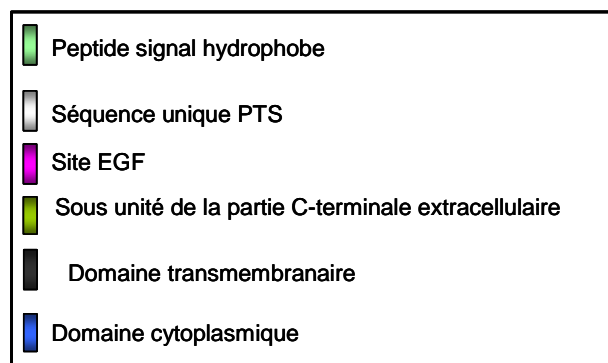
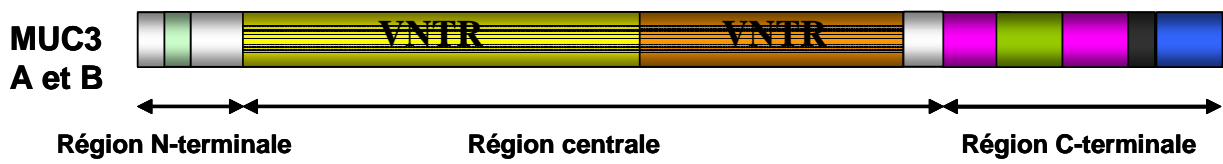
La région centrale est très étendue et fortement glycosylée, puisqu'elle renferme un grand nombre de VNTR dont la séquence répétée correspond à TTTPDV [78, 80].

La région C-terminale est composée de 5 domaines. Elle présente une homologie de 81% avec la mucine Muc3 de souris et 38% avec MUC3 humaine [65]. Elle renferme ainsi une queue cytoplasmique de 80 acides aminés, un domaine transmembranaire, deux domaines EGF et une grande région SEA de 174 acides aminés, intercalée entre les deux motifs EGF. Cette région contient plusieurs sites de N-glycosylation ainsi qu'un site de clivage protéolytique semblable à celui de MUC1. Ce dernier a pour séquence Leu-Ser-Lys-Gly-Ser-Ile-(Val)<sub>2</sub>, avec un clivage s'effectuant entre les résidus Gly et Ser [78]. Situé 127 acides aminés en amont du domaine transmembranaire, il induit l'obtention d'un hétérodimère avec une partie C-terminale de 49kDa, liée à la membrane et une partie N-terminale de 30kDa [81].

Ce clivage se déroule dans l'appareil de Golgi, lors de la synthèse de la mucine, et comme pour MUC1, les deux parties restent liées de manière non covalente à la surface des entérocytes [78, 80].

Khatri et al. ont démontré en 2004 qu'un second clivage pouvait intervenir sur le fragment C-terminal de 49kDa de l'hétérodimère rMuc3, le ramenant à une taille de 30kDa [81].

Ces deux clivages faciliteraient la solubilisation de rMuc3 à la surface apicale des entérocytes et/ou aideraient rMuc3 à participer aux fonctions ligand/récepteur et transduction du signal pour le bon fonctionnement de l'entérocyte [81].



**Figure 12 : Structure peptidique de MUC3**

### 4.3 - MUC4 (Figure 13)

En raison de sa conformation rigide et étirée (1200 à 2000 nm), cette molécule chargée négativement dépasse largement au pôle apical l'ensemble des molécules du glycocalyx (10 nm) et contribue à la protection des surfaces épithéliales des muqueuses. MUC4 est également impliquée dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales ainsi que dans les processus de signalisation cellulaire. Elle pourrait jouer un rôle important dans la signalisation par ErbB2 dans les cellules tumorales et ainsi induire la prolifération cellulaire [82-84].

Sa distribution tissulaire concerne les voies aériennes, les voies digestives (intestin grêle et colôn), le cervix et le poumon. En revanche, MUC4 a une expression anormale dans divers carcinomes (pancréas, foie, sein, vésicule biliaire, glande salivaire, prostate, ovaire et colon) [85].

#### 4.3.1. APOMUCINE MUC4

Le gène MUC4 est localisé sur le chromosome 3 en position 3q29. Ce gène code pour une famille d'isoformes comportant au moins 7 variants distincts, 5 formes solubles et 2 formes membranaires. Ces variants sont obtenus par un épissage alternatif complexe de l'extrémité 3'-terminale de l'ARNm de MUC4. Les formes solubles ne possèdent pas les domaines de type EGF [86-89].

Cette mucine comporte:

- Tout d'abord, du côté extracellulaire, la totalité de la séquence N-terminale située en amont du domaine répétitif central de MUC4 a été caractérisée. Elle contient un peptide signal de 27 acides aminés, suivi d'une séquence unique de 951 aa riche en proline, sérine et thréonine, et qui comporte 3 sous domaines d'environ 126 aa présentant une forte homologie de séquence. Ce domaine extracellulaire est fortement glycosylé et long de 2,12 µm.
- Ensuite une région centrale constituée de séquences répétées en tandem de 16 acides aminés. [90]

- Enfin, la région carboxyterminale (1156 aa) de MUC4 riches en des sites de N glycosylation et qui se caractérise par la présence d'un site de clivage GDPH qui clive le précurseur en deux sous unités MUC4 $\alpha$  (large sous unité de 850 kDa de type mucine) et MUC4 $\beta$  (sous unité transmembranaire de '80 kDa') [89]. MUC4 $\beta$  comporte deux domaines EGF-like, un domaine transmembranaire hydrophobe de 24 aa, une queue cytoplasmique, à l'extrémité C-terminale [91].

#### 4.3.2 - rMuc4 ou SMC

Le gène rMuc4 (9Kb) code pour un polypeptide de 300 kDa. Le complexe sialomucine SMC, également appelé rMuc4, est composé de deux sous unité ASPG1 et ASPG2 qui correspondent respectivement aux sous unités MUC4 $\alpha$  et MUC4 $\beta$ . SMC est synthétisé sous la forme d'un précurseur qui est clivé lors de son passage à travers le réticulum endoplasmique en ASPG1 et ASPG2 qui vont former une glycoprotéine hétérodimerique par liaison non covalente entre les deux sous-unités.

ASPG1 (ascite sialoglycoprotéine 1) est une protéine de 2172 aa, de haute masse moléculaire (> 200000). ASPG1 est divisée en trois domaines (une séquence unique N-terminal, une séquence répétée en tandem, riche en sérine et thréonine et qui peut être fortement O- glycosylée et une séquence unique C-terminal).

ASPG2 (120-140kDa) est une glycoprotéine transmembranaire de 744 aa. ASPG2 contient 2 régions N-glycosylées et dans sa partie extracellulaire deux domaines EGF like qui peuvent interagir avec le proto-oncogène ErbB2. Elle contient également une région riche en cystéine, un domaine transmembranaire de 25 aa et un domaine cytoplasmique de 20 aa (figure14) [89, 92].

Il a été montré que la partie N-terminal d'ASPG1 et la séquence complète d'ASPG2 ont 60% d'identité avec la séquence de MUC4. En plus de la forme membranaire, SMS existe sous une forme soluble. Contrairement à la forme soluble de MUC4 qui provient d'un épissage alternatif, l'origine de la forme soluble de SMC n'est pas clairement établie [87, 93].

rMuc4 est exprimée dans les cellules épithéliales sécrétrices (intestin grêle, côlon, glaire cervicale, poumon) et également dans les tissus tumoraux du pancréas, de la vésicule biliaire

et les tissus mammaires. Il est surexprimé dans les tumeurs mammaires et du pancréas. Il a été montré qu'il peut lier et moduler la phosphorylation de ErbB2 et donc potentialiser le signal de transduction généré par les récepteurs de la famille HER (Human Epidermal growth factor Receptors) [89].

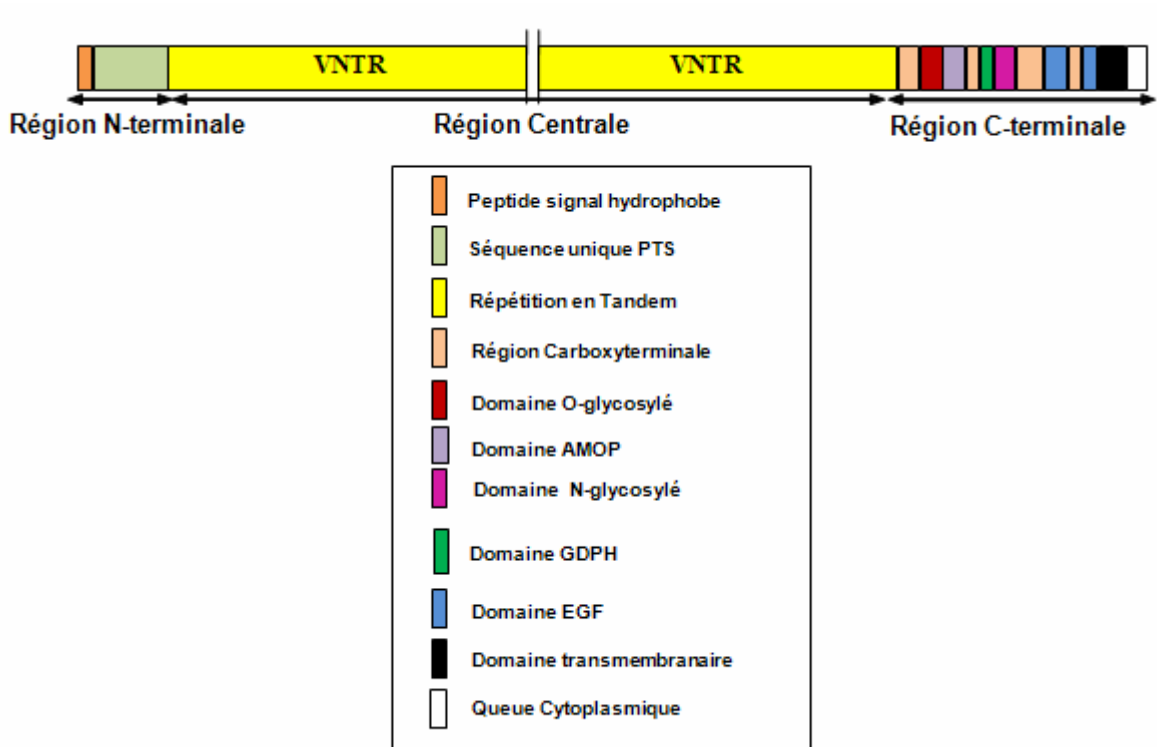


Figure 13 : Structure peptidique de MUC4 [87]

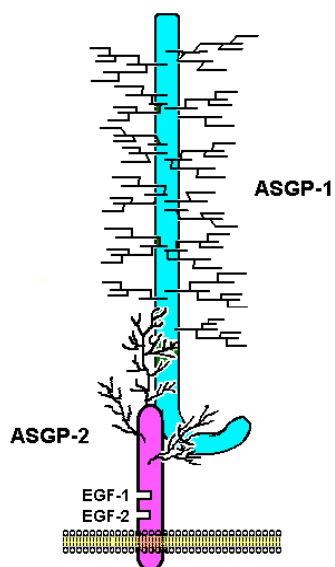


Figure 14 : Les deux sous unités ASPG1 et ASPG2 de rMuc4



## **5. Régulation de la sécrétion et de l'expression des mucines intestinales**

La barrière de mucus est constamment dégradée et renouvelée. Cela fait partie du processus normal de la muqueuse intestinale afin d'assurer la protection continue de la muqueuse contre les dommages potentiels de produits ou organismes présents dans le bol alimentaire ou le chyme intestinal.

### **5.1. Synthèse et dégradation des mucines**

#### **5.1.1. Synthèse**

La biosynthèse des mucines implique la transcription du gène MUC, la traduction de la protéine, sa conformation, les glycosylations appropriées, la polymérisation et le stockage.

Les N-glycosylations ont lieu au tout début de la traduction de la protéine, dans le réticulum endoplasmique rugueux. Les chaînes N-glycosylées dirigent les peptides précurseurs vers le bon compartiment cytoplasmique pour leur maturation [94-96]. Dans le cas de MUC2, les protéines chaperonnes calréticuline et calnexine reconnaissent les chaînes N-glycosylées et modulent la synthèse des mucines au niveau de l'étape de la conformation tridimensionnelle et de l'oligomérisation dans le réticulum endoplasmique [97]. Ce phénomène assure le bon alignement des glycoprotéines pour la formation de ponts disulfures au niveau des domaines de Von Willebrand, CK et EGF-like [98]. Ces deux protéines chaperonnes n'interagissent pas avec MUC5AC, indiquant que deux mucines sécrétées, issues du même chromosome, nécessitent des conditions de synthèse différentes [97].

Les dimères issus de l'oligomérisation sont ensuite transférés vers l'appareil de Golgi où des sucres sont ajoutés via les glycosyltransférases sur les chaînes N-glycosylées [32] ;

s'ensuivent les O-glycosylations, puis les dimères subissent une oligomérisation pour devenir de véritables complexes. La synthèse des différents motifs d'oligosaccharides est tissu-dépendante puisqu'elle dépend de la présence de certaines glycosyltransférases dans les sous-compartiments des appareils de Golgi [99]. Les domaines de Von Willebrand des mucines jouent ici un rôle important au niveau de l'échange thiol-disulfure pour la formation des ponts du même nom [100]

La délétion ou le blocage de certaines glycosyltransférases a une influence importante sur la structure finale des chaînes oligosaccharidiques et pourrait entraîner leur interruption prématurée ou même leur élimination dans certaines pathologies comme les cancers [101].

Après la formation de polymères, les mucines vont être condensées dans des vésicules golgiennes nouvellement synthétisées; s'ensuit une migration apicale. Certaines vésicules vont alors fusionner avec la membrane plasmique [102]: c'est l'exocytose de grains de mucines sécrétées. Les mucines membranaires seront quant à elles ancrées à la surface de la cellule.

### **5.1.2. Dégradation**

Les chaînes oligosaccharidiques des mucines étant assez diversifiées, elles nécessitent un large spectre d'enzymes capables de les dégrader. Ces dernières agissent sur l'apomucine après l'élimination des chaînes oligosaccharidiques. Le site majeur de l'activité de ces enzymes est le côlon, grâce à l'action de différentes bactéries qui les sécrètent [103].

Une population de bactéries dégradant les mucines a ainsi été identifiée par Hoskins *et al.* en 1981. Ce sont les bactéries MOD (Mucin Oligosaccharide Degrading bacteria). Ces bactéries font partie de la flore normale du tube digestif et produisent des glycosidases qui agissent spécifiquement sur les mucines [103]. Les sucres qui en résultent sont utilisés comme source d'énergie pour les bactéries, entraînant la production d'acides gras à chaîne courte, le produit final du métabolisme bactérien. D'autres bactéries sécrètent des *mucin-desulfating sulfatases*, qui désulfatent les mucines, permettant aux glycosidases d'y accéder [104, 105].

En 2005, Rho *et al* ont également mis en évidence l'existence d'une enzyme qui entraîne directement la désulfatation des mucines en faisant un clivage au niveau de liaisons glycosidiques. Cette enzyme est donc une sulfoglycosidase puisque, contrairement aux

enzymes citées plus haut, son activité passe outre la séquence de désulfatation par une première enzyme suivi d'une déglycosylation par une deuxième [106].

## **5.2. La sécrétion du mucus intestinal**

Le maintien de la couche de mucus est assuré par les cellules en gobelet *via* la sécrétion de mucines. Cette sécrétion s'effectue selon deux voies distinctes : une voie de sécrétion de base et une voie régulée qui fait suite à une stimulation.

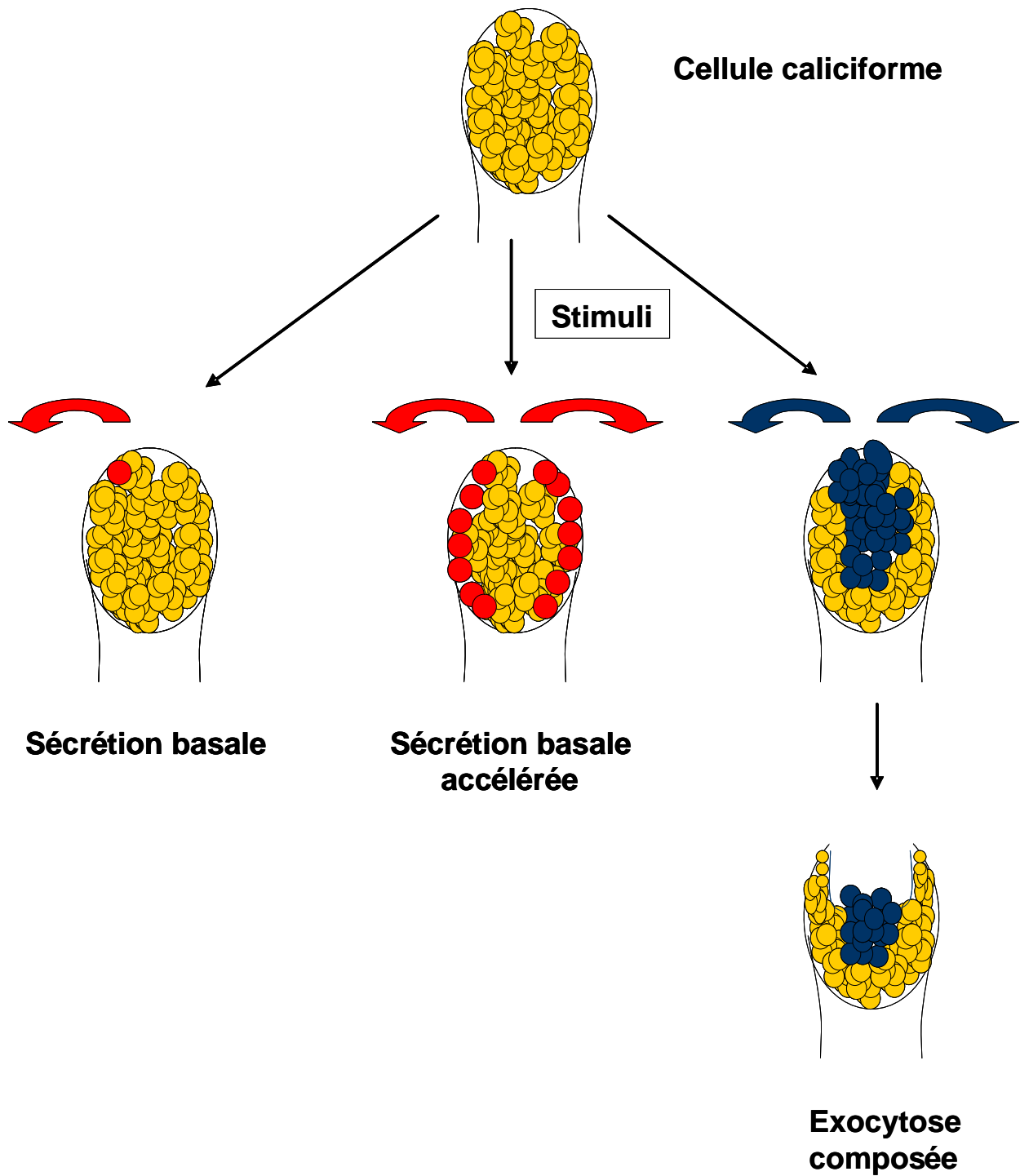
### **5.2.1. Sécrétion basale**

Cette sécrétion basale met en jeu les granules localisés en périphérie de la masse granulaire et se fait par exocytose périodique du contenu d'un seul granule de mucus à la fois qui fusionne avec la membrane apicale [107].

Diverses études ont montré que le cytosquelette de la cellule en gobelet joue un rôle important dans ce phénomène. En effet, la lenteur de la sécrétion serait expliquée par la présence de filaments d'actine, qui formeraient un barrage entre le granule et l'apex de la cellule. L'inhibition ou la rupture des filaments d'actine (respectivement par la cytochalasine D et la latrunculin A), aussi bien au niveau intestinal que dans les voies aériennes, accélère la sécrétion basale des mucines [102, 108]. Oliver *et al.* ont également prouvé les rôles organisateur et directeur, joués par les microtubules de la thèque dans cette sécrétion [109].

### **5.2.2. Sécrétion régulée (Figure 15)**

La sécrétion régulée est la conséquence d'une stimulation des cellules en gobelet. Elle correspond à une libération massive et rapide de granules de mucus dans la lumière intestinale. Il existe deux types de sécrétion régulée : l'accélération de la sécrétion basale et l'exocytose composée.



**Figure 15: Les trois types de sécrétion de mucus chez la cellule caliciforme**

### **5.2.2.1. Accélération de la sécrétion basale**

La sécrétion basale décrite précédemment peut être accélérée sous l'effet de certains stimulants (agonistes cholinergiques): Phillips *et al* [110] ont ainsi observé une diminution du nombre de cellules caliciformes des villosités d'iléon de rat. Lors d'études *in vivo* de stimulation par le carbachol, ce processus entraîne une diminution du volume intracellulaire des cellules caliciformes, voire une diminution du nombre de cellules caliciformes observables en histochimie.

### **5.2.2.2. L'exocytose composée**

Lors d'une stimulation, les cellules en gobelet peuvent également sécréter leur produit via un mécanisme dit « d'exocytose composée » qui met en jeu les granules centraux ayant préalablement fusionnés. La fusion de ces granules avec la membrane apicale induit une augmentation de la surface de la membrane apicale donnant un aspect de profonde cavitation à la cellule, phénomène facilement reconnaissable en histochimie [18].

## **5.3. Facteurs stimulant la sécrétion et l'expression des mucines gastro-intestinales**

Les cellules en gobelet sont polarisées, avec leur pôle apical vers la lumière du tube digestif et le pôle basolatéral du côté de la *lamina propria*. La régulation de la sécrétion et de l'expression des mucines peut donc se faire à deux niveaux :

### **5.3.1. Stimulation basolatérale :**

La base des cellules en gobelet est soumise à l'effet des neurotransmetteurs, du système immunitaire, et des hormones véhiculées par les vaisseaux de la *lamina propria*. Ci-dessous sont répertoriés quelques uns des sécrétagogues les plus connus.

### **5.3.1.1. Les médiateurs du système immunitaire**

#### ***5.3.1.1.1. Les prostaglandines***

Les prostaglandines PGE1 et PGE2 sont les seules reconnues comme ayant un pouvoir stimulant sur la sécrétion du mucus intestinal. Diverses études menées sur des lignées cellulaires (T84 pour PGE1, LS174T pour PGE2) et sur côlon de rat (PGE2) ont montré une décharge de mucus dose-dépendante suite à une stimulation par ces prostaglandines [111-114].

Parallèlement, Willemsen *et al.* ont montré que la PGE1, entraînait une forte augmentation de l'expression de MUC2 sur culture cellulaire [115].

#### ***5.3.1.1.2. L'interleukine 1 $\beta$ (IL1- $\beta$ )***

IL-1 $\beta$  peut être sécrétée par de nombreuses cellules comme les macrophages, les lymphocytes B, les lymphocytes T, les cellules dendritiques, les plaquettes, et les colonocytes.

Han *et al* et Cohan *et al.* ont montré que l'IL-1 $\beta$  avait un effet sécrétagogue du mucus sur des explants de duodénum de souris, et ce de manière rapide et dose-dépendante, suggérant une relation entre les médiateurs de l'inflammation et la sécrétion de mucus lors des maladies inflammatoires de la muqueuse intestinale [116, 117]. Ces résultats ont été confirmés dans le modèle de côlon isolé vascularisé en 1998 [113]. De leur côté, Enss *et al* ont montré que l'expression de MUC2 et MUC5AC était augmentée dans des cellules LS180 suite à une stimulation par l'IL-1 $\beta$  [118].

Certaines études ont été étendues à d'autres cytokines comme l'IL-4, -6 et -13. Ces dernières ont également entraîné une augmentation de l'expression de MUC2 et mais aussi de MUC5AC (sauf pour l'IL-13) dans des lignées cellulaires intestinales humaines [118, 120, 121].

### **5.3.1.1.3. L'histamine**

L'histamine est un médiateur chimique synthétisé par les polynucléaires basophiles et les mastocytes.

En 1982, Neutra *et al* ont observé la sécrétion de mucines par un mécanisme d'exocytose composée dans des explants de muqueuse colique de lapin, suite à une stimulation par l'histamine [122]. Ceci a été confirmé par Halm *et al.* qui ont montré un effet sécrétagogue de l'histamine à 10 $\mu$ M dans des explants de biopsies coliques humaines [123]. De leur côté, McCool *et al.* n'obtiennent aucune augmentation de la sécrétion de glycoprotéines lors de la stimulation de cellules T84 issues d'un adénocarcinome colique humain. Ils expliquent cela par l'absence de certains récepteurs au moment de la différenciation des cellules en gobelet dans la lignée T84 en particulier [112].

Il existe également d'autres médiateurs du système immunitaire ayant un effet sécrétagogue de mucines plus ou moins marqué, comme l'oxyde nitrique (NO) [113, 124] ou la bradykinine [125].

### **5.3.1.2. Les hormones intestinales**

Plusieurs hormones du système gastro-intestinal ont montré des effets sur la sécrétion de mucines:

#### **5.3.1.2.1. La sérotonine**

La libération de la sérotonine, encore appelée 5-hydroxy-tryptamine (5-HT) par les cellules EC de l'intestin déclenche les réflexes péristaltiques et sécrétoires. Les transporteurs (SERT) de la sérotonine « re-captent » la sérotonine une fois qu'elle est libérée et régulent ainsi son action au sein des terminaisons nerveuses des voies gastro-intestinales, afin de moduler la motilité et la sécrétion intestinale et la sensibilité viscérale.

Moore *et al* ont mis en évidence une exocytose composée de mucines dans l'intestin grêle de rat *in vivo* lors de stimulation par la sérotonine. Un résultat analogue a été observé

dans le côlon isolé vascularisé de rat suite à une stimulation de sérotonine à 3 et 5  $\mu\text{M}$  [113, 126].

#### ***5.3.1.2.2. La guanyline***

La guanyline est un peptide de 15 aa qui est exprimé le long du tractus intestinal avec un gradient croissant du duodénum au côlon distal. Elle y est détectée aussi bien dans les cellules villositaires que cryptiques et dans les cellules sécrétrices de mucus [127].

Ce peptide joue un rôle important dans la régulation des flux hydroélectrolytiques de l'intestin. En 1998, Furuya *et al.* ont montré que des injections de guanyline, réalisée *in vivo* chez le rat, induisent une décharge de mucus rapide, n'affectant que les cellules caliciformes cryptiques du duodénum et du jéjunum, et ce, via un relais nerveux cholinergique (la sécrétion de mucus était inhibée par une injection préalable d'atropine, antagoniste des récepteurs muscariniques) [128].

#### ***5.3.1.2.3. La neurotensine***

Ce peptide de 13 acides aminés est produit par les cellules N de l'intestin grêle distal (jéjunum et iléon). Il agit entre autre sur la motricité intestinale et colique, et joue un rôle majeur dans la réponse inflammatoire du tractus gastro-intestinal. Une seule étude a montré son implication, ainsi que celle de la neuromédine N (analogue naturel de la neurotensine) dans la décharge de mucines sur une lignée cellulaire humaine intestinale de cellules en gobelets : HT29-C1.16E [129].

#### ***5.3.1.2.4. Le Peptide YY***

Enfin, le Peptide YY, produit par les cellules L de l'intestin et du côlon, stimule également la sécrétion de mucines de manière dose-dépendante dans le côlon isolé vascularisé de rat [130].



### 5.3.1.3. Les neurotransmetteurs et neuropeptides

°Les médiateurs du système cholinergique apparaissent comme de forts stimulants de la sécrétion de mucus, contrairement aux médiateurs du système adrénérique qui n'auraient aucun effet:

**L'acétylcholine** : C'est un neurotransmetteur des nerfs cholinergiques responsables entre autres de vasodilatation artérielle, de contractions digestives et bronchiques. Des études réalisées sur biopsies intestinales humaines [18] ont démontré son pouvoir stimulant sur la décharge de mucus des cellules caliciformes cryptiques.

**Les agonistes cholinergiques muscariniques** : Des expériences *in vivo* sur des iléons de rat [98] et *in vitro* sur la lignée cellulaire T84 [112], ont prouvé que le carbachol induit une exocytose composée des cellules à mucus cryptiques.

Un autre agoniste cholinergique muscarinique, le bétanéchol est également un puissant stimulant de la sécrétion de mucus intestinal. Des études *ex vivo* réalisées sur des côlons de rat [113, 130, 131] et *in vivo* sur des jéjunums de lapin [132], ont mis en évidence l'effet sécrétagogue de cette molécule.

°Des neuropeptides comme le **Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)** (qui agit sur la régulation de la motricité gastro-intestinale, ainsi que sur le contrôle des sécrétions digestives exocrines (jéjuno-iléales, coliques et pancréatiques) et des sécrétions endocrines pancréatiques (insuline et glucagon) ou la **bombésine** (qui induit une augmentation de la sécrétion de glucagon, d'insuline, de polypeptide pancréatique ou de gastrine), ont également été testés. Grâce à des études *in vitro* sur la lignée cellulaire T84 [112], et *ex vivo* sur des côlons de rat [113, 130], ils sont désormais considérés comme des sécrétagogues des cellules à mucus. Hokari *et al.* ont également montré une augmentation de l'expression de MUC2 suite à une stimulation par le VIP sur cellules coliques humaines [133].

### 5.3.2. Stimulation apicale :

La barrière épithéliale gastro-intestinale est à l'interface entre le contenu lumenale du tube digestif et la muqueuse. Les cellules épithéliales, et notamment les cellules à mucus, se trouvent donc en position stratégique pour établir un lien avec la lumière du tube digestif et donc le bol alimentaire :

### **5.3.2.1. Fibres alimentaires**

Les fibres alimentaires regroupent un ensemble de polysaccharides (plus la lignine) qui ne sont pas digérés par les enzymes du tube digestif et non absorbés par l'intestin. Parmi ces fibres, on peut citer la cellulose, la pectine, la dextrine, la lignine, l'hémicellulose et les gommes [134].

Les fibres alimentaires sont classées en deux catégories :

- Fibres solubles dans l'eau comme la pectine et les gommes.
- Fibres non solubles dans l'eau comme la cellulose et la lignine qui composent la structure des feuilles, fruits, racines.

#### ***5.3.2.1.1 Effet des fibres alimentaires sur les mucines coliques***

Les fibres alimentaires sont impliquées dans la modulation de la barrière muqueuse colique, et un régime enrichi en fibres (pectine et cellulose) chez le rat augmente l'épaisseur de la couche de mucus ainsi que sa capacité à être rapidement renouvelée [135]. Le nombre de cellules en gobelet est également augmenté suite à un régime riche en fibre (37%) en comparaison à un régime plus pauvre en fibres (4,5%) chez le rat [136].

D'autres études ont également mis en évidence que l'augmentation de la sécrétion de mucus est dépendante du type de fibre utilisé :

Satchithanandam *et al.* [4] observent une augmentation des mucines gastriques et coliques sécrétées chez des rats ayant reçu un régime enrichi psyllium (20%) (Le psyllium est une fibre soluble issue d'une plante nommée plantago).

Barcelo *et al.* [3] ont quant à eux testé plusieurs fibres dans un modèle de côlon de rat isolé vascularisé. La pectine, la gomme arabique et la cellulose n'ont pas provoqué de sécrétion de mucus, alors que l'administration luminale d'alginate (une fibre algale utilisée comme complément alimentaire) ou d'ulvane (fibre issue d'algues vertes) ont induit une augmentation dose dépendante de la sécrétion de mucines.

De leur côté, Brownlee *et al.* [137] ont mis en évidence une augmentation de l'épaisseur de la couche de mucus colique chez des rats suite à un régime enrichi en alginate à 1%.

### **5.3.2.2. Acides gras à chaîne courte :**

Dans le côlon, la couche de mucus est en contact direct avec les produits issus de la fermentation colique des fibres alimentaires, et notamment avec les acides gras à chaîne courte (AGCC). Ces derniers représentent la majorité des anions organiques présents dans le côlon. Les principaux AGCC formés sont l'acétate, le propionate et le butyrate. La quantité d'acides gras à chaîne courte produite lors du processus de fermentation est dépendante du type d'alimentation des individus et du pool bactérien entretenu au sein du côlon. On considère cependant que les concentrations physiologiques des AGCC dans le côlon humain sont d'environ 60 mmol/L pour l'acétate, 25 mmol/L pour le propionate et de 15 mmol/L pour le butyrate. Ces acides gras présents au sein de l'intestin ont un rôle très important sur le fonctionnement du tube digestif dans son ensemble. Ils interagissent sur la motricité du côlon, l'absorption hydroélectrolytique, le trophisme colique et le métabolisme énergétique.

Il a été montré que les acides gras à chaîne courte stimulent la sécrétion de mucines chez le rat, le butyrate étant le sécrétagogue le plus efficace [138, 139]. Ces résultats ont été confirmés par Barcelo *et al.* en 2000, dans le modèle de côlon de rat isolé vascularisé [3]. *In vivo*, certaines fibres fermentescibles pourraient donc agir sur la mucosécrétion via leurs produits de dégradation : les AGCC.

Le rôle des AGCC sur les cellules à mucus ne s'arrête pas au seul fait de stimuler la mucosécrétion. En effet, Gaudier *et al.* ont démontré en 2004 que le butyrate module l'expression des gènes de mucines sur une lignée de cellules issues d'un adénocarcinome colique humain [140]. Cet acide gras entraîne une augmentation de l'expression de MUC3 et MUC5B, est sans effet sur MUC2 et diminue légèrement l'expression de MUC5AC. Ce même acide gras utilisé dans un milieu déprivé en glucose et où donc le butyrate serait le seul élément nutritif, augmentait comme attendu l'expression de MUC3 et MUC5B, mais également l'expression de MUC5AC et de manière considérable, celle de MUC2, au bout de 24h de stimulation. L'hypothèse émise par Gaudier *et al.* pour expliquer ces différences

(également observées par Velcich *et al.* [141]) serait que le butyrate agirait en tant que tel sur MUC3 et MUC5B (des éléments de réponse à cet acide gras ont été trouvés sur d'autres gènes que ceux des mucines) alors que ce seraient ses métabolites qui seraient impliqués dans le cas de MUC2 et MUC5AC.

Le butyrate pourrait donc jouer un rôle important dans la protection de l'épithélium du côlon en stimulant aussi bien la sécrétion du mucus que l'expression des mucines.

### **5.3.2.3. Hydrolysats protéiques :**

Des études précédentes réalisées dans notre laboratoire ont eu pour but de tester différents hydrolysats protéiques et leur effet sur les cellules en gobelet dans un modèle de jéjunum isolé vascularisé de rat.

L'hydrolysats de viande et d'ovalbumine n'ont montré aucun effet sécrétagogue. La caséine administrée par voie luminale ne stimulait pas non plus la sécrétion de mucines. En revanche, sous sa forme hydrolysée, la caséine s'est révélée être un puissant sécrétagogue des mucines au niveau du jéjunum de rat [142]. Un hydrolysats enzymatique de lactalbumine a également induit la décharge de mucus. Les hydrolysats protéiques ne sont donc pas tous potentiellement actifs, supposant ainsi que la sécrétion de mucus intestinal du rat dépend étroitement de la source de protéines alimentaires ingérées. Il est intéressant de noter que les deux hydrolysats actifs sur la sécrétion de mucines intestinales étaient des hydrolysats de protéines du lait.

Sachant que les cellules caliciformes reposent sur un chorion fortement innervé, une question était soulevée quand au rôle du relais nerveux dans la muco-sécrétion induite par l'hydrolysats de caséines. La tétródotoxine (TTX), un bloquant de la conduction nerveuse, a donc été testée dans le modèle *ex vivo* et il a été montré que l'effet de l'hydrolysats de caséines sur la muco-sécrétion était totalement aboli lors de la perfusion artérielle de cette molécule [142]. En outre, étant donné que certains fragments de caséine sont connus pour se comporter comme des ligands des récepteurs opioïdes, cette voie a également été explorée. Les résultats obtenus ont montré que la sécrétion de mucus induite par l'hydrolysats de caséines était également abolie par la perfusion artérielle de naloxone (un antagoniste des récepteurs aux opioïdes) [142]. Ainsi, il apparaît clairement que l'hydrolysats de caséine agit sur la muco-

sécrétion intestinale par une voie indirecte, en faisant intervenir un relais nerveux intrinsèque et l'activation de récepteurs opioïdes.

#### **5.3.2.4. Peptides bioactifs du lait**

Le lait de vache est composé de 32 à 35g/l de matières azotées totales. Parmi les protéines de lait, les caséines (fraction insoluble à pH 4,6 et à 20°C) constituent 75 à 80 % des protéines du lait de vache et sont formées de quatre protéines principales ( $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$ - et  $\kappa$ -caséine) au ratio 38 :11 :38 :13.

Les recherches menées ces dernières années ont montré que certaines séquences de caséines et de protéines solubles du lait ont des activités spécifiques reconnues (peptides bioactifs). Ainsi, les caséines peuvent libérer après hydrolyse partielle des peptides bioactifs comme les casokinines (peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine), les casoplatélines (activité anti-thrombotique), des immunopeptides et les casomorphines [5].

Ces peptides, petites chaînes d'acides aminés inactives dans la protéine mère, sont libérés durant les différentes étapes de la digestion des protéines du lait dans l'estomac et l'intestin grêle mais également lors de la fermentation des produits laitiers [144]. Les peptides bioactifs sont généralement formés de 3 à 10 acides aminés (à l'exception du caséinomaclopeptide comprenant 64 acides aminés) et sont capables d'exercer de nombreuses propriétés biologiques. Ils exercent des effets soit localement dans le tube digestif, soit à distance dans l'organisme, après être passés dans le système circulatoire.

##### ***5.3.2.4.1. Les $\beta$ -casomorphines et la mucosécrétion***

Les casomorphines représentent une famille de peptides opioïdes exogènes,  $\mu$ -préférentiels, isolés lors de la digestion enzymatique de la  $\beta$ -caséine bovine [145] par la pepsine, la leucine aminopeptidase ou l'élastase [146]. La forme la plus étudiée est la  $\beta$ -casomorphine 1-7, allant de l'acide aminé 60 à 66 : H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-OH.

Des travaux récents menés dans notre laboratoire [142, 147] sur un modèle de jéjunum isolé vascularisé de rat, ont montré que la  $\beta$ -casomorphine 1-7 administrée par voie luminale à la dose de  $1,2 \cdot 10^{-4}$  M (dose équivalente à la quantité de  $\beta$ -casomorphine 1-7 théoriquement présente dans un hydrolysate de caséine à 0,5% (poids/volume)) stimule de façon importante la sécrétion de mucus. Un effet de la  $\beta$ -casomorphine 1-7 (optimal à la concentration de  $1,2 \cdot 10^{-6}$  M) a également été mis en évidence par perfusion artérielle indiquant que ce peptide bioactif pouvait agir au niveau basolatéral de la cellule caliciforme. L'activation de la sécrétion de mucus par la  $\beta$ -casomorphine 1-7 fait intervenir la voie opioïde ainsi que le réseau nerveux intrinsèque [148].

#### ***5.3.2.4.2. Les $\beta$ -casomorphines et expression des mucines***

La  $\beta$ -casomorphine 1-7 augmente également l'expression des mucines gastrointestinales dans les lignées coliques mucosécrétantes de rat (DHE) et humaines (HT29-MTX). Dans les cellules DHE de rat, la  $\beta$ -casomorphine 1-7 a augmenté l'expression de rMuc2 et rMuc3. Cet effet était temps et dose dépendante. La réponse maximale est obtenue après 2 h de stimulation pour rMuc2 (225% de contrôle) et 4 h de stimulation pour rMuc3 (208% de contrôle) à la dose de  $10^{-4}$  M. Ces effets ont été abolis lors d'un prétraitement des cellules avec le cyprodime (antagoniste de la voie mu-opioïde). Dans la lignée humaine HT29-MTX, la  $\beta$ -casomorphine 1-7 ( $10^{-4}$  M) a également augmenté les niveaux de transcrits de MUC5AC (219% après 24 h de stimulation) [148].

## **6 - Fonctions biologiques du mucus**

La barrière de mucus produite par les cellules épithéliales spécialisées est continue. Elle constitue une barrière physique entre le tissu sous-jacent et les micro-organismes, les toxines qu'ils produisent et les autres substances potentiellement nocives présentes dans la lumière intestinale. Ce gel de mucus est composé à 95% d'eau, environ 5% de mucines et moins de 1% molécules diverses (IgA, TFF, protéines cellulaires, lysosymes, lactoferrines, cellules épithéliales exfoliées, etc.).

### **6.1 Lubrification de la muqueuse**

Il s'agit du rôle premier du mucus. Cette fonction essentielle est réalisée par la couche de mucus flottant. Une fois libérés dans la lumière intestinale, les polymères de mucines sont fortement hydratés (volume augmenté de 600 fois) et forment le gel viscoélastique qui protège la muqueuse contre les dommages mécaniques pouvant être occasionnés par le passage du bol alimentaire et des matières fécales.

### **6.2 Barrière de diffusion des nutriments**

La polymérisation, la glycosylation intense et la structure en écouvillon des mucines confèrent au mucus une très grande viscosité, faisant de lui un véritable réseau de mailles glycoprotéiques. De ce fait, la couche de mucus constitue un véritable microenvironnement

aqueux, stable, épais et continu, où s'effectue une diffusion lente et sélective des nutriments vers les entérocytes, cellules absorbantes de l'intestin.

### **6.3 Barrière physico-chimique**

Le gel de mucus forme une barrière stérique contre les acides, les enzymes et certains carcinogènes. Les mucines créent localement un gradient de pH par la grande concentration d'oligosaccharides neutres ou chargés, qui ont comme fonction de faciliter ou empêcher la diffusion de molécules chargées [149].

En outre, le gel de mucus prévient l'action protéolytique des enzymes (trypsine, chymotrypsine, lipase, etc.). En effet la richesse des mucines en radicaux glycosylés, sur lesquels viennent de surcroît se greffer des acides gras, augmente la résistance aux protéases. Les nombreux branchements oligosaccharidiques des mucines confèrent également au mucus un haut pouvoir de détoxification, en protégeant la muqueuse intestinale contre les métaux lourds avec lesquels il peut interagir [16].

D'autre part, le degré de glycosylation des mucines donne au mucus un pouvoir anti-oxydant. Il peut en effet neutraliser les radicaux libres produits dans la lumière intestinale, protégeant ainsi la muqueuse de ces espèces chimiques agressives [150].

### **6.4 Mucus et flore endogène**

Le gel de mucus est en symbiose avec la flore bactérienne endogène. Il offre de nombreux avantages « écologiques » aux bactéries présentes dans la lumière intestinale puisqu'il peut fournir des nutriments (les mucines sont une source d'énergie) pour le développement bactérien, facilitant la colonisation de l'intestin par les bactéries, qui peuvent ainsi survivre et se multiplier [151, 152].



## 6.5 Inhibiteur de l'adhésion des pathogènes

Le gel de mucus agit également comme une défense dynamique contre les pathogènes microbiens [153, 154], en inhibant leur adhésion aux cellules épithéliales notamment grâce à des similitudes entre le site de liaison naturel d'un micro-organisme et les glucides des mucines :

Ainsi, les mucines sécrétées inhibent la liaison de pathogènes comme *Yersinia enterocolitica* [155] et la mucine membranaire MUC3 inhibent l'adhésion d'*Escherichia coli* [156]. On a également montré que les mucines se liaient au rotavirus [157], réduisant ainsi son adhésion et son effet sur les cellules-cibles.

Les bactéries intestinales sont également capables d'inhiber l'adhérence de bactéries pathogènes aux cellules épithéliales en augmentant la production de mucines intestinales. Par exemple, le *Lactobacillus plantarum*, qui est un probiotique, augmente le niveau d'expression de l'ARNm de MUC2 et MUC3, inhibant ainsi l'adhésion d'*Escherichia coli* [158, 159].

Des études portant sur *Y. enterocolitica* ont montré que le mucus brut était un meilleur inhibiteur de l'adhésion bactérienne que la mucine purifiée [153], ce qui suggère que d'autres composants (peut-être des membranes de cellules desquamées) de la couche de mucus pourraient jouer un rôle dans la prévention de l'adhérence bactérienne à la surface de l'épithélium.

Paerregaard *et al.* [160] montrent que la capacité du mucus intestinal et de la mucine à inhiber l'adhésion microbienne à la membrane cellulaire peut aussi découler de modifications des propriétés de surface d'un micro-organisme. Les mucines peuvent masquer les adhésines hydrophobes à la surface des bactéries, il est donc possible que le mucus et la mucine protègent l'hôte en se déposant à la surface des bactéries et réduisent les risques d'adhésion.

## **6.6 Libération de molécules actives et réparation de l'épithélium**

Le gel de mucus capture des molécules biologiquement actives. Ces dernières pourraient être des indicateurs de brèches moléculaires ou physiques de la couche de mucus, et une fois relâchées, pourraient inciter les processus d'inflammation ou de réparation [161] : Le meilleur exemple est celui des TFF (trefoil factor). Ils sont liés au domaine D des mucines et font partie intégrante du mucus, participent à la protection des cellules épithéliales en contribuant à la viscosité du gel et par leurs propres activités biologiques [162, 163].

Suite à leur libération, les TFF vont promouvoir le processus de cicatrisation et la restitution de la muqueuse au niveau de l'épithélium endommagé [20].

## **7- Mucines et pathologies gastro-intestinales**

### **7.1. Gastro-entérites aiguës**

La gastroentérite est un trouble digestif fulgurant alliant nausées, vomissements et douleurs au ventre.

D'une façon générale, on observe une augmentation de la sécrétion de mucus, mais aussi une augmentation de la perte de mucus avec le flux gastrique. Cette activité sécrétoire intense est due aux cytokines libérées lors du processus inflammatoire, et aux toxines bactériennes [164].

### **7.2. Les maladies inflammatoires de l'intestin**

Les principales maladies inflammatoires intestinales sont la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse.

Des altérations de la synthèse des mucines, de leur maturation, sécrétion ou de leur dégradation dans les maladies inflammatoires de l'intestin sont connues :

Les chaînes oligosaccharidiques seraient deux fois moins longues que celles des mucines de l'intestin sain [165]. De plus, la sulfatation et la sialylation sont altérées. Ces changements réduisent les propriétés viscoélastiques du gel de mucus et influencent les interactions des mucines avec les micro-organismes, les électrolytes, les protéines de défense et les nutriments, diminuant ainsi la fonction de protection de la muqueuse.

Ainsi, les mucines pourraient être impliquées dans l'initiation ou le développement de ces maladies (Tableau 2) [166].

### 7.2.1. La colite ulcéreuse ou Recto Colite Ulcéro Hémorragique (RCUH)

La colite ulcéreuse est une inflammation chronique du tube digestif caractérisée par l'inflammation du côlon et du rectum avec formation d'ulcères. Si la maladie de Crohn peut affecter, de façon discontinue, l'ensemble du tractus digestif, la colite ulcéreuse ne touche que la muqueuse du côlon et du rectum.

<b>Caractéristiques</b>	<b>Colite ulcéreuse</b>	<b>Maladie de Crohn</b>	<b>Référence</b>
Mutations	Région VNTR altérée de MUC3	SNP de MUC3	[167, 168]
Epaisseur du mucus	Diminuée	Non altérée	[22]
Nombre de cellules en gobelet	Très réduit	Non altéré	[169]
Sulfatation	Diminuée	Non altérée	[170, 171]
Glycosylation	Altérée	Altérée	[172, 173]
MUC2 (protéine)	Diminuée	n.d.	[174, 175]
MUC1, MUC3, MUC4 (ARNm)	Non altérés	Diminués	[176]
MUC2 (ARNm)	Non altéré	Non altéré	[175, 177]
MUC5AC, MUC6 (ARNm)	n.d.	Augmenté	[177]
Auto-anticorps anti-MUC	Présents	Absents	[178]
Nombre de bactéries dans le mucus	Augmenté	n.d.	[179]

**Tableau 2 : Altération pathologiques des mucines coliques chez les patients atteints de la colite ulcéreuse et de la maladie de Crohn.**

n.d. = non déterminé,

SNP = single nucleotide polymorphism,

VNTR = Variable Number Tandem Repeat

L'épaisseur de la couche de mucus est diminuée au cours de la colite ulcéreuse [22] probablement due à une réduction marquée du nombre de ces cellules en gobelet et à une déficience des mucines sécrétées. MUC2, principale mucine sécrétée de l'intestin, joue un rôle important dans le maintien de l'épaisseur de la couche de mucus. Il a été montré que la sécrétion et la sulfatation de MUC2 étaient diminuées lors de la colite ulcéreuse [171, 174, 175] entraînant une réduction de la protection de la muqueuse. En effet, les mucines coliques normales sont très sulfatées, ce qui augmente leur résistance à la dégradation par les enzymes bactériennes. Toute altération de la sulfatation des mucines pourrait donc être majeure dans la pathogénicité de la colite ulcéreuse [1170]. Kyo *et al.* ont également mis à jour une altération de certaines séquences VNTR de MUC3 [167, 168].

Malgré tout, plusieurs études ont montré que l'expression des gènes des mucines ne serait pas altérée, avec une expression normale de MUC1, MUC2, MUC3 et MUC4 [180, 181]. Ainsi, malgré la diminution de la sécrétion de MUC2, le niveau d'ARN ne varie pas et semble indépendant de l'activité de la maladie, suggérant l'existence d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle.

### **7.2.2. La maladie de Crohn « MC »**

La maladie de Crohn est caractérisée par la présence d'une inflammation chronique dans l'appareil digestif. De manière successive ou simultanée, une ou plusieurs zones d'inflammation surgissent, de la bouche à l'anus. Elles peuvent mener à des ulcères dans différents segments du tube digestif. Dans la majorité des cas, la maladie de Crohn se localise dans la partie terminale de l'intestin grêle, selon une observation faite en 1932 par un médecin américain, le D<sup>r</sup> Burril B. Crohn. Environ 30 % des MC impliquent l'iléon terminal, 30 % le colon seul et 40 % une localisation iléo-colique (colon droit). Dans 50% des cas de MC colique, et contrairement à la RCUH, le rectum est sain ([www.pharmclin.uhp-nancy.fr/astiercours/rectocolites-Crohn.pdf](http://www.pharmclin.uhp-nancy.fr/astiercours/rectocolites-Crohn.pdf)).

Contrairement à la colite ulcéreuse, l'épaisseur de la couche de mucus est non altérée lors de cette maladie [22].

D'après une étude de Buisine *et al* [177] sur l'expression des gènes de mucines dans l'iléon (où la majorité des ulcérations sont retrouvées), une diminution de MUC3 et MUC4 apparaît dans les tissus normaux et altérés des patients, avec une réduction plus tardive de MUC1. Ceci n'apparaît que dans les tissus altérés dans lesquels il y a expression aberrante de MUC5AC et MUC6, qui sont normalement confinées dans l'estomac (MUC5AC et MUC6) et dans le duodénum (MUC6). MUC2 est retrouvée en quantité normale, sauf dans quelques lésions bien particulières, appelées UACL (Ulcer Associated Cell Lineage), où la mucine est pratiquement absente [177].

Enfin, MUC3 présente des mutations au niveau des zones SNP (Single Nucleotide Polymorphism), ce qui entraîne une prédisposition à la maladie de Crohn [167].

### **7.3. Mucines et cancer colorectal**

Le cancer du côlon est un grand problème de santé publique dans les pays occidentaux. Une personne sur 25 développera dans sa vie ce cancer qui est la 2<sup>ème</sup> cause de mortalité par cancer tout sexe confondu [29, 182].

Les altérations des mucines ont été mises en évidence lors de cancer colorectal et notamment :

- Une diminution de l'expression de la mucine sécrétée MUC2 [181].
- L'apparition de la mucine gastrique MUC5AC [183]
- Une surexpression de la mucine membranaire MUC1 [184].
- Des modification des glycosylations : chaînes plus courtes, diminution de la sulfatation [185].

L'examen de tumeurs colorectales a montré que, suite à une dérégulation de l'expression de l'apomucine et des enzymes qui la modifient durant la transformation des cellules tumorales, ces glycoprotéines pouvaient être dérégulées aussi bien au niveau de leur expression que de leur degré de glycosylation [186, 187] avec des chaînes oligosaccharidiques plus courtes et moins nombreuses. Cette glycosylation aberrante pourrait impliquer la délétion d'une glycotransférase en plus de l'altération de l'apomucine sur lesquelles sont fixées les chaînes sucrées [185, 188].

L'expression ectopique et/ou la surexpression de mucines membranaires (comme MUC1) par les cellules tumorales sont généralement associées à une augmentation du potentiel malin et un mauvais pronostic [184, 189]. Alors que l'expression de mucines sécrétées (comme MUC2), dans certains types de tumeurs, serait corrélée à un meilleur pronostic [190-192].

### ***7.3.3.1. Cas de la mucine sécrétée MUC2***

Les expérimentations animales suggèrent l'importance de MUC2 dans la carcinogenèse colique : Velcich et ses collaborateurs ont conduit une étude sur des souris "knock-out" chez lesquelles les deux copies du gène *Muc2* étaient invalidés [2]. Les chercheurs ont pu ainsi montrer que l'absence de Muc2 se traduisait par une croissance anormale des cellules intestinales. Résultat plus marquant, 65% de ces souris génétiquement modifiées ont spontanément développé des adénomes qui ont progressé vers des adénocarcinomes invasifs. Ces résultats mettent en évidence le rôle important que pourraient jouer les mucines et particulièrement Muc2 dans le développement de tumeurs colorectales.

Morphologiquement, les cellules en gobelet des souris *Muc2*<sup>-/-</sup> étaient indétectables, mais des produits spécifiques des cellules en gobelet (comme l'Intestinal Trefoil Factor « TFF ») étaient décelés, indiquant que cette lignée cellulaire était intacte mais difficilement reconnaissable morphologiquement, du fait de l'absence de Muc2.

Parallèlement, cette étude a montré une augmentation de la prolifération, une diminution de l'apoptose et une augmentation de la migration des cellules épithéliales intestinales le long des cryptes coliques et des villosités de l'intestin grêle.

Le rôle de « suppression de tumeur de Muc2 » n'est pas encore très bien compris. Plusieurs hypothèses ont été émises [161] :

- ✓ Cette fonction pourrait être le résultat de l'altération de la protection et lubrification de la surface intestinale, causant la colonisation du tractus intestinal par différentes flores microbiennes, dont certaines pourraient avoir des effets pro-carcinogènes.
- ✓ Il est possible que la libération de TFFs ou d'autres produits spécifiques aux cellules en gobelet qui sont normalement séquestrés par le gel de mucus, stimulent un phénotype de cicatrisation qui est également pro-carcinogène.

- ✓ Le gel de mucus, fortement diminué dans ces souris *Muc2*<sup>-/-</sup> pourrait être une barrière de protection contre des carcinogènes alimentaires.
- ✓ Les voies de signalisation dépendant de *Muc2* par son contact avec les mucines membranaires pourraient contribuer à la différenciation et la prolifération de l'épithélium. Cette signalisation serait compromise par l'absence de *Muc2*.

De plus, Yonezawa et ses collaborateurs [191, 192] ont montré dans deux études qu'une forte expression de MUC2 dans des tumeurs pancréatiques et biliaires était associée à un faible pouvoir invasif, une faible malignité et un meilleur pronostic que les tumeurs n'exprimant pas MUC2.

MUC2 aurait ainsi un rôle protecteur majeur lors de la carcinogénèse colique qu'il serait intéressant d'explorer.

### **7.3.2. Cas de la mucine sécrétée MUC5AC**

MUC5AC, principale mucine gastrique, est exprimée à la surface de l'épithélium de l'estomac, mais pas dans le côlon normal [193] (à l'exception du côlon fœtal [194]).

En 1980, Bara *et al.* ont développé un anticorps dirigé contre l'antigène de mucines gastriques. Cet antigène est appelé M1[195].

La présence de l'antigène M1 à la surface des cellules à mucus gastriques était très similaire à celle de la mucine MUC5AC. En outre, en 1991, 1998 et 2004, Bara *et al* [196-198] ont montré que les épitopes de l'antigène M1 dérivent de l'apomucine des mucines gastriques et que l'anticorps anti-M1 reconnaît une protéine dérivant de la région C-terminale du gène de MUC5AC. Ainsi, l'antigène M1 est un produit de cette mucine et peut lui être associé par l'appellation M1/MUC5AC. Leurs études ont démontré que l'antigène M1/MUC5AC est exprimé comme antigène oncofœtal dans la muqueuse du côlon humain. En effet, on ne le retrouve que lors des cancers et dans les côlons fœtaux humains durant les 6 premiers mois de grossesse [194].

L'anti- M1/MUC5AC marque les cellules à mucus de la surface de l'épithélium gastrique mais pas la muqueuse normale du côlon. Par contre une expression *de novo* de



MUC5AC est souvent observée lors de l'évolution des cancers du côlon [183, 199-201], avec une forte expression dans les adénomes, mais également dans les cancers mucineux (expression plus importante comparée aux cancers non-mucineux) [202, 203].

L'expression de la mucine MUC5AC dans les adénocarcinomes diminue avec l'augmentation du degré de dysplasie comme le prouvent Bara *et al* avec 66% des adénomes étudiés marqués, contre 12-29% des adénocarcinomes [195, 204]. De plus, l'expression de M1/MUC5AC était retrouvée plus fréquemment dans les adénomes villositaires que tubulaires et rarement dans les adénomes à forte dysplasie [204].

#### ***7.3.2.1. Expression de novo de MUC5AC***

Les mécanismes moléculaires responsables de l'expression aberrante de MUC5AC dans le cancer colique ne sont pas connus et beaucoup d'auteurs s'essaient à des études sur ce sujet. Park *et al* [202] ont montré une corrélation positive entre le niveau de MUC5AC et le niveau d'instabilité de microsatellites. De leur côté, Losi *et al* [203] ont observé une corrélation entre la présence de MUC5AC dans le cancer colorectal et l'absence de la protéine MLH1 réparatrice de l'ADN, par des méthodes de localisation immunohistochimique, mais aucune explication n'a encore été émise à ce sujet.

## III - La leptine

### Introduction

En 1994, l'équipe de Friedman a cloné le gène *ob* dont la mutation est responsable à l'état homozygote de l'obésité des souris *ob/ob* [205, 206]. Le gène *ob* a été localisé sur le chromosome 6 chez la souris et sur le chromosome 7 chez l'homme [207]. Il comprend trois exons et deux introns (figure 16). Les exons sont transcrits en un ARNm de 4,5 kb chez la souris et de 3,5 kb chez l'homme [205, 208]. Le gène *ob* a été également cloné chez le singe [209], le porc [210] et le poulet [211].

Ce gène code pour une protéine circulante, appelée leptine (du mot grec *leptos*, signifiant mince). La protéine est une hormone peptidique dont la séquence est fortement conservée parmi différentes espèces chez les mammifères [205]. La structure de la leptine et de son récepteur est très proche de celle des cytokines de la famille de l'interleukine (IL)-6 et de leurs récepteurs. La leptine régule le poids corporel en diminuant l'appétit et en augmentant les dépenses énergétiques [212].

Après traduction, la protéine de 18 kDa (167 aa chez la souris, 166 aa chez l'homme) perd un peptide signal de 2kDa (21 aa) en libérant dans la circulation une forme de 16 kDa, ne subissant aucune modification post-traductionnelle (figure 17). Une forme de 19kDa a été aussi identifiée dans des extraits gastriques de rat mais ses caractéristiques moléculaires et fonctionnelles restent encore inconnues [213]. La protéine *ob* a la structure d'une cytokine, composée de quatre hélices alpha et de deux courts feuilletts bêta [214].

La partie N-terminale de la protéine est indispensable à l'activité biologique de la leptine. Elle comporte un pont disulfure entre les cystéines 96 et 146, qui serait important pour la sécrétion, la stabilité et la solubilité de la leptine [215].

La leptine circulante est un monomère ; elle pourrait exister aussi sous forme de dimère ou de tétramère. La leptine est présente sous forme libre ou liée à des protéines encore mal connues.

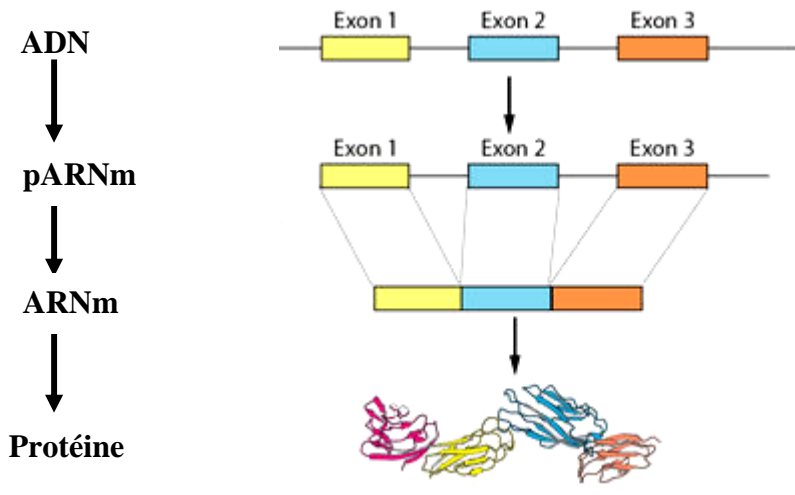


Figure 16: le gène ob

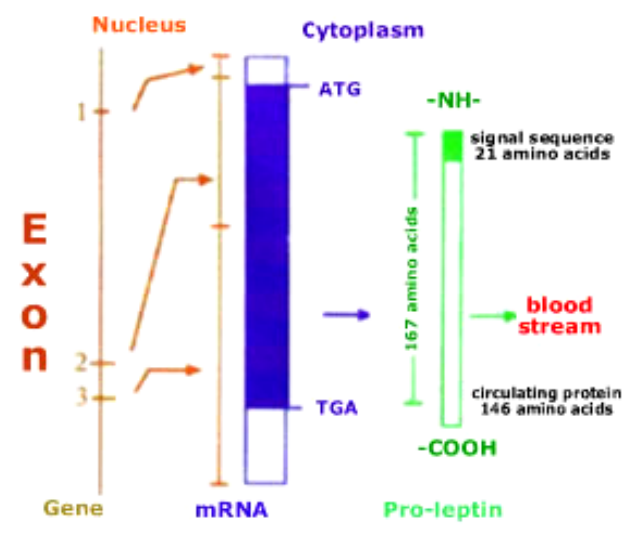


Figure 17: La leptine

### **III.1. Sites de production**

Cette protéine de 16 kDa est produite principalement par le tissu adipeux et agit par des mécanismes centraux pour contrôler l'équilibre énergétique. Outre le tissu adipeux, d'autres organes dont le placenta, le foie, les muscles squelettiques, et l'estomac sécrètent également la leptine. Lors d'inflammation, l'épithélium colique est également un site de production de la leptine [5, 213].

Au niveau gastrique, les cellules immunoréactives à la leptine ont été localisées dans l'épithélium glandulaire, exclusivement dans le fond des glandes fundiques chez le rat. Une telle localisation correspond à la distribution des cellules principales qui synthétisent et sécrètent le pepsinogène [216]. Chez l'homme, les cellules principales gastriques sécrètent également la leptine [217, 218]. Récemment, Cammisotto et al ont également décrit la présence de leptine dans des cellules endocrines gastrique [219]. La leptine gastrique pourrait donc être libérée à la fois de façon endocrine et exocrine, dans la lumière gastrique. Cette sécrétion est contrôlée par des facteurs nerveux et hormonaux activés par le repas tels que les hormones gastriques (pentagastrine, sécrétine), la cholécystokinine et la prise alimentaire [216, 219]. La leptine gastrique est cependant sécrétée principalement dans la lumière gastrique où elle est protégée de la digestion par une forme soluble des récepteurs [220]. La leptine luminale est ainsi résistante à un pH bas (de l'ordre de 2) et peut atteindre l'intestin sous forme active pour contrôler diverses fonctions [216]. La mise en évidence de la leptine gastrique et de ses récepteurs dans l'estomac et l'intestin suggèrent un rôle de la leptine dans le contrôle des fonctions gastrointestinales [216].

### **III.2. Récepteurs de la leptine**

Le récepteur de la leptine (Ob-R), codé par le gène *db*, est rattaché, de par sa structure, aux récepteurs des cytokines de type I. C'est un récepteur à un seul domaine transmembranaire. La partie intracellulaire du récepteur ressemble plus particulièrement à la chaîne gp130 (figure 17), l'un des composants des récepteurs de l'IL-6, l'IL-12, l'IL-15, du G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) et du LIF (leukemia inhibitory factor), l'oncostatine M et la prolactine ou l'hormone de croissance qui appartiennent elles-aussi au groupe 1 des cytokines, à longue chaîne hélicoïdale [221].

### III.2.1. Les différentes isoformes (Figure 18)

Plusieurs isoformes ont été décrites (ob-Ra à ob-Rf) ; toutes issues d'un épissage alternatif. Elles se distinguent entre elles par la longueur de leur domaine intracytoplasmique.

Ces isoformes, sont classées en 3 groupes [215, 221-223]

- **L'isoforme longue**, Ob-Rb, comporte une partie intracellulaire de 302 aa, contenant des motifs peptidiques nécessaires à l'activation de signaux de transduction, ces derniers étant partiellement délétés dans les quatre isoformes courtes Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd et Ob-Rf [221].
- **Plusieurs isoformes courtes** existent, Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd et Ob-Rf, caractérisés par un domaine cytoplasmique de 34 acides aminés. Ob-Ra est l'isoforme le plus abondamment exprimé (ubiquitaire).
- Il existe enfin **une forme sécrétée** souvent glycosylée [224]. L'isoforme courte Ob-Re qui ne possède pas de domaine transmembranaire, et peut se lier à la leptine circulante. En effet, la leptine circule dans le plasma sous une forme libre et une forme liée. Cette isoforme joue probablement un rôle dans l'inactivation de la leptine circulante et son transport [219].

Les récepteurs Ob-R ont été localisés dans le système nerveux central et périphérique [212]. Dans ce dernier, les isoformes courtes du récepteur sont plus fortement exprimées que l'isoforme longue Ob-Rb, par opposition à l'hypothalamus où l'isoforme longue est majoritairement exprimée [225].

En périphérie, les isoformes courtes, tout comme l'isoforme longue Ob-Rb, présentent une distribution ubiquitaire, avec une forte expression de Ob-Rb dans le poumon, la rate, le rein et une plus faible expression dans le tissu adipeux, les organes reproducteurs, le placenta, le coeur, les ganglions lymphoïdes..Etc [226-228].

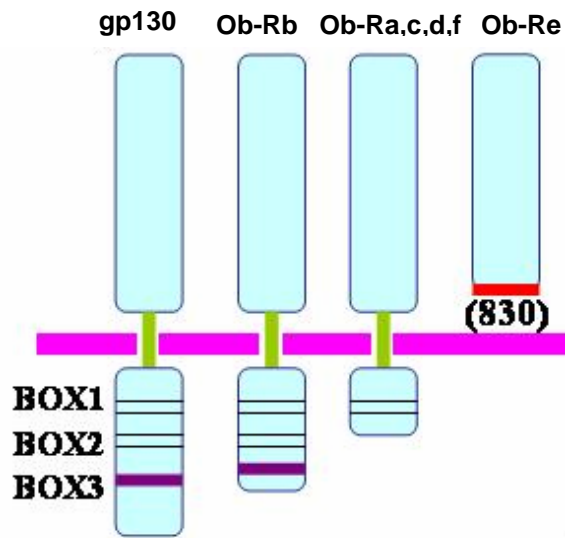


Figure 18 : Différentes isoformes des récepteurs de la leptine  
(www.tmd.ac.jp)

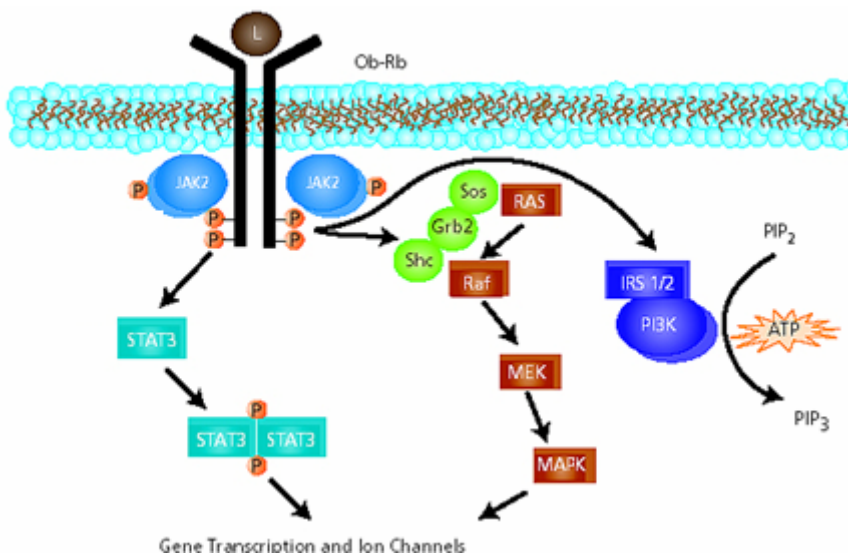


Figure 19 : Leptine et voies de signalisation  
(Harvey and Ashford, *Neuropharmacology*, **44**, 947-849 (2003)).

### III.2.2. Voies de signalisation intracellulaire (figure 19)

Jusqu'à ce jour plusieurs voies de transduction apparaissent activées par la liaison de la leptine à son récepteur : Celle des JAK-STAT (Janus kinases-signal transducers and activators of transcription) et celle des MAPK (mitogen-activated protein kinase) avec activation des kinases ERK « extracellular Regulated Kinase » et p38 MAPKinase. D'autres voies de transduction du signal sont également impliquées, en particulier la voie de la Phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3K), la voie de l'Insuline receptor substrate 1 (IRS1) et la voie de la Protéine Kinase C (PKC) [229,230]

Ces voies de transduction du signal sont comparables à celles rapportés pour différentes cytokines. Le récepteur de la leptine, comme les autres récepteurs de cytokines de type I, ne possède pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. Le récepteur Ob-Rb est considéré classiquement comme l'isoforme impliqué dans la signalisation. Ob-Rb requiert donc l'activation de tyrosines kinases associées au récepteur, de la famille Janus (JAK), en particulier JAK2, qui vont, par la suite, phosphoryler et activer les facteurs de transcription STAT (« signal transducers and activators of transcription »). Pour cela, la partie cytoplasmique du récepteur Ob-Rb contient deux motifs peptidiques, Box1 et Box2, qui interagissent classiquement avec les protéines JAK. Seul Box1 est conservé chez les différentes isoformes transmembranaires. L'isoforme Ob-Rb possède également un site Box3 de liaison de STAT3 (figure 20).

Les protéines STAT, après homodimérisation et translocation dans le noyau, induisent l'expression de différents gènes spécifiques. La leptine induit l'activation des STAT 1, 3, 5 et 6 dans différentes lignées cellulaires [231-234]. Dans la lignée épithéliale intestinale humaine CaCO-2, la leptine active les STAT3 et 5 [235]. *In vivo*, l'injection de leptine à dose physiologique engendre une activation des STAT 1, 3 et 5 dans l'intestin chez les souris normales et ob/ob, mais pas chez les souris db/db présentant un récepteur Ob-Rb non fonctionnel [235]. De plus, *via* l'activation de JAK2, la leptine induit la phosphorylation d'autres protéines telles que ERK ou IRS (insulin-receptor substrate) qui activent les phosphatidylinositol-3 kinases [229-231].

La leptine est également capable d'activer plusieurs classes de MAPK notamment : Erk (extracellular-regulated kinase) et JNK-SAPK (NH<sub>2</sub>-terminal c-jun kinase/stress-activated

protein kinase) [231]. Il a été montré que la leptine augmente l'activité MAP-kinase *in vitro* dans les lignées murines embryonnaires C3H10T1/2 et dans les lignées de cellules bêta du pancréas [236]. Dans la lignée intestinale STC1 et dans la lignée colique HT-29, la leptine peut induire les protéines kinases p42/44 qui appartiennent à la famille des MAPK [237, 238].

Enfin, la leptine est capable d'activer la famille des protéines kinase, notamment les PKA et PKC. Il a été montré que la leptine active la voie classique de la PKC dans le jéjunum du rat et dans les entérocytes pour ainsi inhiber le transport de glucose et de galactose *via* SGLT1 [239, 240].

### **III.2.3 – Localisation des récepteurs de la leptine dans le tractus gastrointestinal**

Des récepteurs de la leptine ont été identifiés au niveau de l'ensemble du tractus digestif, notamment dans l'estomac (cellules épithéliales et fibres afférentes vagales) ainsi que dans l'intestin au niveau du pôle apical et basolatéral des cellules épithéliales intestinales et coliques et dans la *lamina propria* (granulocytes et macrophages). La présence de ces récepteurs le long de l'intestin et leur localisation à l'apex des entérocytes [217, 218, 241, 242] suggèrent un rôle de la leptine digestive dans le contrôle des fonctions intestinales. La leptine gastrique gagnerait ainsi l'intestin où elle interagit avec ses récepteurs pour contrôler les différentes fonctions de l'épithélium intestinal [216].



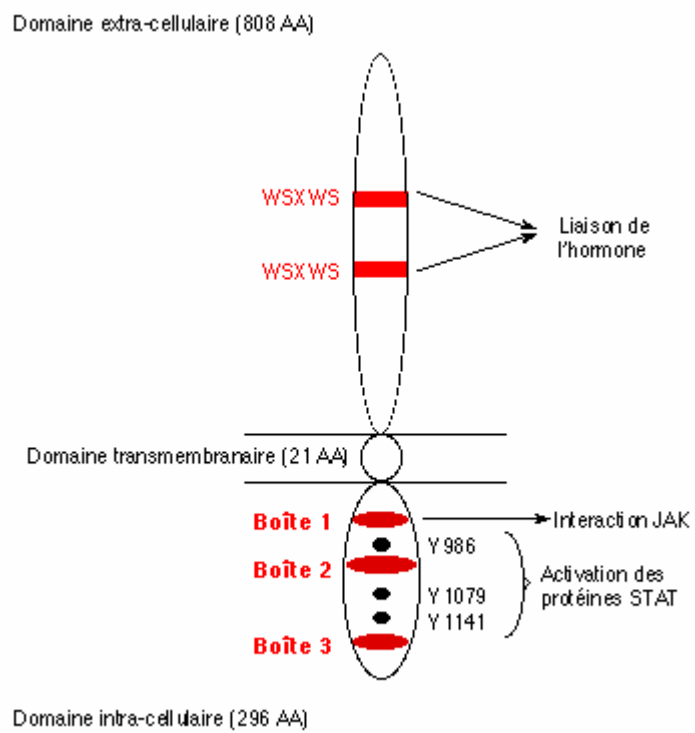


Figure 20: le récepteur long Ob-Rb  
 (www.inra.fr/.../an2001/num213/cassy/sc213.htm.)

### **III.3. Rôle de la leptine**

#### **III.3.1 - Leptine et prise alimentaire**

La fonction essentielle de la leptine consiste en effet en la régulation de la prise alimentaire, principalement par ses effets sur l'hypothalamus. Des taux élevés de leptine signalent la présence de stocks énergétiques suffisants au système nerveux central, qui répond en réduisant l'appétit et en augmentant les dépenses énergétiques, prévenant ainsi une obésité sévère. Un déficit génétique en leptine (exemple des souris *ob/ob*) ou en son récepteur (cas des souris *db/db*, résistantes à la leptine) conduit à une obésité extrême, liée à une prise alimentaire excessive et un défaut de dépense énergétique [243, 244]. Néanmoins, ces souris présentent également des anomalies marquées, secondaires aux effets de la leptine sur la reproduction, l'hématopoïèse, l'angiogénèse, la sécrétion d'insuline, les métabolismes osseux, lipidique et glucidique. De telles altérations sont de plus décrites lors des déficits congénitaux en leptine chez l'homme. Ainsi, les mutations du gène *Ob*, se caractérisent par une hyperphagie, une obésité, un hypogonadisme hypothalamique et une fertilité altérée [245]. La leptine est donc une molécule pléiotropique, jouant un rôle important dans la régulation des fonctions endocrines et des fonctions métaboliques [222, 244].

#### **III.3.2 - Régulation des réponses immunitaires**

Plus récemment a été découvert le rôle de la leptine dans l'immunité. Ainsi, une altération des réponses immunitaires et une susceptibilité aux infections ont été rapportées chez les animaux déficients en leptine ou en son récepteur, chez les sujets déficients en leptine ainsi que lors des situations de malnutrition, où l'on observe des taux faibles de leptine [244-246]. Dans ce dernier cas la leptine semble être un signal pour l'adaptation à l'état de jeûne, permettant de conserver l'énergie pour les muscles et l'activité cérébrale [244, 247]. De plus, plusieurs études ont montré une augmentation des taux circulants de leptine au cours de certaines infections bactériennes ou de réactions inflammatoires. Ainsi, les taux de leptine sont augmentés sous l'action de différents médiateurs de la phase aiguë de l'inflammation tels que le  $TNF\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1 ou après stimulation par le LPS [246]. Ces résultats suggèrent un rôle de la leptine dans les mécanismes de défense de l'hôte.

En effet, au cours du jeûne, une diminution brutale du nombre de calories absorbées provoque une diminution rapide des taux sériques de leptine, accompagnée d'une atrophie thymique, réversible avec l'administration de leptine [246]. De plus, les souris ob/ob, déficitaires en leptine, présentent également un thymus de petite taille, renfermant de nombreux thymocytes apoptotiques. Cette atrophie thymique affecte le cortex du thymus, où se trouvent la plupart des thymocytes double positifs CD4+, CD8+, et l'apport de leptine permet de réduire le taux d'apoptose de ces cellules [248]. La leptine apporterait donc un signal de survie aux thymocytes durant la maturation des lymphocytes T. Elle exerce également des effets anti-apoptotiques sur les cellules T matures. Ces effets peuvent résulter de son aptitude à augmenter l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X, qui protègent les cellules T et les thymocytes de l'apoptose [246, 249].

### **III.3.2.1 - Rôle dans la prolifération et l'activation lymphocytaire T**

L'addition de concentrations physiologiques de leptine lors d'une réaction lymphocytaire mixte (LMR) induit une prolifération dose dépendante des lymphocytes T CD4+. Néanmoins, la leptine présente des effets différents sur la prolifération et la production de cytokines par les cellules T. Ainsi, la leptine augmente la prolifération et la sécrétion d'IL-2 par les cellules T naïves alors qu'elle possède de très faibles effets sur la prolifération des cellules T mémoires, voire un effet inhibiteur [246, 249]. La leptine augmente également l'expression de molécules d'adhérence à la surface des lymphocytes T CD4+, telles que « Intercellular adhesion molecule 1 » (ICAM1) ou « very late antigen 2 » (VLA2), pouvant permettre l'activation et la migration des cellules immunitaires vers les sites de l'inflammation [244, 246].

Enfin, la leptine induit une polarisation Th1 des réponses immunitaires. En effet, elle augmente la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  par les lymphocytes T, conduisant de ce fait à une augmentation de la production d'IgG2 $\alpha$  par les cellules B, des réactions d'hypersensibilité retardée et de l'activation des macrophages. A l'inverse, elle inhibe les réactions de type Th2, diminuant ainsi la production d'IL-4 et d'immunoglobulines d'isotype IgG1 [244, 246, 249].

Les souris ob/ob présentent une diminution de sécrétion d'IL-2, d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-18, associée à une production augmentée de cytokines de type Th2, telles que l'IL-4 et

l'IL-10. Ces souris sont résistantes à l'induction expérimentale de différentes maladies auto-immunes [246, 249].

### **III.3.2.2 - Rôle dans la production d'hormone de croissance par les lymphocytes**

La leptine possède un autre mécanisme d'action sur les cellules immunitaires. Elle peut en effet stimuler la production d'hormone de croissance (GH) par les lymphocytes du sang périphérique, par des mécanismes dépendants de la protéine kinase C et de l'oxyde nitrique. Les lymphocytes expriment en effet des récepteurs pour la GH à leur surface et produisent eux-mêmes cette hormone [250]. La GH joue un rôle important dans le développement et la régulation du système immunitaire. Ce rôle s'exerce en particulier sur les lymphocytes T. En effet, la GH intervient dans le développement des lymphocytes T au niveau du thymus [251]. Elle régule également l'adhésion et la migration des lymphocytes T. Par ailleurs, *in vitro*, elle potentialise la prolifération et la réponse cytokinique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> aux antigènes dont ils sont spécifiques [251]. La leptine augmente l'expression du récepteur de la GH à la surface des lymphocytes, potentialisant ainsi les effets biologiques de la GH sur ces cellules [250]. La leptine pourrait donc réguler les réponses immunitaires en induisant la production locale de GH par les lymphocytes.

En conclusion, la leptine joue un rôle majeur dans la régulation de l'immunité, permettant de maintenir une réponse immunitaire optimale et de protéger ainsi les individus des infections. Néanmoins elle est également impliquée dans la physiopathologie de l'inflammation et des maladies auto-immunes.

### **III.3.3 - Rôle de la leptine au cours de certaines maladies inflammatoires intestinales**

Du fait que la leptine exerce un effet régulateur négatif sur la prise alimentaire et positif sur la thermogénèse, la question d'une contribution de la leptine dans l'anorexie et l'hypermétabolisme accompagnant les maladies infectieuses et inflammatoires, a été soulevée. L'emploi de modèles physiopathologiques murins d'inflammation intestinale a permis de mesurer la leptinémie aux différents stades de l'inflammation. Une hyperleptinémie est induite chez le rat à jeun lors du stade précoce d'une colite induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS). Cette hyperleptinémie était corrélée avec le degré de l'inflammation et associée à une anorexie. Des concentrations élevées de leptine plasmatique ont également été

mises en évidence au cours de l'iléite ulcéreuse aiguë induite par l'indométhacine et lors d'un choc endotoxinique, ce qui suggère un rôle pro-inflammatoire de la leptine dans les maladies inflammatoires intestinales [252].

Très récemment, deux travaux ont montré que les souris ob/ob étaient plus sensibles à l'effet létal du TNF ou du LPS que leurs congénères normales, suggérant que la leptine est impliquée dans des mécanismes de protection de l'organisme lors d'une réponse inflammatoire [253, 254]. Enfin, l'étendue des lésions aiguës muqueuses gastriques, obtenues par instillation intragastrique d'éthanol chez le rat, est réduite par une injection intra-péritonéale de leptine ou de CCK. Cet effet protecteur serait en partie dû à une accélération du flux sanguin gastrique [255].

Anorexie, augmentation de la dépense énergétique et perte de poids sont des arguments cliniques en faveur d'un rôle de la leptine dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Trois études ont mesuré la leptinémie chez ces malades sans obtenir de résultats concluants, du fait des difficultés inhérentes aux analyses de résultats provenant de populations hétérogènes vis-à-vis des indices de masse corporelle, des degrés de sévérité et stades de la maladie ou des différents traitements (tels que stéroïdes) qui peuvent altérer l'expression de la leptine [256-258]. Néanmoins, une augmentation de la leptinémie a été observée chez des malades dénutris et atteints de rectocolite hémorragique [257]. Chez des malades présentant une gastrite associée à *Helicobacter pylori*, une augmentation des concentrations gastriques de leptine a été détectée. Elle pourrait contribuer à l'anorexie et la perte de poids et participer au maintien du processus inflammatoire [259].

Enfin, chez les sujets obèses, non déficients en leptine, les taux élevés de leptine reflète une résistance à la leptine, provoquée par une down-régulation du récepteur Ob-R. Ceci pourrait conduire à une dérégulation immunitaire et à une altération de la balance Th1/Th2, entraînant une susceptibilité aux infections et une réponse inflammatoire anormale. L'obésité est en effet considérée comme un état pro-inflammatoire, étant associée à une infiltration progressive des tissus adipeux par des macrophages, qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6). Ces dernières vont stimuler les adipocytes pour sécréter davantage de leptine et de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$  [249].

### **III.3.4 - Au niveau de l'estomac**

La leptine gastrique agit localement dans l'estomac en activant les afférences vagues viscéro-sensitives pour produire des signaux de satiété qui sont intégrés et traités dans le système nerveux central. Cette action locale de la leptine gastrique amplifierait l'action des récepteurs de la CCK expliquant ainsi l'effet synergique de la leptine et de la CCK sur l'induction précoce de la satiété à partir des neurones du faisceau du tractus solitaire [216, 260]. Cette action synergique est renforcée par la capacité de la leptine à augmenter les concentrations circulantes de CCK en activant sa sécrétion à partir des cellules endocrines I duodénales [261]. Ainsi, dans les conditions physiologiques, la leptine gastrique pourrait «autopotentialiser» sa propre action sur la prise alimentaire en libérant la CCK, un puissant peptide anorexigène [262].

La leptine est également impliquée dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium gastrique et dans la gastroprotection. Des expériences réalisées chez le rat ont permis de montrer que la leptine sécrétée dans l'estomac protège la muqueuse gastrique de l'induction de lésions par l'éthanol. Cette protection passerait par un mécanisme dépendant du NO [263, 264].

### **III.3.5 - Au niveau de l'intestin**

La leptine gastrique gagne l'intestin où elle interagit avec ses récepteurs pour contrôler les fonctions d'absorption et de sécrétion de l'épithélium intestinal.

#### **III.3.5.1. Facteur d'absorption**

- L'intestin est le site principal de l'absorption des nutriments. L'absorption des résidus protéiques est assurée par un transporteur dépendant des protons, PepT1, localisé dans la bordure en brosse. Il a été démontré chez le rat *in vivo* que l'administration de leptine dans la lumière jéjunale augmente l'absorption des di- et tripeptides *via* PepT1. Cette action de la leptine gastrique constituerait un nouveau mécanisme par lequel la leptine contrôlerait les réserves énergétiques [241].

- L'absorption des monosaccharides est une fonction intestinale essentielle. Après le repas, le transport d'une molécule de glucose est couplé à celui de deux ions sodium par le transporteur sodium-glucose, SGLT-1 situé dans la bordure en brosse de l'entérocyte. L'activité de ce transporteur présent tout au long du tube digestif, est la cible d'une régulation importante [239, 240]. Ducroc et al ont montré en utilisant la chambre d'Ussing que c'est la leptine luminale qui inhibe rapidement l'entrée de glucose dans les entérocytes de rat *via* SGLT1 [239]. Inigo et al ont également étudié le rôle de la leptine gastrique dans la régulation de l'activité de SGLT1. Ils ont démontré que la leptine luminale diminue l'absorption de glucose *via* SGLT1 *in vivo* chez le rat [265]. Cet effet inhibiteur de la leptine est accompagné d'une diminution de la quantité de SGLT1 sur la bordure en brosse des entérocytes et dépend de l'activation de la protéine kinase C (PKC). La leptine gastrique joue donc un rôle essentiel dans la régulation de transport glucidique intestinal [239, 240].
- Dans la lumière du côlon, les fibres alimentaires sont dégradées par fermentation bactérienne en acides gras à chaîne courte principalement en butyrate, propionate, et en acétate. Il a été démontré que la leptine, appliquée au pôle apical des cellules coliques Caco-2, est capable d'augmenter l'absorption du butyrate (source majeur d'énergie pour le colonocyte) *via* le transporteur de monocarboxylates de type 1 (MCT-1) par des mécanismes mettant en jeu une augmentation du pool intracellulaire de MCT-1 [216].

### **III.3.5.2. Facteur de sécrétion d'hormones intestinales**

Une étude réalisée à l'aide de la lignée entéroendocrine STC1 a montré que la leptine stimule la sécrétion de la cholécystokinine [247]. La leptine induit également la libération de GLP-1 (hormone produite par les cellules L) *in vivo* chez le rat, ainsi que dans des lignées cellulaires murines (GLUTag) et humaine (NCI-H716) [266]. Une synergie de la leptine et du GLP-1 (glucagon-like peptide-1) a été également rapportée dans la régulation de la prise alimentaire [267].

En conclusion, la leptine luminale est capable d'agir au niveau intestinal et ainsi de contrôler diverses fonctions, notamment les fonctions des entérocytes et des cellules entéroendocrines. En revanche, rien n'a été décrit concernant l'effet de la leptine luminale sur les cellules caliciformes qui représentent une autre population majeure de l'épithélium intestinal.



# **Etudes expérimentales**

# **La leptine luminale stimule la sécrétion des mucines par les cellules en gobelet**

## **La leptine luminale stimule la sécrétion des mucines par les cellules en gobelet**

### **Résumé :**

Il a été suggéré que la leptine pouvait être impliquée dans les lésions tissulaires et/ou dans les mécanismes de défense de la muqueuse. Dans cet article, nous avons étudié les effets de la leptine sur la sécrétion de mucus et sur l'expression de la principale mucine sécrétée, la mucine 2 (rMuc2) dans le côlon de rat.

Des rats Wistar et des souris ob/ob ont été utilisés. La sécrétion du mucus a été suivie *in vivo* dans le modèle d'anse colique de rat perfusée *in situ*. La sécrétion de mucus a été mesurée par ELISA, et l'expression de rMuc2 a été suivie par PCR en temps réel. Les effets de la leptine seule ou en association avec les inhibiteurs de la protéine kinase C (PKC) et du phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) ont été également déterminés sur la sécrétion de mucines par la lignée mucosécrétante humaine HT29-MTX.

La leptine a été détectée dans la lumière du côlon de rat à des taux importants. La perfusion luminale de leptine a stimulé la sécrétion des mucines par les cellules en gobelet chez le rat *in vivo* de façon dose dépendante. La Leptine (10 nmol/l) a augmenté la sécrétion de mucus d'un facteur de 3.5 par rapport aux anses contrôles et a doublé le niveau des transcrits codant rMuc2 dans la muqueuse colique.

Les souris ob/ob déficientes en leptine ont les cellules caliciformes anormalement remplies de mucus. Dans la lignée HT29-MTX qui exprime le récepteur de la leptine, la sécrétion de mucines induite par la leptine, met en jeu les voies de signalisation de la PKC et de la PI3-Kinase.

C'est la première fois qu'il est démontré que la leptine luminale régule la fonction des cellules en gobelet sécrétrices de mucus. Le mucus est une barrière protectrice qui permet à l'épithélium gastrointestinal de faire face à des conditions agressives de nature chimique, mécanique ou bactérienne. Nos données pourraient être importantes pour mieux comprendre les mécanismes de défenses mis en jeu dans la muqueuse colique.

## Luminal leptin activates mucin-secreting goblet cells in the large bowel

Pascale Plaisancie,<sup>3,4,5</sup> Robert Ducroc,<sup>1,2</sup> Mahmoud El Homsy,<sup>3,4</sup> Annick Tsocas,<sup>1,2</sup>  
Sandra Guilmeau,<sup>1,2</sup> Sandra Zoghbi,<sup>3,4</sup> Olivier Thibaudeau,<sup>2</sup> and Andre Bado<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U773, Centre de Recherche Bichat Beaujon CRB3, BP 416, F-75018, Paris, France; <sup>2</sup>Université Paris 7 Denis Diderot, site Bichat, BP 416, F-75018, Paris, France; <sup>3</sup>INSERM, U45 and <sup>4</sup>Faculté de Médecine, Université Claude Bernard, Lyon, France; and <sup>5</sup>INRA, Laboratoire d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif, Jouy-en-Josas, France

Submitted 14 September 2005; accepted in final form 10 November 2005

Plaisancie, Pascale, Robert Ducroc, Mahmoud El Homsy, Annick Tsocas, Sandra Guilmeau, Sandra Zoghbi, Olivier Thibaudeau, and Andre Bado. Luminal leptin activates mucin-secreting goblet cells in the large bowel. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G805–G812, 2006; doi:10.1152/ajpgi.00433.2005.—Leptin has been suggested to be involved in tissue injury and/or mucosal defence mechanisms. Here, we studied the effects of leptin on colonic mucus secretion and rat mucin 2 (rMuc2) expression. Wistar rats and *ob/ob* mice were used. Secretion of mucus was followed in vivo in the rat perfused colon model. Mucus secretion was quantified by ELISA, and rMuc2 mRNA levels were quantified by real-time RT-PCR. The effects of leptin alone or in association with protein kinase C (PKC) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors on mucin secreted by human mucus-secreting HT29-MTX cells were determined. Leptin was detected in the rat colonic lumen at substantial levels. Luminal perfusion of leptin stimulates mucus-secreting goblet cells in a dose-dependent manner in vivo in the rat. Leptin (10 nmol/l) increased mucus secretion by a factor of 3.5 and doubled rMuc2 mRNA levels in the colonic mucosa. There was no damage to mucosa 24 h after leptin, but the number of stained mucus cells significantly increased. Leptin-deficient *ob/ob* mice have abnormally dense mucus-filled goblet cells. In human colonic goblet-like HT29-MTX cells expressing leptin receptors, leptin increased mucin secretion by activating PKC- and PI3K-dependent pathways. This is the first demonstration that leptin, acting from the luminal side, controls the function of mucus-secreting goblet cells. Because the gel layer formed by mucus at the surface of the intestinal epithelium has a barrier function, our data may be relevant physiologically in defence mechanisms of the gastrointestinal tract.

rat mucin 2; mucus; *ob/ob*; protein kinase C; phosphatidylinositol 3-kinase; leptin receptor; intestinal defence

LEPTIN, the hormone encoded by the *ob* gene (45), is now considered to be multifunctional, not just regulating food intake and energy expenditure (32) but also neuroendocrine function (16), nutrient absorption (8, 13, 30), cell proliferation (19), and angiogenesis (35). This multifunctional role of leptin is consistent with the production of this hormone by various tissues and organs (17, 28), including the stomach (3, 38). Stomach-derived leptin is mostly secreted in gastric juice; it then enters the intestine, where it regulates intestinal biological functions (8, 9, 13, 18).

The biological effects of leptin are mediated by its receptor (Ob-R), which belongs to the gp130 family of cytokine receptors (25, 41). Several Ob-R isoforms generated by alternative splicing of the *db* Ob-R gene have been identified (25). Leptin has recently been shown to be involved in inflammation and immunomodulation. This is consistent with the structural and functional similarities observed between leptin and the interleukin (IL)-6 family of cytokines (44). Ob-R also has signaling

capabilities similar to those of IL-6-type cytokine receptors (41), and there are indications that leptin may be linked to inflammatory conditions. Indeed, it has been suggested that leptin upregulates the inflammatory immune response (27). Leptin-deficient *ob/ob* mice have been reported to be resistant to colonic inflammation induced by oral dextran sulphate sodium or trinitrobenzene sulfonic acid, and leptin replacement in *ob/ob* mice renders these mice susceptible to such inflammation (34). Subsequent data from studies (7, 15, 29) using different experimental models of inflammation have indicated a proinflammatory role for leptin. This contrasts with the results of a study (39) suggesting the involvement of leptin in the protective mechanisms that allow an organism to cope with potentially autoaggressive effects of its immune system. In this line, leptin has been shown to exert gastroprotective effects by accelerating the healing of ethanol-induced gastric ulcers (14, 24). Furthermore, exogenous leptin has been shown to reduce the severity of acetic acid-induced colitis in rats (11). Thus it seems that, in certain conditions, leptin act as an anti-inflammatory and/or protective agent. However, it is unknown whether leptin directly modulates defence mechanisms within the gastrointestinal mucosa.

In this study, we investigated whether leptin in the colonic lumen modulated the expression of mucin and the secretion of mucus, a major component of physiological defence mechanisms that is produced by mucin-secreting cells. We assessed the effects of leptin on mucus secretion and on rat mucin 2 (rMuc2) expression in the in vivo rat colon model and in vitro in HT29-MTX human colonic goblet-like cells.

### MATERIALS AND METHODS

**Animals.** Male Wistar rats weighing 220–240 g (Charles River Laboratories; L'Arbresle, France) and 6- to 8-wk-old female leptin-deficient (C57BL/6J *ob/ob*) mice and their wild-type lean littermates (Elevage Janvier; Le Genest, France) were caged under standard laboratory conditions with tap water and regular food provided ad libitum on a 12:12-h light-dark cycle at a temperature of 21–23°C. Animals were treated in accordance with European Community guidelines concerning the care and use of laboratory animals.

**Anesthetized perfused rat colons.** Rats were fasted for 16 h in wire-mesh cages to avoid coprophagia with water ad libitum. Rats were anesthetized with ethylurethane (1.2 g/kg im, Prolabo; Paris, France). An inflow cannula was inserted 1 cm below the cecum, and the outflow cannula was set up at a distance of 1 cm above the rectum. The colonic segment was flushed with saline solution prewarmed to 37°C to remove residual intestinal contents. It was then continuously perfused at a rate of 1 ml/15 min (Minipuls 2, Gilson; Paris, France)

Address for reprint requests and other correspondence: A. Bado, INSERM U683, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75860 Paris Cedex 18, France (e-mail: bado@bichat.inserm.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

with Krebs-Ringer buffer (pH 7.5) containing (in mM) 120 NaCl, 4.5 KCl, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 0.7 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, and 10 glucose. After a 30-min stabilization period, vehicle (control) or recombinant murine leptin (100 nM) in Krebs-Ringer buffer was perfused for different time periods. At the end of the period, segments were removed, and the luminal content (fluid content + adherent mucus gel) was collected and frozen at -20°C for subsequent determination of mucinlike immunoreactivity and luminal DNA content.

Empty colonic loops were divided into small segments. One part of the colon tissue was stored at -80°C until the determination of DNA content. The other part of the colonic tissue was used for total RNA extraction and for quantification of rMuc2 mRNA by real-time PCR. Finally, some colonic segments were used for histological analysis. They were fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned at 4 μm, stained with alcian blue (AB; pH 2.5) followed by the periodic acid-Schiff (PAS) reaction, and then counterstained with hematoxylin. The AB-PAS method yielded a blue color when mostly acidic mucins were present and a magenta color when mainly neutral mucins were present.

**Real-time PCR.** Total RNA was extracted from colon tissues using TRIzol and reverse transcribed into cDNA as previously described (42). Real-time PCR was performed with the real-time fluorescence detection method (Roche Diagnostics; Meylan, France) using a Light-Cycler System with a FastStart DNA Master SYBR Green I kit. The reaction mixture contained MgCl<sub>2</sub> (80 nmol), forward and reverse primers (8.12 nmol), and LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I Mix (2 μl) in a volume of 10 μl. The reaction mixture was distributed into precooled capillaries, and diluted (1/10) cDNAs or purified and quantified cloned plasmid DNA for mucin (construction of a standard curve) in a volume of 10 μl were added as PCR templates. The cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 amplification cycles at 95°C for 10 s, a touchdown (0.5°C/cycle) annealing from 68 to 60°C for 8 s, and 72°C for 6 s. Real-time monitoring was achieved by measuring the fluorescence at the end of the elongation phase. After the cycling, melting curves of the PCR products were acquired by cooling and maintaining samples at 65°C for 15 s and then by a stepwise increase of the temperature from 65 to 98°C. Primers were as follows: rMuc2, forward 5'-ATTACCCACAGTGGACAA-3' and reverse 5'-GGGATGTCACCAAAAGTT-3' (designed with the assistance of Primer3 computer software); and cyclophilin A, forward 5'-CTTGTCCATGGCAAATGCTG-3' and reverse 5'-GTGATCTTCTTGCTGGTCTTG-3' (12). The expression of rMuc2 was normalized to the cyclophilin A mRNA level in each sample. Results are presented as percentages of the untreated control (means ± SE).

**Leptin determination from luminal contents from the colon.** Normally fed rats and rats that had been deprived of food for 16 h were anesthetized, and blood was collected from the abdominal aorta. Blood was centrifuged, and the plasma was removed and stored at -20°C until a leptin RIA. Rats were killed, and the entire colon from the cecum to the rectum was removed. The colon lumen contents including the feces were collected and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min, and the supernatants were used for a leptin determination by a RIA (RIA kits, Linco Research; St. Charles, MO). Pooled colonic juices from normally fed rats were submitted to size exclusion chromatography using Superdex 200 column (16/60, Pharmacia Biotech; Freiburg, Germany) as previously described. The collected fractions were stored at -20°C until the leptin RIA. The column was adjusted with commercially available calibration proteins kits (Pharmacia Biotech).

**Effect of colonic leptin on mucosa architecture.** In this set of experiments, 16-h food-deprived Wistar rats were slightly anesthetized with pentobarbital sodium (Sanofi Santé Animale; Libourne, France). Then, 3, 10, or 100 nM of recombinant murine leptin or vehicle were slowly administered (volume injected: 1 ml) through a catheter inserted rectally into the colon and positioned 10 cm proximal

to the anus. Animals were killed 24 h after the injection, and food intake, body weight, length of the colon, and macroscopic changes were determined. Segment of the distal colon proximal to the rectum were removed and fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned at 4 μm, and used for histological studies as described above.

A segment was also removed and stored at -20°C for the determination of tissue-associated myeloperoxidase (MPO) activity, which was determined as described previously (10). Protein concentration of the supernatant was determined by using a Bradford assay kit (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA) for calibration.

**Cell culture.** HT29-MTX cells, a human colon carcinoma-derived mucin-secreting goblet cell line (26), and parental HT29 cells were grown in DMEM (Invitrogen; Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% FBS (Sigma; St. Louis, MO) and 100 mg/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen). Cells were grown in plastic 25-cm<sup>2</sup> culture flasks and maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere within a humidified incubator. Media were replaced every 2 days.

**RT-PCR of the leptin receptor.** Briefly, total RNA was extracted from HT29 or HT29-MTX cells using TRIzol according to the manufacturer's instructions. Total RNA was reverse transcribed into cDNA and then amplified with Ob-Rb primers. Forward primer 5'-GCCAACAACCTGGTCTCTC-3' and reverse primer 5'-AGAGAAGCACTGGTGACTG-3' for huB219.1 were designed on the basis of the previously published cDNA sequence for the human Ob-Rb receptor (Accession No. U52914), which defines an amplicon of 246 bp. PCR was performed under the thermocycling conditions as previously described (8). PCR products were analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel in the presence of ethidium bromide.

**Cellular model of mucin secretion.** To study mucin secretion, HT29-MTX cells were seeded in 12-well culture plates (5.10<sup>5</sup> cells/well) and were given fresh media every 2 days. Experiments were performed 21 days after cells reached confluency. Twenty-four hours before the secretory studies, cells were serum deprived. The monolayer cultures of HT29-MTX cells were washed twice with PBS and incubated in serum-free medium with or without leptin at 37°C for 15-60 min in a humidified atmosphere. Supernatants were then collected, frozen, and stored at -20°C. Cells were then processed with trypsin, and cell numbers per well were determined. All experiments were performed at least three times in triplicate.

**ELISA for mucin secretion.** Samples of luminal contents from colonic loops were incubated for 24 h with 100 mM 1,4-dithiothreitol at 4°C for reduction and were then assayed for rat colonic mucins by ELISA as previously described. The secretion of MUC5AC from HT29-MTX cells was measured by ELISA (42) using the primary monoclonal antibody 45M1 (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA). This monoclonal antibody recognizes the peptide core of gastric mucin M1 identified as MUC5AC (4). Porcine gastric mucin, which has been previously shown to react strongly with anti-human gastric monoclonal 45M1 antibody (23), was treated in the same way to obtain a mucin standard curve. The amount of mucin secreted from the rat colon was expressed as micrograms of mucin per milligram of tissue DNA. DNA content was determined according to the fluorometric method of Hinegardner (21). Samples of luminal stimulants were assayed to check for the absence of interference in the ELISA.

**Enzyme-linked lectin assay for mucins from cell culture media.** An enzyme-linked lectin assay (ELLA) was used to measure mucin-like glycoprotein secretion as previously described (42). Briefly, wells of a microtiter plate were coated with samples diluted in sodium carbonate buffer (0.5 M, pH 9.6) and incubated overnight at 4°C. Plates were then washed with PBS containing 0.1% Tween (pH 7) and blocked with 2% BSA in PBS-Tween for 1 h at 37°C. After samples were washed five times, biotinylated wheat germ agglutinin (Vector Laboratories; Burlingame, CA) in PBS-Tween-BSA was added, and samples were incubated for 1 h at 37°C. Colorimetric determinations using avidin-peroxidase conjugate and *o*-phenylenediamine dihydro-

chloride solution were performed at 492 nm with a micro-ELISA plate reader.

The mucin-like glycoprotein content of samples was determined from standard curves prepared from HT29-MTX mucins isolated from 75-cm<sup>2</sup> flasks and purified by ultracentrifugation as described previously (33). The amount of glycoprotein secreted in the incubation medium was expressed as nanograms of mucin-like glycoprotein per 10<sup>6</sup> cells, and results are given as percentages of controls.

**Statistical analysis.** All results are expressed as means  $\pm$  SE. One-way ANOVA with Tukey-Kramer multiple-comparison post test and the Mann-Whitney *U*-test or Mann-Whitney test alone for single comparisons was performed using GraphPad Prism version 3.0 for Windows (Graphpad software; San Diego, CA). The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

**Intracolonic leptin increases mucus secretion.** In the control rat colon, a spontaneous increase in the amount of mucus was observed after 30 min, with mucus levels remaining stable between 60 and 180 min (Fig. 1A). Luminal perfusion with 100 nM leptin induced a rapid increase in mucus secretion (over the course of 30 min) with mucus levels reaching four times those of the control ( $P < 0.05$ ). This leptin stimulation of mucus remained large (2.5 and 3.3 times the basal values) after 180 min of leptin perfusion. In these conditions, 1 mM iv carbachol also induced an increase in colonic mucin secretion, but this difference was not statistically significant from that induced by luminal leptin (1,873  $\pm$  408 vs. 1,207  $\pm$  365  $\mu$ g/mg DNA). This effect of leptin was dose dependent (Fig. 1B) with a maximal response observed with 10 nM leptin (1,922  $\pm$  317 vs. 545  $\pm$  80  $\mu$ g/mg DNA in controls) and an EC<sub>50</sub> value of 0.8 nmol/l. Intravenous leptin (5 nM) also increased mucus secretion compared with intracolonic administration (2,159  $\pm$  211 vs. 1,144  $\pm$  261  $\mu$ g/mg DNA,  $P < 0.05$ ).

**Luminal leptin induces the discharge of mucus cells and increases rMuc2 mRNA levels.** We carried out histological studies on colon mucosa sections from control- and leptin-treated colon mucosa of anesthetized rats. Goblet cells in the crypt epithelium were recognized by densely stained mucus granules that filled the apical cytoplasm. As shown in Fig. 2A, goblet cells of the rat colon 60 min after the intraluminal perfusion of 1 nM leptin have released their mucus granules. There were also large mucus materials in the crypt lumen. Under these conditions, we found that rMuc2 mRNA levels were twice those of the control after 60 min of treatment with 10 nM leptin compared with controls (Fig. 2B).

**Abnormal high mucus-filled goblet cells in the colon of ob/ob mice.** We also analyzed goblet cell morphology by histological studies of the colon of leptin-deficient *ob/ob* mice (Fig. 3). Far more mucus-filled goblet cells were observed in the mucosa of leptin-deficient *ob/ob* mice than in lean littermate mice. A very thick mucus gel also covered the epithelium of leptin-deficient *ob/ob* mice. Taken together, these data suggest that goblet cell function is critically dependent on active leptin.

**Leptin-immunoreactive protein is detected in colon luminal content.** Leptin-immunoreactive (IR) protein was detected in the colon lumen of untreated rats (Fig. 4). A trend toward a decrease was observed in leptin levels in the colon lumen of fasted compared with normally fed rats (Fig. 4, inset), but it did not reach statistical significance (2.1  $\pm$  0.5 vs. 2.75  $\pm$  0.6 ng leptin/ml, not significant). The levels of circulating leptin were

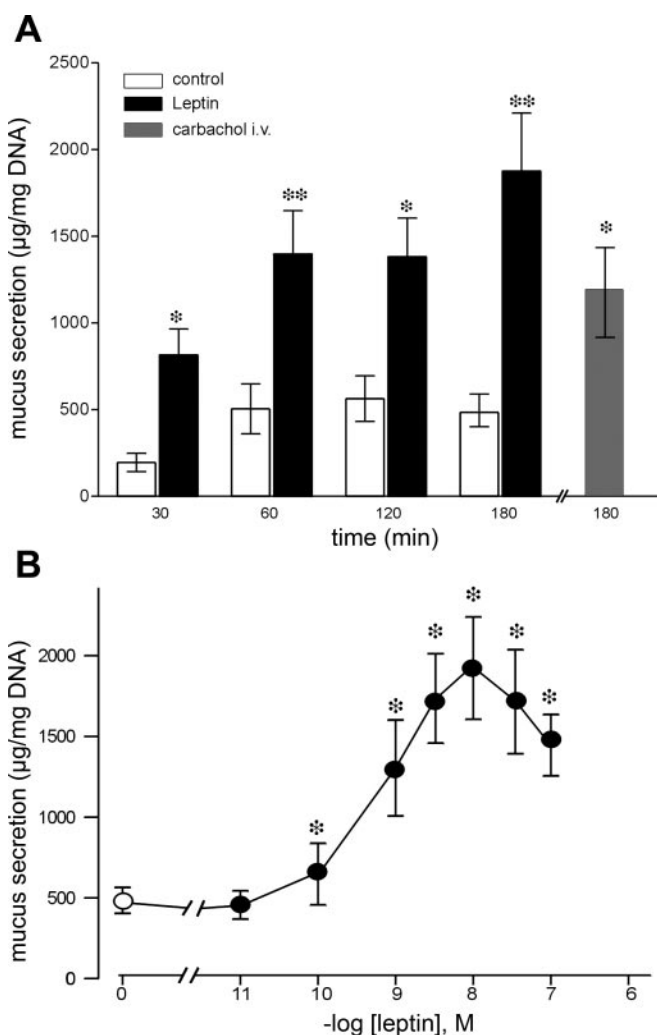


Fig. 1. Intracolonic leptin increases mucus secretion in the rat colon. **A:** time-course effect of leptin on mucus secretion. After a period of stabilization, Krebs-Ringer buffer (KRB) alone [control (CTRL)] or 100 nmol/l leptin in KRB was perfused intraluminally in the colon of anesthetized rats during different time periods. Mucus release was collected over each time period and quantified by ELISA as described. Each time period of mucus release was determined separately. As a positive control, the effect of an intravenous injection of 1 mmol/l carbachol on mucus secretion was determined over the 180-min period. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs. the control. **B:** dose-response curve for luminal leptin stimulation of mucus secretion in the rat colon in vivo. Mucus secretion was determined as noncumulative responses to different concentrations of leptin after a 60-min luminal perfusion. Data are expressed as mucus secretion in micrograms per milligram of DNA and are means  $\pm$  SE of 4–8 experiments for each dose of leptin.

significantly reduced by 40% in fasted compared with normally fed rats. The elution profile of the pooled samples (Fig. 4) obtained after size exclusion chromatography exhibited a leptin-IR peak that eluted at the expected molecular mass of 16-kDa leptin.

**Intracolonic leptin increases goblet cell mucin content without damaging the mucosa.** In another series of experiments, leptin was injected intrarectally into rats that were killed 24 h later. No significant changes were observed in food intake, body weight, or colon length (data not shown). Moreover, tissue-associated MPO activity, an index of neutrophil accumulation, did not change in leptin-treated compared with



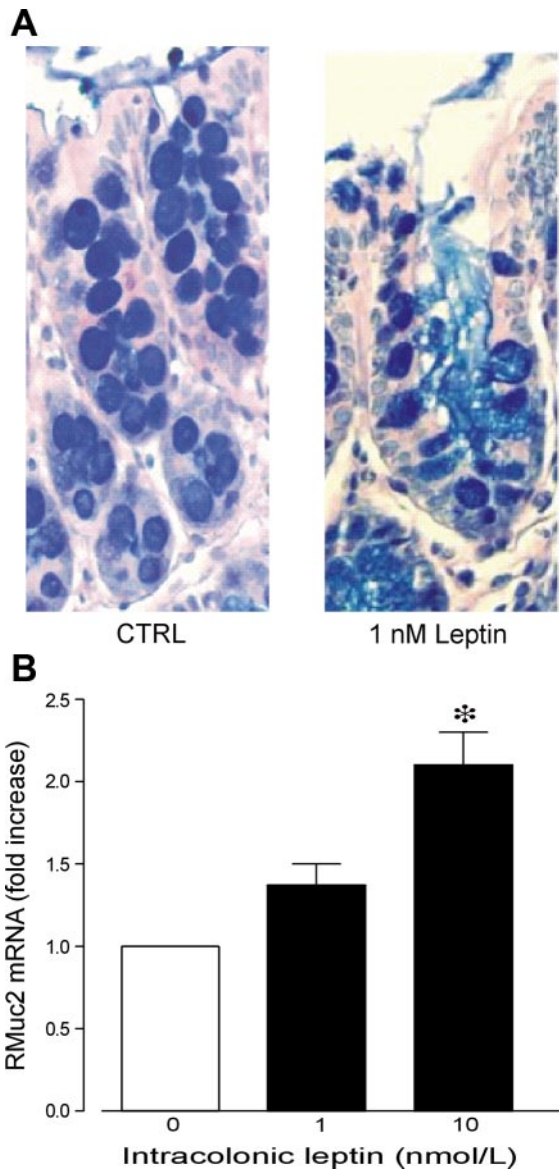


Fig. 2. Luminal leptin decreases goblet cell mucus granules and increases rat mucin 2 (rMuc2) mRNA in the rat colon. *A*: histology. Colonic loops were perfused with KRB alone or with leptin in KRB for 60 min. Sections ( $4\ \mu\text{m}$ ) of the colonic mucosa were stained with alcian blue followed by the periodic acid-Schiff reaction to revealed goblet cells. In the control colonic mucosa (*left*), goblet cells with densely stained granules can be observed along the length of the crypt. In the luminal leptin (1 nM)-treated colon mucosa (*right*), the number of stained mucus cells was decreased, the crypt lumen was expanded, and the release of mucus can be seen from a goblet cell. *B*: rMuc2 mRNA levels in the rat colon after a 60-min luminal leptin perfusion. rMuc2 was analyzed by quantitative RT-PCR with cyclophilin A as an internal control. The expression of rMuc2 was normalized to the cyclophilin A mRNA level in each sample. Results are presented as fold increases of the untreated control (means  $\pm$  SE). \* $P < 0.05$  vs. the control.

control rats ( $1.79 \pm 0.13\ \text{U} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  for 100 nM leptin vs.  $1.52 \pm 0.73\ \text{U} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  for controls). Furthermore, no change in the architecture of the colonic mucosa was observed for up to 100 nM leptin. Numbers of stained mucus cells were higher than those in controls, indicating that leptin replenishes cells by increasing mucin synthesis (Fig. 5). These data indicate that leptin at doses that do not damage the colonic mucosa increased mucin in goblet cells.

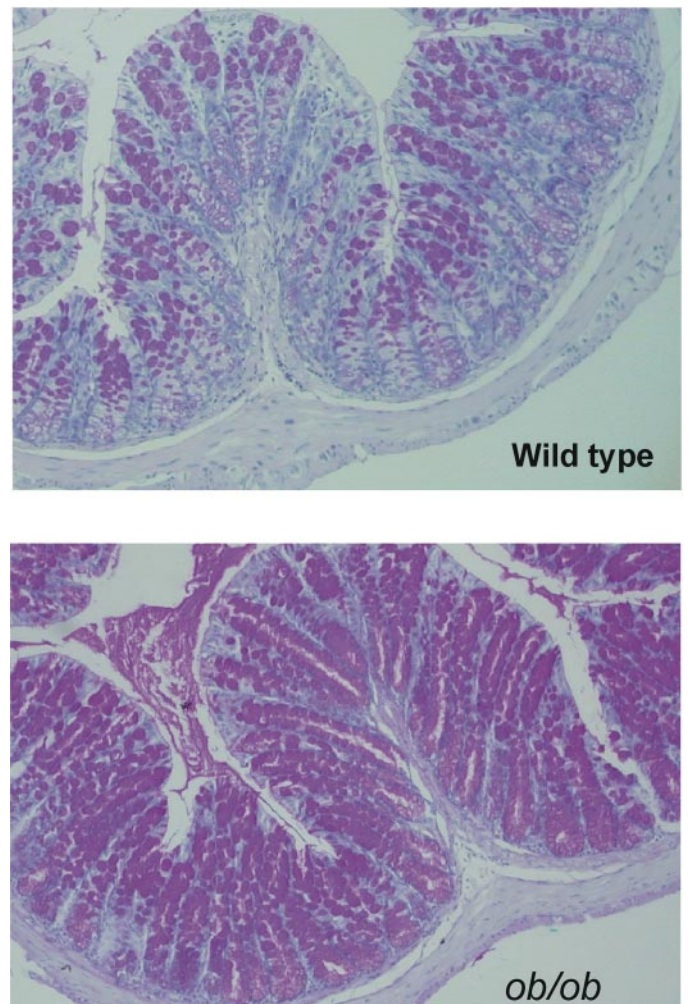


Fig. 3. A deficiency in leptin alters the regulation of colonic mucin in mice. Leptin-deficient *ob/ob* mice had abnormal high mucus-filled goblet cells. Sections ( $4\ \mu\text{m}$ ) of the colonic mucosa were stained with the periodic acid-Schiff reaction to revealed goblet cells.

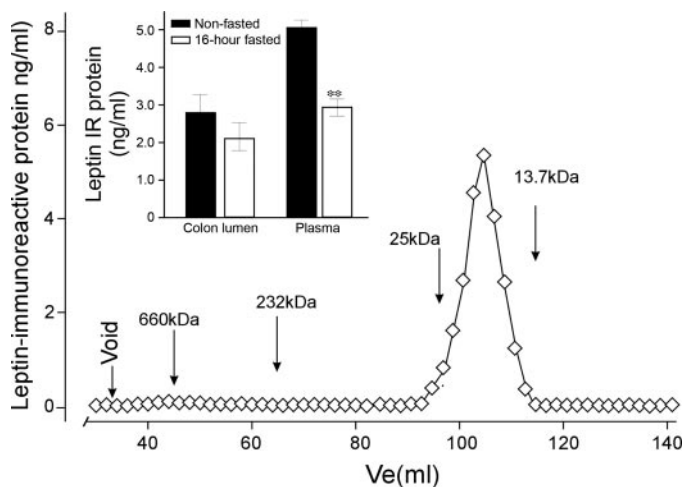


Fig. 4. Leptin-immunoreactive (IR) protein detected in the rat colon lumen. Shown is the size exclusion profile of pooled luminal content samples from the rat colon. The luminal juice content was fractionated on a Superdex 200 (16/60) column. Leptin was determined in each eluted fraction by a RIA. The peak corresponded to 16-kDa leptin. *Inset*: means  $\pm$  SE of leptin-IR protein detected in collected luminal contents from the colon and in plasma samples of nonfasted ( $n = 7$ ) and 16-h fasted ( $n = 8$ ) rats. \*\* $P < 0.01$  vs. nonfasted rats.



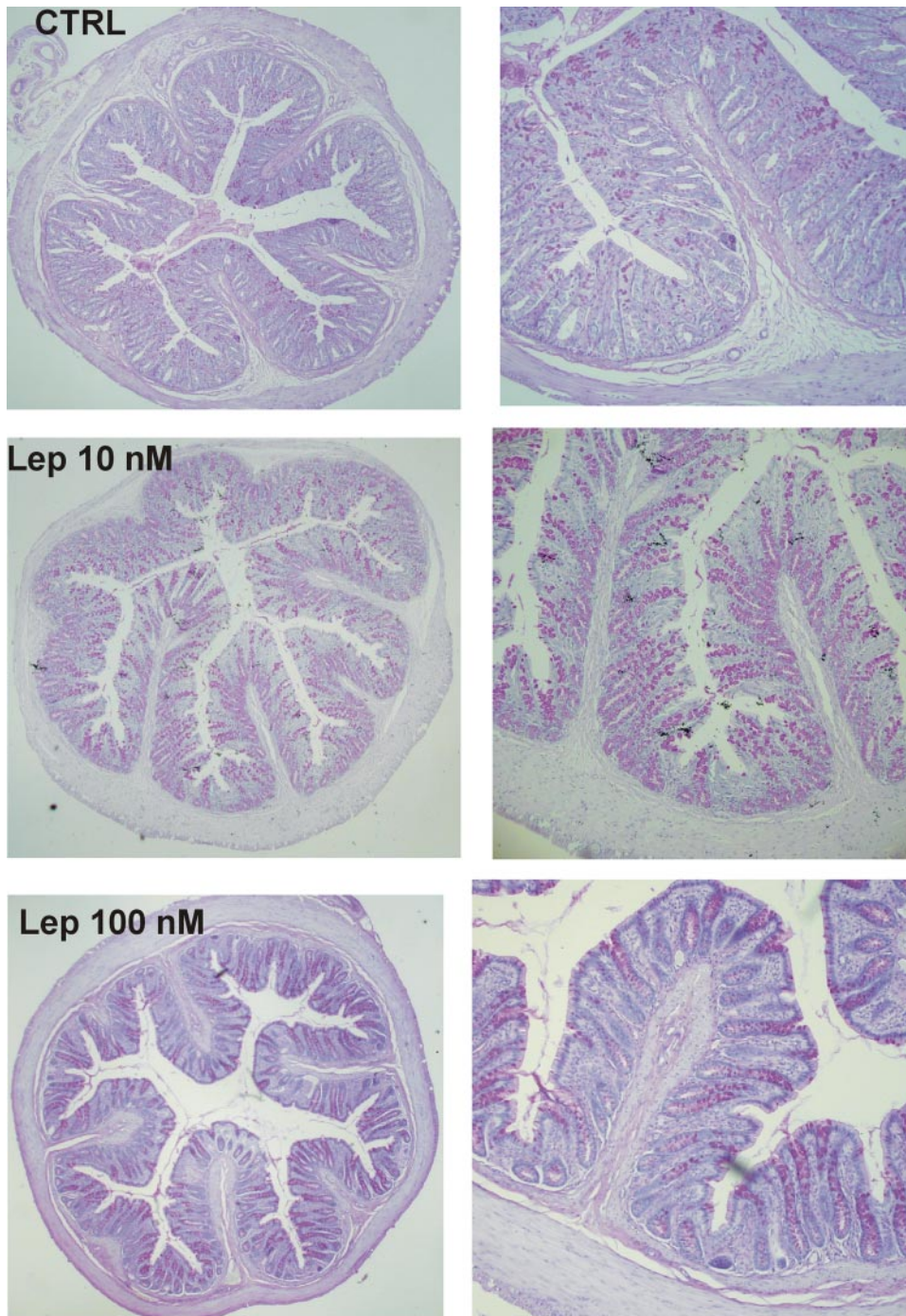


Fig. 5. Intracolonic leptin increases mucin content without damaging the rat colon mucosa. The histology of the rat distal colon 24 h after an injection of PBS (CTRL) or 10 or 100 nM recombinant mouse leptin directly in the colonic lumen is shown. Sections (4  $\mu$ m) of the colonic mucosa were stained with alcian blue and the periodic acid-Schiff reaction to revealed goblet cells.

**Mechanisms of action.** We tried to identify the intracellular pathways involved in the action of leptin using human colonic HT29-MTX mucinlike glycoprotein-secreting cells (26). In these cells, a 246-bp amplicon was amplified by RT-PCR (Fig. 6A, *inset*). The cDNA was sequenced and found to be 100% identical to the human Ob-Rb cDNA sequence. We also investigated whether the induction of mucin discharge by leptin was consistent with the expression of Ob-R on HT29-MTX cells. Carbachol (1 mM) elicited a strong exocytotic response in HT29-MTX cells (Fig. 6A). Leptin also induced the dose-dependent secretion of a mucin-like glycoprotein (Fig. 6A) with a maximal

response ( $+85\% \pm 18\%$  above control,  $P < 0.05$ ) being achieved with 1 nM leptin. No further increased was observed with 10 nM leptin. We also showed that 10 nmol/l leptin induced a specific increase in MUC5AC secretion ( $+60 \pm 8\%$  above control,  $P < 0.05$ ).

Finally, the PKC inhibitors Gö-6976 or Ro-31-8220 significantly inhibited leptin-mediated mucin-like glycoprotein secretion in HT29-MTX cells (Fig. 6B). This blockade of leptin stimulation also occurred with the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor LY-294002. The concentrations of PKC inhibitors and PI3K inhibitor used had no effect on mucin secretion.



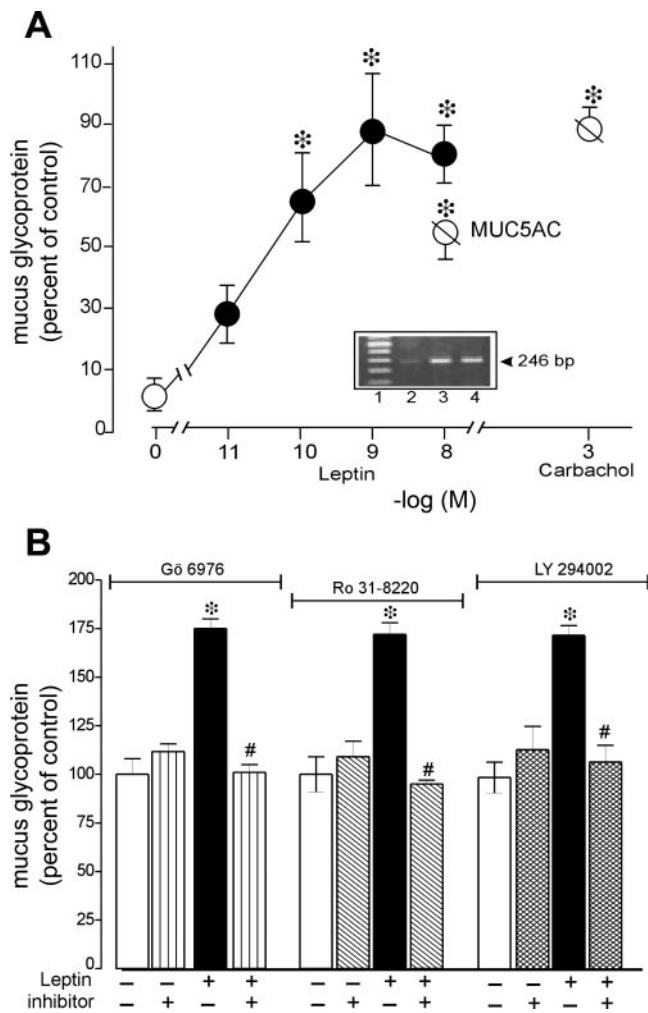


Fig. 6. Human mucus-secreting HT29-MTX cells are responsive to leptin through phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)- and protein kinase C (PKC)-dependent pathways. **A**: dose-response curve for leptin stimulation of mucin glycoprotein secretion in HT29-MTX cells. After 24 h of serum starvation, cells were incubated without ( $\circ$ ; control) or with leptin ( $\bullet$ ; 0.01–10 nM) or carbachol ( $\diamond$ ; 1 mM) at 37°C for 60 min. Amount of mucin glycoproteins in culture media were measured by enzyme-linked lectin assay using biotinylated wheat germ agglutinin. Data are expressed as mucin glycoprotein secretion as a percentage of control. Each point represents the mean  $\pm$  SE of 3–4 experiments performed in triplicate. Samples of media were also collected after incubation with leptin (10 nmol/l) for specific determination of MUC5AC secretion. \* $P$  < 0.05 vs. the control. *Inset*, RT-PCR of the leptin receptor (Ob-Rb) from total RNA extracted from cells. *Lane 1*, DNA marker; *lane 2*, parental HT29 cells; *lanes 3 and 4*, HT29-MTX cells. The 246-bp amplicon (arrow) corresponds to human Ob-Rb. HT29-MTX cells were preincubated for 30 min with inhibitors of PKC [Gö-6976 (1  $\mu$ M) and Ro-31-8220 (1  $\mu$ M)] or PI3K [LY-294002 (10  $\mu$ M)] either alone or in association with 10 nmol/l leptin. Mucin secretion was determined as above. Each point represents the mean  $\pm$  SE of 3 experiments performed in triplicate. \* $P$  < 0.05 vs. the control. # $P$  < 0.05 vs. the leptin.

## DISCUSSION

We demonstrate here for the first time that leptin, and gut leptin in particular, stimulates colonic mucus secretion, probably through the activation of PKC- and PI3K-dependent pathways. This finding is consistent with the results of our previous studies (8, 9, 13, 18) showing that gut leptin regulates intestinal functions. Moreover, it outlines a new function for leptin in the gastrointestinal tract.

Gastrointestinal mucus is composed of secretory mucins of the mucin family. Four members of this family are generally thought to be able to form mucus gels: MUC2, MUC5AC, MUC5B, and MUC6. These mucins have distinct expression patterns along the human gastrointestinal tract. The normal stomach mucosa is characterized by the production of MUC5AC, primarily by surface epithelial mucus cells, and MUC6 by gastric glands. The epithelium of the small and large intestine contains characteristic goblet cells that produce MUC2. This mucin is the predominant secretory mucin in the healthy colon of humans, rats, and mice (43). Goblet cells secrete mucin via an unregulated constitutive pathway that is dependent on the continuous movement of mucin granules from the Golgi apparatus to the apex of the cell and by a regulated process dependent on the sudden release of mucin from granules. This regulatory process is controlled by a wide variety of stimuli, including nerve activation and inflammatory mediators (6, 31, 33). In this study, we clearly demonstrated that leptin is one of these stimuli. Indeed, luminal leptin at physiological concentrations markedly increased mucus secretion in the colon and rMuc2 mRNA levels. Thus leptin activates mucus secretion and helps to reconstitute the intracellular store of goblet cells by increasing mucin gene expression. Yet, this has to be clearly demonstrated. Circulating leptin, which is mostly produced by adipocytes in vivo (45), also increases the secretion of colonic mucus. The stimulation of mucus secretion in response to luminal or systemic leptin administration is consistent with the expression of the Ob-R on both apical and basolateral colonic cell membranes (2).

Interestingly, we found that the colon of leptin-deficient *ob/ob* mice contains an abnormally dense population of stained mucus cells, shown by comparison to lean littermates. This indicates that active leptin is essential for the maintenance of the balance of mucus secretion, synthesis, and storage by goblet cells. Only two reports have been concerned with the effect of leptin on mucus secretion. One study (37) has shown that leptin prevents the decrease in mucin synthesis induced by the lipopolysaccharide of *P. gingivalis*. The other study (1) has demonstrated that systemic administration of a high dose of leptin increases gastric mucus secretion and injury susceptibility. In this report, we demonstrated that exogenous administration of leptin (up to 100 nM) in the colon lumen did not induce colon mucosa damage but did increase mucin storage in goblet cells. However, this finding is not consistent with data showing that leptin enemas lead to colon mucosal injury (36). This discrepancy between our results and those published previously results (36) may be partly due to differences in the animal models and/or doses of leptin used. Indeed, the dose used in that study was 1,000 times higher than the one used here. We conclude that locally administered leptin, at a dose causing no damage to the mucosa wall, is a potent colon mucosecretagogue. Moreover, leptin-IR protein was detected in luminal contents from the colon at a concentration of 0.3 nmol/l, which is compatible with the activation of Ob-R. This finding, along with previous data reporting the expression of Ob-R on the apical side of colonocytes (2), argues for a luminal action of leptin on mucus production from colonic goblet cells.

What is the physiological relevance of these findings? Mucus is secreted into the lumen from intestinal goblet cells. Mucus forms a gel layer that covers the mucosal surface of the intestinal tract, acting as a semipermeable barrier between the

lumen and epithelium. The stability of this mucus layer is essential for the preservation of the integrity of the intestinal epithelium, and any breakdown of this protection may lead to mucosal injury. It has been shown that leptin can reduce colonic injury caused by exposure to acetic acid (5, 11). This is close to those data showing that leptin has gastroprotective effects, accelerating the healing of ethanol-induced gastric ulcers (14, 24). Interestingly, one study (36) reported that, in humans with ulcerative colitis, colonic epithelial cells in the inflamed zone are leptin IR, whereas normal colon epithelial cells are not. In this context, our finding that leptin is present in significant amounts in the lumen and rapidly increases the production/secretion of the major secreted mucin in the intestine, rMuc2, might have physiological implications in the protection of the colonic mucosa. However, this remains to be clearly demonstrated by future studies. We also found that *ob/ob* mice had high mucin levels in their colonic mucosa. This is in line with the finding that *ob/ob* mice are resistant to the induction of experimental colonic inflammation and that the replacement of leptin renders *ob/ob* mice susceptible to disease (34). The mechanisms responsible for such an action largely involved the T cell activation capacity of leptin. Thus we speculate that the mucus layer may increase the ability of the colon of *ob/ob* mice to cope with aggressive factors, thereby contributing to the resistance of these mice to the induction of colitis. Such an involvement of leptin to pathophysiology mechanisms remains to be investigated.

In this study, the data in the rat have been extended to the human mucin-secreting goblet-like HT29-MTX cell line (26) in vitro. We found that leptin is able to stimulate the secretion of mucin glycoproteins from these cells expressing the functional Ob-R. Ob-R can activate various intracellular pathways, including the PKC and PI3K (40) pathways. This is consistent with previous data showing that leptin activates PI3K (20) and that the PI3K inhibitor wortmannin prevents leptin from overcoming the lipopolysaccharide-induced inhibition of mucin synthesis (37). Here, we observed that inhibition of conventional PKC isoforms prevented leptin-induced mucin, but this does not exclude the possible involvement of other isoforms (22). Similarly, pharmacological inhibition of PI3K activity prevents the leptin stimulation of mucin secretion. Further work is required to unravel the intracellular mechanisms involved, but our data suggest that leptin-mediated mucin exocytosis requires the activation of PI3K- and PKC-dependent pathways.

In conclusion, this study demonstrates that leptin acting from the luminal side is a powerful colonic secretagogue, probably through the Ob-R coupled with the activation of PKC and PI3K. We also obtained evidence suggesting that leptin increases the production of the major mucin secreted in the intestine, rMuc2. Finally, the responsiveness of human mucin-secreting HT29-MTX cells to leptin suggests that our findings may be relevant to human intestinal physiology. Further studies are needed to define the relevance of these findings to the pathophysiology of the gastrointestinal tract.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Results from the present study were presented as a poster of distinction at the Digestive Disease Week at May 2005 in Chicago, IL.

#### REFERENCES

1. Adeyemi EO, Bastaki SA, Chandranath IS, Hasan MY, Fahim M, and Adem A. Mechanisms of action of leptin in preventing gastric ulcer. *World J Gastroenterol* 11: 4154–4160, 2005.
2. Aparicio T, Guilmeau S, Goiot H, Tsocas A, Laigneau JP, Bado A, Sobhani I, and Lehy T. Leptin reduces the development of the initial precancerous lesions induced by azoxymethane in the rat colonic mucosa. *Gastroenterology* 126: 499–510, 2004.
3. Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, and Lewin MJ. The stomach is a source of leptin. *Nature* 394: 790–793, 1998.
4. Bara J, Gautier R, Mouradian P, Decaens C, and Daher N. Oncofetal mucin M1 epitope family: characterization and expression during colonic carcinogenesis. *Int J Cancer* 47: 304–310, 1991.
5. Bozkurt A, Cakir B, Ercan F, and Yegen BC. Anti-inflammatory effects of leptin and cholecystokinin on acetic acid-induced colitis in rats: role of capsaicin-sensitive vagal afferent fibers. *Regul Pept* 116: 109–118, 2003.
6. Branka JE, Vallette G, Jarry A, and Laboisse CL. Stimulation of mucin exocytosis from human epithelial cells by nitric oxide: evidence for a cGMP-dependent and a cGMP-independent pathway. *Biochem J* 323: 521–524, 1997.
7. Busso N, So A, Chobaz-Peclat V, Morard C, Martinez-Soria E, Talabot-Ayer D, and Gabay C. Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis. *J Immunol* 168: 875–882, 2002.
8. Buyse M, Berlioz F, Guilmeau S, Tsocas A, Voisin T, Peranzi G, Merlin D, Laburthe M, Lewin MJ, Roze C, and Bado A. PepT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalixin is enhanced by luminal leptin in the small intestine. *J Clin Invest* 108: 1483–1494, 2001.
9. Buyse M, Sitaraman SV, Liu X, Bado A, and Merlin D. Luminal leptin enhances CD147/MCT-1-mediated uptake of butyrate in the human intestinal cell line Caco2-BBE. *J Biol Chem* 277: 28182–28190, 2002.
10. Buyse M, Tsocas A, Walker F, Merlin D, and Bado A. PepT1-mediated fMLP transport induces intestinal inflammation in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1795–C1800, 2002.
11. Cakir B, Bozkurt A, Ercan F, and Yegen BC. The anti-inflammatory effect of leptin on experimental colitis: involvement of endogenous glucocorticoids. *Peptides* 25: 95–104, 2004.
12. Cho HY, Hotchkiss JA, and Harkema JR. Inflammatory and epithelial responses during the development of ozone-induced mucous cell metaplasia in the nasal epithelium of rats. *Toxicol Sci* 51: 135–145, 1999.
13. Ducroc R, Guilmeau S, Akasbi K, Devaud H, Buyse M, and Bado A. Luminal leptin induces rapid inhibition of active intestinal absorption of glucose mediated by sodium-glucose cotransporter 1. *Diabetes* 54: 348–354, 2005.
14. Erkasap N, Uzuner K, Serteser M, Koken T, and Aydin Y. Gastroprotective effect of leptin on gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion is related to gastric histamine content in rats. *Peptides* 24: 1181–1187, 2003.
15. Faggioni R, Jones-Carson J, Reed DA, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C, and Fantuzzi G. Leptin-deficient (*ob/ob*) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2367–2372, 2000.
16. Finn PD, Cunningham MJ, Pau KY, Spies HG, Clifton DK, and Steiner RA. The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. *Endocrinology* 139: 4652–4662, 1998.
17. Groschl M, Rauh M, Wagner R, Neuhuber W, Metzler M, Tamguney G, Zenk J, Schoof E, Dorr HG, Blum WF, Rascher W, and Dotsch J. Identification of leptin in human saliva. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5234–5239, 2001.
18. Guilmeau S, Buyse M, Tsocas A, Laigneau JP, and Bado A. Duodenal leptin stimulates cholecystokinin secretion: evidence of a positive leptin-cholecystokinin feedback loop. *Diabetes* 52: 1664–1672, 2003.
19. Hardwick JC, Van Den Brink GR, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, and Peppelenbosch MP. Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 121: 79–90, 2001.
20. Hegyi K, Fulop K, Kovacs K, Toth S, and Falus A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int* 28: 159–169, 2004.
21. Hinegardner RT. An improved fluorometric assay for DNA. *Anal Biochem* 39: 197–201, 1971.
22. Hong DH, Petrovics G, Anderson WB, Forstner J, and Forstner G. Induction of mucin gene expression in human colonic cell lines by PMA

- is dependent on PKC- $\epsilon$ . *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 277: G1041–G1047, 1999.
23. **Hutton DA, Fogg FJ, Kubba H, Birchall JP, and Pearson JP.** Heterogeneity in the protein cores of mucins isolated from human middle ear effusions: evidence for expression of different mucin gene products. *Glycoconj J* 15: 283–291, 1998.
  24. **Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T, Jaworek J, and Hahn EG.** Role of leptin in the stomach and the pancreas. *J Physiol* 95: 345–354, 2001.
  25. **Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, and Friedman JM.** Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379: 632–635, 1996.
  26. **Lesuffleur T, Porchet N, Aubert JP, Swallow D, Gum JR, Kim YS, Real FX, and Zweibaum A.** 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: 771–783, 1993.
  27. **Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, and Diehl AM.** Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 12: 57–65, 1998.
  28. **Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, and Nakao K.** Non-adipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3: 1029–1033, 1997.
  29. **Matarese G, Di Giacomo A, Sanna V, Lord GM, Howard JK, Di Tuoro A, Bloom SR, Lechler RI, Zappacosta S, and Fontana S.** Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 166: 5909–5916, 2001.
  30. **Morton NM, Emilsson V, Liu YL, and Cawthorne MA.** Leptin action in intestinal cells. *J Biol Chem* 273: 26194–26201, 1998.
  31. **Neutra MR, O'Malley LJ, and Specian RD.** Regulation of intestinal goblet cell secretion. II. A survey of potential secretagogues. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 242: G380–G387, 1982.
  32. **Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, and Collins F.** Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269: 540–543, 1995.
  33. **Plaisancie P, Barcelo A, Moro F, Claustre J, Chayvialle JA, and Cuber JC.** Effects of neurotransmitters, gut hormones, and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275: G1073–G1084, 1998.
  34. **Siegmund B, Lehr HA, and Fantuzzi G.** Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* 122: 2011–2025, 2002.
  35. **Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, and Flores-Riveros JR.** Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281: 1683–1686, 1998.
  36. **Sitaraman S, Liu X, Charrier L, Gu LH, Ziegler TR, Gewirtz A, and Merlin D.** Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD. *FASEB J* 18: 696–698, 2004.
  37. **Slomiany BL and Slomiany A.** Leptin suppresses *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide interference with salivary mucin synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 1099–1103, 2003.
  38. **Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, Buyse M, Kermorgant S, Laigneau JP, Attoub S, Lehy T, Henin D, Mignon M, and Lewin MJ.** Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut* 47: 178–183, 2000.
  39. **Takahashi N, Waelput W, and Guisez Y.** Leptin is an endogenous protective protein against the toxicity exerted by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 189: 207–212, 1999.
  40. **Tartaglia LA.** The leptin receptor. *J Biol Chem* 272: 6093–6096, 1997.
  41. **Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, and Tepper RI.** Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263–1271, 1995.
  42. **Trompette A, Blanchard C, Zoghbi S, Bara J, Claustre J, Jourdan G, Chayvialle JA, and Plaisancie P.** The DHE cell line as a model for studying rat gastro-intestinal mucin expression: effects of dexamethasone. *Eur J Cell Biol* 83: 347–358, 2004.
  43. **Tytgat KM, Buller HA, Opdam FJ, Kim YS, Einerhand AW, and Dekker J.** Biosynthesis of human colonic mucin: Muc2 is the prominent secretory mucin. *Gastroenterology* 107: 1352–1363, 1994.
  44. **Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, DiMarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schoner BE, Smith DP, Zhang XY, Wery JP, and Schevitz RW.** Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 387: 206–209, 1997.
  45. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, and Friedman JM.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425–432, 1994.

**La leptine module l'expression des  
mucines gastrointestinales dans les  
cellules épithéliales coliques via les voies  
de signalisation de PKC, PI3K et MAPK**

## **La leptine module l'expression des mucines gastrointestinales dans les cellules épithéliales coliques via les voies de signalisation de PKC, PI3K et MAPK**

### **Résumé :**

Les mucines jouent un rôle essentiel dans la protection et la réparation de la muqueuse gastro-intestinale. Nous avons récemment montré que la leptine luminale stimule fortement la sécrétion de mucine *in vivo* chez le rat. Dans la présente étude, nous avons émis l'hypothèse que la leptine pouvait agir directement sur les cellules en gobelet et induire l'expression de mucines dans des lignées coliques mucosécrétante de rat et d'homme (DHE et HT29-MTX). L'effet endoluminal de la leptine a également été étudié *in vivo* dans le modèle d'anse colique de rat perfusée *in situ*.

La présence des récepteurs de la leptine a été démontrée dans les deux lignées utilisées par Western Blot et RT-PCR. Dans la lignée DHE, la leptine (0.01-10 nmol/L, 60 minutes) a augmenté la sécrétion des mucines (210 +/- 3 par rapport au contrôle) et l'expression de rMuc2, rMuc3 et rMuc4 (2 fois le niveau de base) d'une façon dose-dépendante. L'expression de rMuc1 et de rMuc5AC n'était pas modifiée. La perfusion luminale de la leptine (60-min, 0.1-100 nmol /L) dans le côlon de rat a également augmenté le niveau des transcrits de rMuc2, rMuc3 et rMuc4 mais pas de rMuc1.

Dans la lignée humaine HT29-MTX, la leptine (0.01-10 nmol/L, 60 minutes) a augmenté le niveau des transcrits codant MUC2, MUC4 et MUC5AC de façon dose-dépendante. Ces effets ont été abolis par le traitement préalable des cellules avec un triple mutant de la leptine L39A/D40A/F41A qui agit en tant qu'antagoniste des récepteurs de la leptine. Les expériences d'inhibition des voies de signalisation suggèrent que la leptine augmente l'expression des mucines *via* les voies de la PKC, de la PI3-kinase et des MAPK mais pas la voie JAK/STAT.

En conclusion, la leptine peut contribuer de manière significative à la production des mucines membranaires et sécrétées par l'intermédiaire d'une stimulation directe des cellules épithéliales du côlon et par l'activation de ces récepteurs. Ces données sont en accord avec un nouveau rôle de la leptine dans le contrôle de la fonction de la barrière intestinale.



## Leptin modulates the expression of secreted and membrane-associated mucins in colonic epithelial cells by targeting PKC, PI3K, and MAPK pathways

Mahmoud El Homsy,<sup>1</sup> Robert Ducroc,<sup>3</sup> Jean Claustre,<sup>1</sup> Gérard Jourdan,<sup>1</sup> Arieh Gertler,<sup>4</sup> Monique Estienne,<sup>1,2</sup> André Bado,<sup>3</sup> Jean-Yves Scoazec,<sup>1</sup> and Pascale Plaisancié<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR865, IFR62, Faculté R. Laennec, Université Claude Bernard-Lyon 1, Lyon;

<sup>2</sup>INRA, UMR Neuro-Gastroentérologie et Nutrition, Toulouse; <sup>3</sup>INSERM, U773, CRB3 EQ2, Faculté de Médecine X. Bichat, Paris, France; and <sup>4</sup>Institute of Biochemistry, Food Science, and Nutrition, Faculty of Agricultural, Food and Environmental, Jerusalem, Israel

Submitted 20 February 2007; accepted in final form 7 May 2007

**El Homsy M, Ducroc R, Claustre J, Jourdan G, Gertler A, Estienne M, Bado A, Scoazec J-Y, Plaisancié P.** Leptin modulates the expression of secreted and membrane-associated mucins in colonic epithelial cells by targeting PKC, PI3K, and MAPK pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G365–G373, 2007. First published May 10, 2007; doi:10.1152/ajpgi.00091.2007.—Mucins play an essential role in the protection and repair of gastrointestinal mucosa. We recently showed that luminal leptin strongly stimulated mucin secretion *in vivo* in rat colon. In the present study, we challenged the hypothesis that leptin may act directly on goblet cells to induce mucin expression in rat and human intestinal mucin-producing cells (DHE and HT29-MTX). The endoluminal effect of leptin was also studied *in vivo* in rat perfused colon model. The presence of leptin receptors was demonstrated in the two cell lines by Western blot and RT-PCR. In rat DHE cells, leptin (0.01–10 nmol/l, 60 min) dose dependently increased the secretion of mucins (210 ± 3% of controls) and the expression of *Muc2*, *Muc3*, and *Muc4* (twofold basal level) but not of *Muc1* and *Muc5AC*. Luminal perfusion of leptin (60 min, 0.1–100 nmol/l) in rat colon also increased the mRNA level of *Muc2*, *Muc3*, and *Muc4* but not of *Muc1*. In human HT29-MTX cells, leptin (0.01–10 nmol/l, 60 min) dose dependently enhanced *MUC2*, *MUC5AC*, and *MUC4* mRNA levels. These effects were prevented by pretreatment of cells with the leptin mutein L39A/D40A/F41A, which acts as a receptor antagonist. Finally, pathway inhibition experiments suggest that leptin increased mucin expression by activating PKC-, phosphatidyl inositol 3-kinase-, and MAPK-dependent pathways but not the JAK/STAT pathway. In conclusion, leptin may contribute significantly to membrane-associated and secreted mucin production via a direct stimulation of colonic epithelial cells and the activation of leptin receptors. These data are consistent with a role for leptin in regulation of the intestinal barrier function.

*Muc2*; *Muc3*; *Muc4*; *MUC5AC*; mucus; intestinal barrier; phosphatidylinositol 3-kinase

THE INTESTINAL MUCOSA REPRESENTS an active defense barrier against harmful conditions present in the intestinal lumen. Protection against damaging agents is conferred by the epithelial layer itself and by factors such as peristalsis, intestinal proteolysis, intestinal microbiota, and mucus. The mucus coat plays a central role in the protection from mechanical insults, colonization by pathogenic bacteria and their toxins, luminal proteases arising from bacterial and mucosal cells, and potential carcinogens. The viscoelastic properties of mucus are

mainly determined by the presence of mucins, which are high-molecular-weight proteins extensively *O*-glycosylated. To date, 20 different mucins (*MUC*) have been identified in humans and divided into two main classes: secreted and cell surface-associated mucins (34). Secreted gel-forming mucins include *MUC2*, *MUC5AC*, *MUC5B*, and *MUC6*, which are encoded by a cluster of genes on chromosome 11p15.5 in humans (34). Each of these mucins has a characteristic organ- and cell type-specific distribution. Thus colonic mucus is mainly composed of *MUC2* that is produced by epithelial goblet cells, and alterations in expression of this mucin have been reported in patients with Crohn's disease, ulcerative colitis, and colonic neoplasia (8, 35, 36). As in humans, the major mucins produced in rodent gut are *Muc2*, *Muc3*, and *Muc4*. Interestingly, it has been demonstrated that mice genetically deficient in *Muc2* spontaneously develop colitis and colorectal cancer (45, 46), thus highlighting the importance of this secreted mucin in the maintenance of colonic integrity. Recently, the membrane-associated mucins also have received increasing attention for their role in the protection of epithelia (39). In the gut, prominent membrane-associated mucins are *MUC1*, *MUC3*, and *MUC4* (22), which are detectable both in goblet cells and in enterocytes, providing a static external barrier that can limit direct access of pathogens. It is interesting to note that *Muc3* is upregulated during intestinal infection (37), and several studies also provided a link between rare alleles of *MUC3* and inflammatory bowel diseases (24, 25), thus suggesting that *MUC3* is involved in the mucosal epithelial response to inflammation. Because secreted mucins in association with the membrane-bound mucins act as a physicochemical barrier for the protection of the epithelial cell surface, it may be speculated that any quantitative change in their production may modify the intestinal barrier function and have important physiological implications.

A new role in the defense of the intestine also emerges for enterocytes as sentinels against epithelial aggression and damage. Indeed, it has been demonstrated that intestinal epithelial cells secrete numerous regulating agents including cytokines such as *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-7*, *IL-10*, *IL-15*, *IL-18*, and interferons that will lead to the activation and recruitment of immune cells involved in defense mechanisms and functions (41). Interestingly, a recent study reported that, in patients with ulcerative colitis, colonic epithelial cells in the inflamed zone were leptin

Address for reprint requests and other correspondence: P. Plaisancié, INSERM UMR865, Faculté de Médecine R. Laennec, 7, rue Guillaume Paradin, 69008 Lyon, France (e-mail: plaisancie@lyon.inserm.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

immunoreactive and the luminal leptin concentration during inflammation was over 15-fold higher than in normal colonic lumen (40). In some other aspects, the expression of leptin receptors, which have been demonstrated on human and rat colonic epithelial cell membranes (5, 18), suggests that leptin may play an important role in colonic epithelial functions. In line with the presence of leptin receptors in colonic cells, we recently demonstrated that luminally or systemically injected leptin induced a strong discharge of mucin *in vivo* in rat colon (33). However, it is unknown whether leptin may also directly modulate the expression of various colonic mucin genes.

The present study was thus undertaken to evaluate the direct effect of leptin on the expression of secreted and membrane-associated mucins. For this purpose, we used rat and human intestinal mucus-secreting cell lines as models to avoid interference of the nervous system and immune resident cells. These cell lines exhibit the characteristics of mucin-producing cells and provide reliable tools for the study of regulation of gastrointestinal mucin expression and secretion (26, 33, 48). To mimic the presence of luminal leptin, the endoluminal effect of leptin on mucin expression was studied *in vivo* in a rat perfused colon model.

## MATERIAL AND METHODS

### Materials

Media and reagents (DMEM, penicillin/streptomycin, trypsin), Trizol, RT-PCR reagents and enzymes, and distilled RNase-free water were obtained from Invitrogen (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Culture flasks and plates were from Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NJ). The FastStart DNA Master SYBRgreen I kit was from Roche Diagnostics (Meylan, France). The leptin antagonist (human leptin mutein D39A/I40A/F41A) (30) was from A. Gertler (Jerusalem, Israel). The biotinylated wheat germ agglutinin, the biotinylated goat anti-rabbit antibody, and the avidin/biotinylated peroxidase complex (Vectastain Elite ABC reagent) were provided by Vector Laboratories (Burlingame, CA). The recombinant murine leptin was from Abcys (Paris, France). Microtiter plates (NUNC-Immunoplate) were obtained from PolyLabo (Paul Block, Strasbourg, France). Other reagents were provided by Sigma (St. Louis, MO).

### Cell Culture

The DHE cell line, a previously described mucin producing rat colon adenocarcinoma cell line (44), was a generous gift of Pr. F. Martin (INSERM U517, Dijon, France). HT29-MTX, a human colon carcinoma derived mucin-secreting goblet cell line, was provided by Dr. Thecla Lesuffleur (26). The two cell lines were grown in 25-cm<sup>2</sup> plastic culture flasks in DMEM supplemented with 10% FBS and 100 mg/ml penicillin-streptomycin at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in a humidified incubator. Medium was replaced every 2 days.

To study the effect of leptin, cells were seeded in 12-well culture plates. Experiments were performed 3 days (DHE cells) or 21 days (HT29-MTX cells) after cells reached confluency. At 24 h before the studies, the culture medium was replaced by serum-free medium to eliminate any interference from extraneous proteins or hormones. The experimental protocol was then the following: the serum-free medium was removed and the monolayer cultures of DHE or HT29-MTX were washed twice with PBS (37°C). Serum-free medium with or without leptin was added to the cells and incubated at 37°C for 60 min in a humidified atmosphere. Cellular signaling pathway blockade was performed by preincubating the cells with a leptin antagonist or with inhibitors of the JAK/STAT, MAPK, PKC, and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathways for 10 min before leptin addition. The supernatants were then collected, frozen, and stored at -20°C. Cells

were processed with trypsin. The cell number per well was determined and total RNA was isolated. All experiments were performed at least three times in triplicate.

### Anesthetized Rat Perfused Colon

Male Wistar rats weighing 220–240 g (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were caged under standard laboratory conditions with tap water and regular food provided *ad libitum*, in a 12:12-h light-dark cycle at a temperature of 21–23°C. The animals were treated in accordance with European Community guidelines concerning the care and use of laboratory animals. The animal studies were performed under license from the veterinary department of Paris, France (to A. Bado and R. Ducroc, authorization no. 75-955 of September 22, 2004 and no. 75-174 of October 9, 2003, respectively; agreement no. B75-18-02; decision no. 05/12 established on July 12, 2005 by Préfecture de Police de Paris, France).

Before experiments, rats were fasted 16 h in mesh-wire cages to avoid coprophagia with water *ad libitum* and then anesthetized with ethylurethane (1.2 g/kg, intramuscular) (Prolabo, Paris, France). An inflow cannula was inserted 1 cm below the cecum and the outflow cannula was set up at a distance of 1 cm above the rectum. The colonic segment was flushed with saline solution prewarmed to 37°C to remove residual intestinal contents. Then it was continuously perfused at a rate of 1 ml/15 min (Minipuls 2; Gilson, Paris, France) with a Krebs-Ringer buffer (pH 7.5) containing (in mmol/l): 120 NaCl, 4.5 KCl, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 0.7 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, and 10 glucose. After a 30-min stabilization period, vehicle (control) or recombinant murine leptin (0.1–100 nmol/l) in Krebs-Ringer buffer was perfused for 60 min. At the end of the period, the empty colonic loops were divided into small segments. One part of colon tissues was stored at -80°C until determination of DNA content. The other part of the colonic tissues was used for total RNA extraction and for quantification of *Muc1*, *Muc2*, *Muc3*, and *Muc4* mRNA by RT-PCR.

### RT-PCR of Mucins, Leptin Receptors, and Cyclophilin

Briefly, total RNA were extracted from rat colon, DHE, or HT29-MTX cells by using Trizol according to the manufacturer's instructions and were reverse-transcribed into cDNA as previously described (48). cDNAs were amplified by PCR with primer sequences previously published: *Muc1-Muc5AC* (20, 28, 43, 44, 47, 48), *MUC1-MUC5AC* (16, 48), and leptin receptors (17, 18, 42). The housekeeping gene cyclophilin was amplified as a reference gene (48).

PCR was performed under the thermocycling conditions as follows: 2-min initial denaturation at 94°C, 30-s denaturation at 94°C, 1-min annealing at 60°C and 1-min extension at 72°C. The last amplification was followed by a final 10-min elongation step at 72°C. PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel in the presence of ethidium bromide. The number of cycles was chosen to fall into the exponential phase of amplification. The identity of PCR products was confirmed by sequencing the amplicons (BIOFIDAL, Vaulx en Velin, France). For semiquantitative analysis of mucin mRNA expression, gels were visualized and pixelized with the "Image System" (Quantum Appligene, Pleasanton, CA) and densitometrically analyzed with Scion Image version 4.0.2.

### Real-Time PCR

Real-time PCR measures were performed with the real-time fluorescence-detection method (Roche Diagnostics, Meylan, France), using the LightCycler System with a FastStart DNA Master SYBRgreen I kit. Primer sequences were previously published (48). Reaction mixture contained MgCl<sub>2</sub> (80 nmol), forward and reverse primers (8.12 pmol), and 2 µl of LightCycler Fast Start DNA Master SYBRgreen I mix in a volume of 10 µl. The reaction mixture was distributed into precooled capillaries, and diluted (1/10) cDNA or

purified and quantified cloned plasmid DNA for mucin (construction of a standard curve) in a volume of 10  $\mu$ l was added as PCR template. The cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 amplification cycles at 95°C for 10 s, a touch-down (0.5° per cycle) annealing from 68 to 60°C for 8 s, and elongation at 72°C for 6 s. Real-time monitoring was achieved by measuring the fluorescence at the end of the elongation phase. After cycling, melting curves of the PCR products were acquired by cooling and maintaining samples at 65°C for 15 s and then by increasing the temperature stepwise from 65 to 98°C.

#### ELLA

An enzyme-linked lectin assay (ELLA) was used to measure mucinlike glycoprotein secretion as previously described (44). Briefly, wells of a microtiter plate were coated with sample diluted in sodium carbonate buffer (0.5 M, pH 9.6) and incubated overnight at 4°C. The plates were then washed with PBS containing 0.1% Tween (PBS-Tween, pH 7) and blocked with 2% BSA in PBS-Tween for 1 h at 37°C. After washing five times, biotinylated wheat germ agglutinin in PBS-Tween-BSA was added and the samples were incubated for 1 h at 37°C. Colorimetric determinations using avidin-peroxidase conjugate and *o*-phenylenediamine dihydrochloride solution were performed at 492 nm with a micro-ELISA plate reader. Mucinlike glycoprotein content of samples was determined from standard curves prepared from DHE or HT29-MTX mucins isolated from 75-cm<sup>2</sup> flasks and purified by ultracentrifugation as described previously (10). The amount of mucinlike glycoprotein secreted in the incubation medium was expressed as nanograms of mucinlike glycoprotein per 10<sup>6</sup> cells, and the results were given as percent of controls.

#### ELISA for Rat Mucins

The secretion of *Muc2* by the DHE cells was measured by an ELISA using the H-300 (sc-15334) primary polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), as previously described (48). Samples were incubated for 24 h at 37°C in a 96-well plate.

Plates were then washed three times with PBS containing 0.1% Tween and blocked with 2% BSA in PBS-Tween for 1 h. They were then washed again and incubated with 50  $\mu$ l of the rabbit primary polyclonal antibody (1:100) for 1 h. The wells were then incubated with 100  $\mu$ l of biotinylated goat anti-rabbit IgG conjugate (1:10,000) for 1 h. After three washes, 100  $\mu$ l of avidin-peroxidase conjugate were added and plates were processed as described for the ELLA. *Muc2* content of samples was determined from standard curves prepared from purified rat intestinal mucin. The results were given as percent of controls.

#### Protein Preparation and Western Analysis of Leptin Receptors

DHE, HT29-MTX, and parental HT29 (HT29p) cells were lysed in lysis buffer containing 1% Triton X-100, 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100 mM NaF, 100 units/ml aprotinin, 20  $\mu$ M leupeptin, and 0.2 mg/ml PMSF. An aliquot of each lysate containing 300 mg of protein as determined by the Bradford method was resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel. The proteins were transferred to Protran nitrocellulose transfer membranes (Schleicher & Schüll, Ecquevilly, France). The filter was blocked and incubated with a rabbit polyclonal antibody against the leptin receptor Ob-R (H-300, sc-8325, Santa Cruz Biotechnology). Antibody-antigen complexes were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham), according to the manufacturer's instructions. The rabbit polyclonal anti-Ob-R antibody directed against amino acids 541–840 mapping within an internal domain of Ob-R of human origin was used for detection of short and long isoforms of Ob-R of human or rat.

#### Statistical Analysis

Data were compared by repeated-measures ANOVA, followed by *U*-test of Mann-Whitney when appropriate or Mann-Whitney test alone for single comparisons. Differences with *P* < 0.05 were considered significant. Data were analyzed by using Statview 4.57 for Windows (Abacus Concepts, Berkeley, CA) and are presented as means  $\pm$  SE.

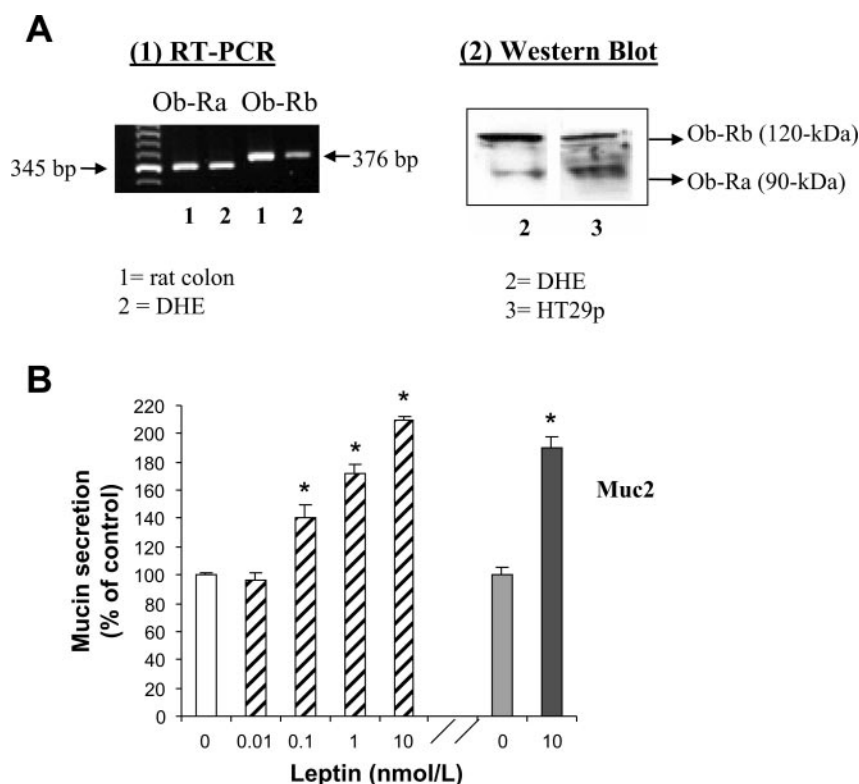


Fig. 1. Rat intestinal DHE cells express functional leptin receptors. *A(1)*: evidence for leptin receptors (Ob-Ra and Ob-Rb) mRNA in DHE cells. Total RNA was extracted from DHE cells and rat colon and analyzed by RT-PCR using specific primers for short isoform (Ob-Ra) and long isoform (Ob-Rb) of leptin receptors. Electrophoretic PCR gel demonstrating the presence of Ob-Ra and Ob-Rb transcripts in DHE cells is shown; transcript expression in rat colon is shown as reference. *(2)*: representative Western blot of leptin receptors in DHE cells and HT29p colonic cells (positive control). Total protein was isolated from DHE and HT29p cells, and equal amounts of proteins were subjected to Western blot analysis using an antibody for the leptin receptors. Note the presence of immunoreactive bands at expected size indicating expression of Ob-Ra and Ob-Rb in DHE cells. *B*: leptin treatment stimulates mucin glycoprotein secretion in DHE rat colonic epithelial cells. After 24-h serum starvation, cells were incubated without (control, open bar) or with leptin (0.01–10 nmol/l, hatched bars) at 37°C for 60 min. The amount of mucin glycoproteins in culture media was measured by enzyme-linked lectin assay (ELLA) using the biotinylated wheat germ agglutinin. The data are expressed as mucin glycoproteins secretion in percent of control. *Muc2* (shaded bars) was measured by ELISA as described in MATERIALS AND METHODS. Each point represents mean  $\pm$  SE of 3–4 experiments performed in triplicate. \**P* < 0.05 vs. control.



## RESULTS

*Expression of Leptin Receptor and Effect of Leptin on the Secretion of Mucins in DHE Cells*

To assess the direct effect of leptin on goblet cells and mucin gene expression, we used the rat intestinal DHE cell line, which synthesizes and secretes mucins. We first examined the expression of leptin receptors in DHE cells using RT-PCR. Predicted PCR products of Ob-Ra (short isoform) and Ob-Rb (long isoform) were obtained at 347 and 375 bp, respectively, using specific primers in both rat colon and DHE cells (Fig. 1A). The identities of the PCR products were confirmed by DNA sequence analysis. To further confirm the expression of these receptors, Western blot analysis was performed using the anti-Ob-R antibody (H-300, Santa Cruz Biotechnology). This antibody recognizes all isoforms (short and long; namely, Ob-Ra, b, c, d, and f). Analysis of immunoblots revealed a dominant 120-kDa protein band in DHE cells (Fig. 1A). This band corresponds to the long Ob-Rb isoform. In addition, another band at ~90-kDa consistent with the short Ob-Ra isoform of the receptor was observed. These two bands were also seen in parental HT29 colonic cells that are known to express both long and short isoforms and that were used as a positive control.

To investigate whether a direct effect of leptin on the induction of mucus secretion was in keeping with the presence of functional leptin receptor on rat DHE cells, we exposed cell cultures to leptin (0.01–10 nmol/l) for 60 min. As shown in Fig. 1B, leptin induced a dose-dependent secretion of mucin-like glycoprotein with a maximal response achieved with 10 nmol/l leptin ( $210 \pm 3\%$  of control,  $P < 0.05$ ). Using an ELISA for *Muc2*, we also found that 10 nmol/l leptin induced a rise in *Muc2* secretion ( $190 \pm 8\%$  of control,  $P < 0.05$ ).

*Leptin Stimulates the Expression of Muc2, Muc3, and Muc4 in DHE Cells*

To analyze the effect of leptin on the expression of *Muc1*–*Muc5AC*, we cultured the mucin-secreting DHE cells without or with leptin (10 nmol/l) for 60 min. Total RNA was then isolated and mucin mRNA levels were analyzed by RT-PCR. As shown in Fig. 2, addition of leptin to the incubation medium induced a significant increase in *Muc2*, *Muc3*, and *Muc4* mRNA levels compared with control cells. In contrast, leptin did not modify the expression of *Muc1* and only induced a small increase in *Muc5AC* mRNA level ( $P > 0.05$ ). RT-PCR products of cyclophilin A mRNA, used as internal control, were unaffected by leptin.

The dose-response effect of leptin (0.01–10 nmol/l) on the expression of *Muc2*, *Muc3*, and *Muc4* was further evaluated after 60 min of treatment. RT-PCR analysis using Scion Image showed that leptin induced a dose-dependant increase in *Muc2*, *Muc3*, and *Muc4* mRNA levels compared with controls (Fig. 3). Since colonic mucus is mainly composed of *Muc2*, we performed quantitative RT-PCR to precisely quantify the effect of leptin on the expression of *Muc2* in the DHE cells. The first significant response was observed with 0.1 nmol/l leptin ( $158 \pm 2\%$  of controls,  $P < 0.05$ ) and the maximal response was obtained with 1 nmol/l leptin ( $189 \pm 1\%$  of controls,  $P < 0.05$ ).

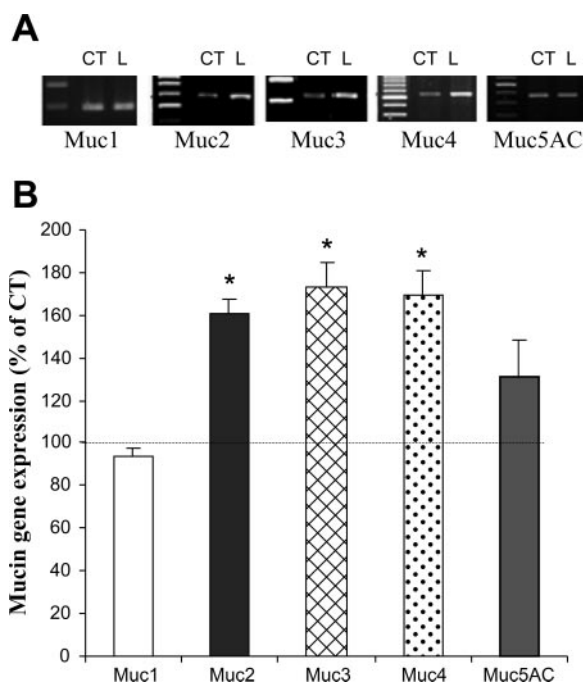


Fig. 2. Leptin (10 nmol/l) specifically modulates *Muc2*, *Muc3*, and *Muc4* mRNA expression in the rat intestinal DHE cell line. After overnight serum starvation, the cells were incubated without (control; CT) or with leptin (L) at 37°C for 60 min. Amplified PCR products were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. A: images are representative of 3 separate experiments performed in triplicate. B: the gels obtained from semiquantitative RT-PCR were pixelized and densitometrically analyzed with Scion Image software. Each point represents mean  $\pm$  SE of 3 experiments performed in triplicate. \* $P < 0.05$  vs. control.

*Intracolonic Leptin Increases Muc2, Muc3, and Muc4 Mucin Gene Expression in Rat in Vivo*

To address the relevance of the findings obtained from rat cultured gobletlike cells, we investigated the effect of leptin on the expression of secreted and membrane-associated mucins in vivo in the rat perfused colon model. Luminal perfusion with 0.1–100 nmol/l leptin during 60 min induced a dose-dependant increase in *Muc2*, *Muc3*, and *Muc4* mRNA levels, compared with control. The maximal response was observed with 10 nmol/l leptin for *Muc2* and *Muc4* ( $165 \pm 3$  and  $187 \pm 25\%$  of controls, respectively,  $P < 0.05$ ) and with 100 nmol/l leptin for *Muc3* ( $194 \pm 3\%$  of controls,  $P < 0.05$ ). In contrast, leptin did not modify the expression of *Muc1*. RT-PCR products of cyclophilin A mRNA, used as internal control, were unaffected by leptin.

*Leptin Stimulates MUC2, MUC4, MUC5AC Expression in HT29-MTX Cells*

*Expression of leptin receptors in HT29-MTX cells.* Our study was then extended to HT29-MTX cells, a human colonic cell line known to synthesize and secrete mucins. In a previous experiment (33), we showed by RT-PCR that HT29-MTX cells expressed Ob-Rb receptors, and that leptin increased mucin secretion in this cell line. Western blot analysis of immunoreactive Ob receptors revealed here a band at ~120 kDa and also another one at 90 kDa, as observed in DHE cells. The transcripts of the leptin receptors Ob-Ra and Ob-Rb were also evidenced by RT-PCR (Fig. 4).

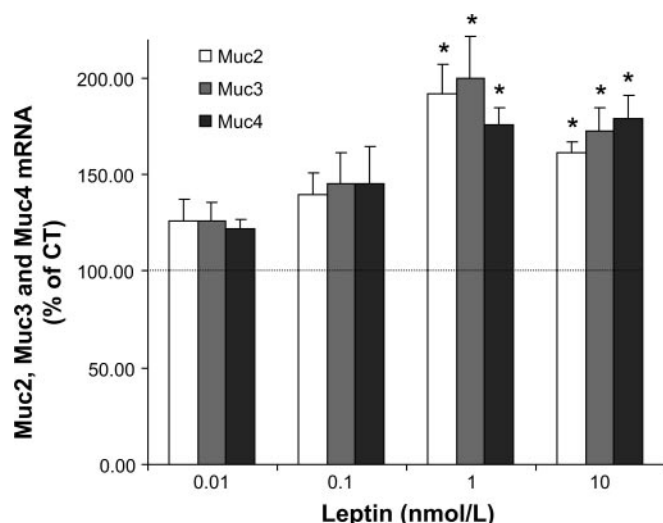


Fig. 3. Leptin dose dependently increases the level of *Muc2*, *Muc3*, and *Muc4* mRNA in DHE cells. DHE cells were exposed to different concentrations of leptin for 60 min. Total RNA was isolated and mucin mRNA levels were analyzed by RT-PCR. The gels obtained from semiquantitative RT-PCR were pixelized and densitometrically analyzed with Scion Image software. Each point represents mean  $\pm$  SE of 3 experiments performed in triplicate. \* $P < 0.05$  vs. control.

**Leptin increases the expression of mucin genes.** RT-PCR analysis using Scion Image then showed that addition of leptin (10 nmol/l) to the incubation medium for 60 min induced an increase in *MUC2*, *MUC4*, and *MUC5AC* mRNA levels compared with controls (Fig. 5A). In contrast, leptin did not modify the expression of *MUC1* and *MUC3*. RT-PCR products of cyclophilin A mRNA, used as internal control, were unaffected by leptin.

The stimulatory effect of leptin on the expression of *MUC2*, *MUC4*, and *MUC5AC* was dose dependent (Fig. 5B). The major secreted mucin produced by HT29-MTX cells is *MUC5AC*. To precisely quantify the effect of leptin on the expression of this mucin, we further performed quantitative RT-PCR. The level of *MUC5AC* mRNA was increased threefold following 60 min of treatment with leptin (10 nmol/l,  $P < 0.05$ ) (Fig. 6A).

#### Mechanisms Involved in Leptin-Induced Mucin Expression in HT29-MTX Cells

The intracellular mechanisms involved in the effect of leptin were investigated on two mucins: *MUC5AC*, the main HT29-MTX secreted mucin, and *MUC4*, the membrane-associated mucin. To study whether the leptin receptor was involved in

mucin expression and secretion, HT29-MTX cells were pre-treated for 10 min at 37°C with the triple mutein of human leptin (L39A/D40A/F41A, 25 nmol/l) used as an antagonist, before addition of 1 nmol/l leptin for 60 min. A 25-molar excess of the mutein was used owing to the fact that both leptin and leptin mutein exhibit identical affinity toward leptin receptor (30). Such an excess is required to ensure 90–95% occupation of leptin receptor by the latter. Data obtained with quantitative RT-PCR showed that the effect of leptin on *MUC5AC* expression was inhibited by the L39A/D40A/F41A mutein, while the antagonist alone had no effect on *MUC5AC* mRNA level (Fig. 6A). L39A/D40A/F41A mutein also inhibited the rise in *MUC4* mRNA level induced by leptin (data not shown).

As shown in Fig. 6B, the L39A/D40A/F41A mutein blocked leptin-induced mucinlike glycoprotein secretion. In contrast, L39A/D40A/F41A mutein alone had no effect on mucin secretion.

To identify the signaling pathways involved in leptin-mediated mucin upregulation, we first studied the effect of a MAPK kinase inhibitor (U0126, 10  $\mu$ mol/l) on the mucin mRNA increase induced by leptin in HT29-MTX cells. The cells were pretreated for 10 min at 37°C with U0126 before addition of leptin (1 nmol/l, 60 min). Data obtained with quantitative RT-PCR showed that the effect of leptin on *MUC5AC* expression was completely inhibited by U0126 (Fig. 7). This blockade of leptin stimulation also occurred with the PKC inhibitor Gö6976 (1  $\mu$ mol/l) and the PI3K inhibitor LY-294002 (10  $\mu$ mol/l). U0126, Gö6976, and LY-294002 also inhibited the rise in the *MUC4* mRNA level induced by leptin (data not shown). In contrast, the inhibitor of the JAK/STAT pathway (AG 490, 50  $\mu$ mol/l) was without effect on the increased expression of *MUC5AC* and *MUC4* induced by leptin. The inhibitors of PKC, PI3K, MAPK, and JAK/STAT pathway, used alone, had no effect on mucin expression.

#### DISCUSSION

The colonic mucus layer is an important element of the protection systems developed at the colonic epithelial cell level. Recently, we showed that leptin had stimulatory effect on mucin secretion *in vivo* in rat colon (33). Here, we demonstrated that leptin increases the expression of secreted mucin gene as well as membrane-associated mucin gene in rat and human colonic gobletlike cells and in rat colon *in vivo*. This stimulation by leptin is dependent on activation of leptin receptors present on the goblet cells and on PKC, PI3K, and MAPK signaling pathways. Taken together, these data suggest

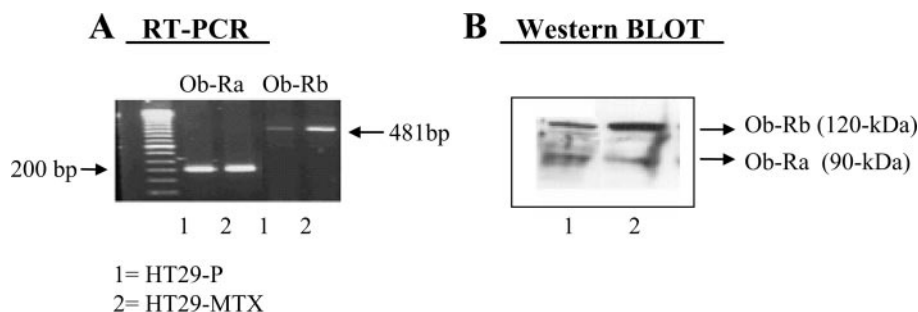


Fig. 4. Evidence for leptin receptors (Ob-Ra and Ob-Rb) mRNA in HT-29-MTX cells. A: electrophoretic PCR gels demonstrating the presence of leptin receptor transcripts in HT29-MTX cells. Transcript expression in parental HT29 is shown as reference. B: Western blot analysis of the leptin receptor isoforms.

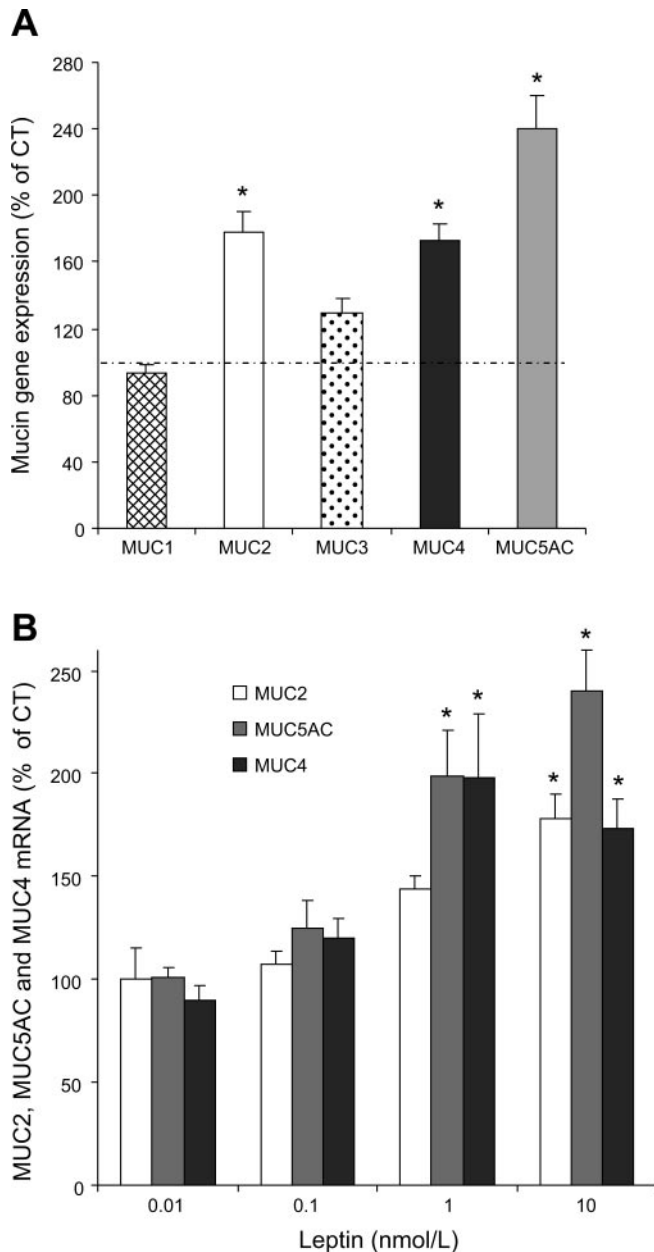


Fig. 5. Leptin specifically modulates *MUC2*, *MUC4*, and *MUC5AC* mRNA expression in the human colonic HT29-MTX cell line. **A**: effect of 10 nmol/l leptin (60 min) on the expression of *MUC1*-*MUC5AC* in HT29-MTX cells. Total RNA was isolated and mucin mRNA levels were analyzed by RT-PCR. The gels obtained from semiquantitative RT-PCR were pixelized and densitometrically analyzed with Scion Image software. Each point represents mean  $\pm$  SE of 3 experiments performed in triplicate. \* $P < 0.05$  vs. control. **B**: leptin dose dependently increases the level of *MUC2*, *MUC4*, and *MUC5AC* mRNA in HT29-MTX cells. HT29-MTX cells were exposed to different concentrations of leptin for 60 min. The gels obtained from semiquantitative RT-PCR were pixelized and densitometrically analyzed with Scion Image software. Each point represents mean  $\pm$  SE of 3 experiments performed in triplicate. \* $P < 0.05$  vs. control.

that leptin controls mucin gene expression and may promote protection during colonic injury.

Leptin, a 146-amino acid peptide hormone produced primarily by adipocytes, is considered to play a key role in the regulation of food intake, energy expenditure, and body weight homeostasis (15). Leptin expression has also been identified in

other tissues, including the fundic epithelium of the stomach (27). Leptin is present in the gastric juice, bound to a protein corresponding to the extracellular domain of the leptin receptor (soluble receptor) that allows leptin to cope with the harsh conditions of the gastric juice (9). Thereafter, leptin enters the intestine, where it regulates nutrient absorption (7, 13). On the other hand, leptin is considered, both structurally and function-

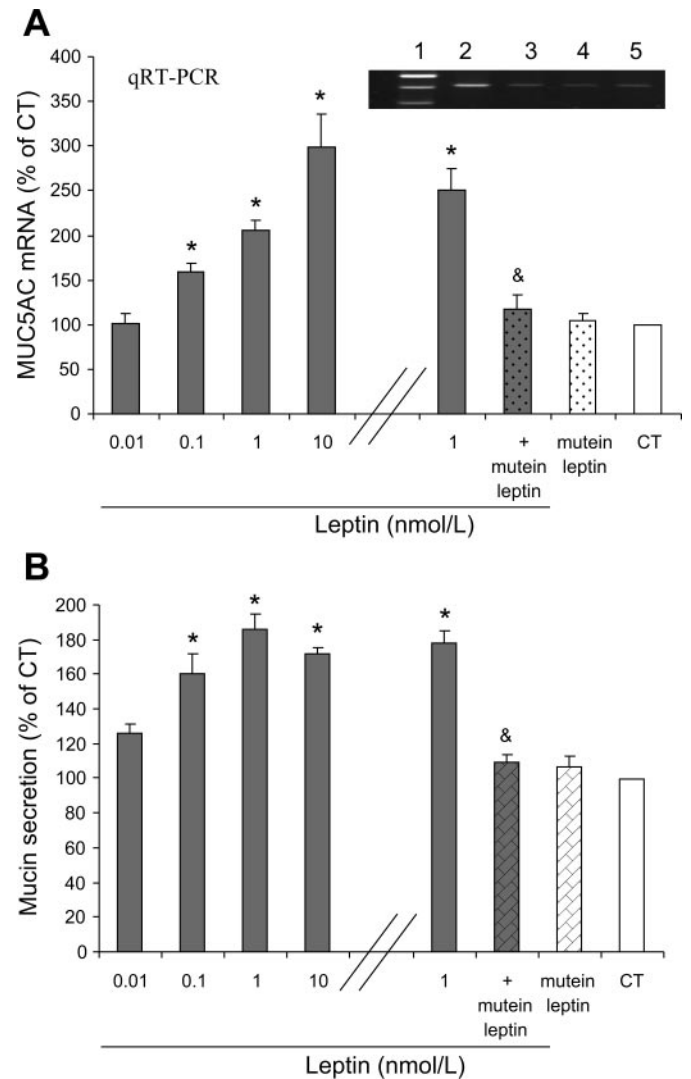


Fig. 6. Human mucus-secreting HT29-MTX cells are responsive to leptin through an Ob-R-dependent pathway. **A**: effect of the L39A/D40A/F41A mutein (leptin antagonist) on leptin-induced *MUC5AC* expression. *MUC5AC* mRNA from the 60-min-stimulated cells were analyzed by quantitative RT-PCR. The expression of *MUC5AC* was normalized to cyclophilin A mRNA level in each sample. In some experiments, HT29-MTX cells were preincubated for 10 min with the leptin antagonist L39A/D40A/F41A mutein (25 nmol/l) before the addition of 1 nmol/l leptin for 60 min. The results are expressed as percent of associated controls (mean  $\pm$  SE). \* $P < 0.05$  vs. control. & $P < 0.05$  vs. leptin alone. **Inset**: gels obtained from semiquantitative RT-PCR of *MUC5AC*. Lane 1: DNA markers. Lane 2: leptin. Lane 3: leptin + mutein. Lane 4: mutein alone. Lane 5: control. **B**: effect of the L39A/D40A/F41A mutein (leptin antagonist) on mucin glycoprotein secretion induced by leptin. HT29-MTX cells were preincubated for 10-min with the leptin antagonist L39A/D40A/F41A mutein (25 nmol/l) before the addition of leptin (1 nmol/l) for 60 min. Mucinlike glycoprotein secretion was determined by ELLA. Each point represents mean  $\pm$  SE of 3 experiments performed in triplicate. \* $P < 0.05$  vs. control (CT). & $P < 0.05$  vs. leptin alone.



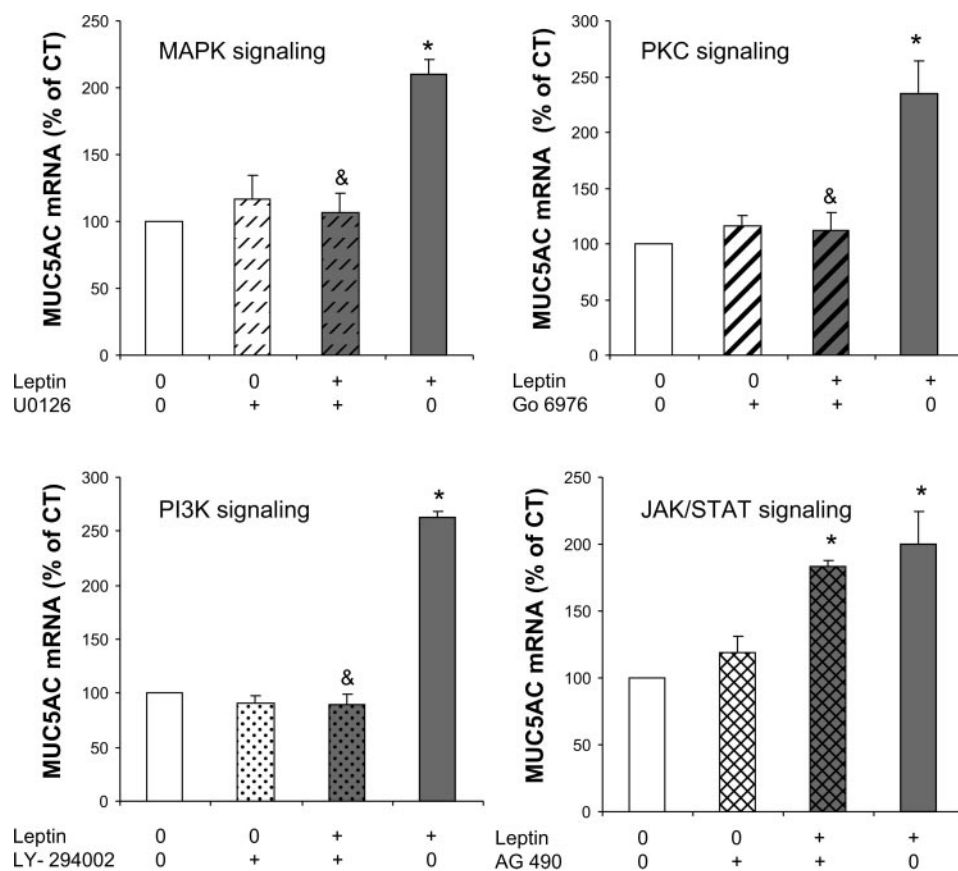


Fig. 7. Effect of leptin on *MUC5AC* gene expression is dependent on MAPK, PKC, and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathways in human mucus-secreting HT29-MTX cells. HT29-MTX cells were preincubated for 10 min with inhibitors of MAPK kinase (U0126, 10  $\mu\text{mol/l}$ ), PKC (Go 6976, 1  $\mu\text{mol/l}$ ), PI3K (LY-294002, 10  $\mu\text{mol/l}$ ), or of JAK/STAT pathway (AG 490, 50  $\mu\text{mol/l}$ ) before the addition of 1 nmol/l leptin in the incubation medium. *MUC5AC* mRNA level was analyzed by quantitative RT-PCR. The expression of *MUC5AC* was normalized to cyclophilin A mRNA level in each sample. Results are presented as percent increase with respect to the untreated control (mean  $\pm$  SE). \* $P < 0.05$  vs. control. & $P < 0.05$  vs. agonist alone.

ally, as a proinflammatory cytokine of the type I superfamily and has structural similarity with interleukin-6 (31). In keeping with this assumption, leptin significantly increased in acute infection or during inflammatory processes (31). Interestingly, leptin has been detected both in the lumen and in the colonic epithelial cells in inflamed zone of humans with ulcerative colitis but not in the normal colonic epithelial cells (40) and the expression of leptin receptor (Ob-R) has been reported on colonocytes (18). Here, we demonstrated that leptin increased the expression of the secreted mucin *Muc2* and of the membrane-associated mucins *Muc3* and *Muc4* in rat colonic DHE cells. The concentrations of leptin used in our in vitro study were in the range of 0.1 to 10 nmol/l, the maximal effects on mucin expression being obtained at the concentration of 1 nmol/l. In our previous paper, we showed that leptin-immunoreactive protein was present in the luminal contents from healthy rat colon at a concentration of 0.3 nmol/l (33). However, it has been pointed out that the level of luminal leptin in inflamed colon was  $\sim 15$ -fold higher than normal (40). On the basis of these studies, it may be speculated that our data highlight an important direct effect of leptin on colonic epithelial cells that may be of major importance during colonic inflammation and injury.

It is worth mentioning that an increase in mucin production has been demonstrated as a genuine component of inflammatory responses of epithelial tissue (4, 37). Indeed, the expression of mucin genes appears to be controlled by several cytokine mediators that may regulate the maintenance of protective mucus gel during acute phase of injury. Recent data have thus demonstrated that *Muc3* can be regulated by the

cytokines Il-4, Il-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  (38). *Muc4* expression is also known to be enhanced by Il-4, Il-9, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  (3, 11, 12, 32). Similarly, several studies showed that expression of the secreted mucin *Muc2* is increased upon Il-1, Il-4, Il-13 or TNF- $\alpha$  stimulation (2, 14, 21, 23). Together, these data suggest that cytokines, and in particular members of the IL-6 cytokine family to which leptin belongs, are crucial factors of mucin gene activation during inflammation.

It is important to underline that leptin increased here the level of transcripts of *Muc2* as well as those of *Muc3* and *Muc4* in both DHE cells and rat colon. The overall secretion of *Muc2* was also observed in DHE cells after 1 h of treatment. The *Muc2* mucin is the main secreted gel-forming mucin produced in colonic goblet cells and constitutes the framework for the intraluminal mucus gel. Thus this upregulation of *Muc2* expression and secretion is particularly relevant and may be proposed as a protective mechanism to wash out noxious agents during mucosal injury. The effect of leptin on the membrane-associated mucins *Muc3* and *Muc4* may also play an essential role in intestinal mucosal defense because, beside their protective effect on epithelia, these mucins have been shown to be involved in growth, cell signaling, and modulation of immune system (4). Accordingly, a recent study demonstrated that *Muc3* plays an active role in epithelial restitution and may represent a novel therapeutic agent for intestinal wound healing (19). The biological consequences of the increased expression of *Muc2*, *Muc3*, and *Muc4* induced by leptin may thus be important in situations of colonic injury to promote mucosal healing and to restore epithelial protection. This hypothesis is supported by the observation that leptin

exerts a potent protective activity against acetic acid-induced colonic inflammation (6) and also in normal wound healing (29).

In the course of characterizing the effects of leptin, we extended the data obtained in rat to the human colonic goblet-like HT29-MTX and demonstrated that leptin induced an increase of the expression of the major secreted mucin *MUC5AC* produced in this cell line, as well as the expression of *MUC2* and *MUC4*, thus suggesting that these responses may take place in human as well. Since *MUC4* is not restricted to goblet cells but is also expressed by colonocytes, the possibility exists that the protective effect afforded by increased *MUC4* through goblet cells could also be considered for the entire colonic epithelium. Such an hypothesis requires further investigation.

The leptin receptor is encoded by the diabetes gene (*db*) and is alternatively spliced, resulting in six isoforms that differ only in the length of their intracellular domains: one long form (Ob-Rb), four shorter forms (Ob-Ra, c, d, f), and a soluble one (Ob-Re) (1). The long-form receptor (Ob-Rb) is expressed mainly in the hypothalamus and plays an important role in the regulation of food intake, energy expenditure, and endocrine function. In contrast, the short-form receptor (Ob-Ra) is expressed fairly ubiquitously, representing the major isoform in many peripheral tissues. In the present study, we demonstrated the presence of Ob-Rb and Ob-Ra receptors on epithelial DHE and HT29-MTX gobletlike cells, in line with previous data showing the expression of leptin receptors on colonic epithelial cells in normal tissue (5, 18). We showed that pretreatment of the HT29-MTX cells with a specific human leptin antagonist inhibited the effect of leptin on mucin secretion and expression, confirming the functional relevance of these receptors and their involvement in the response observed. In addition, the finding that L39A/D40A/F41A mutein alone had no effect on mucin secretion compared with the control indicates that the basic expression and secretion of mucins are not dependent on endogenously secreted leptin.

Leptin binding to Ob-R may trigger off multiple signaling pathways including the JAK/STAT and the MAPK pathways but also the stimulation of the PI3K and PKC (31). In our study, we demonstrated that the leptin-induced *MUC5AC* and *MUC4* expression was inhibited by a MAPK kinase-specific inhibitor, U0126, thus suggesting the involvement of this pathway in the HT29-MTX cell response. Similarly, studies performed in the colonic cell line LS174T showed that the expression of *MUC2* was stimulated by IL-4, IL-13, and TNF- $\alpha$  through a process involving MAPK activation (21). In the human pulmonary carcinoma cell line, NCI-H292, the MAPK pathway was also found to play a role in the *MUC5AC* mRNA expression induced by TNF- $\alpha$ . Additionally, we found that pharmacological inhibition of PKC and PI3K activity prevented the leptin stimulation of *MUC5AC* and *MUC4* mucin expression. These findings are in accordance with our previous study showing that leptin induced mucin secretion in HT29-MTX cells through the activation of a PI3K and a PKC-dependent pathway (33). Together, our data suggest that leptin-mediated mucin expression in colonic cells requires the activation of PI3K-, PKC-, and MAPK-dependent pathways.

In conclusion, our results show that human and rat goblet cell lines express the Ob-Rb receptor and Ob-Ra to a lesser extent. Through activation of these receptors, leptin triggers

mucin secretion and expression of both secreted and membrane-bound mucins. Originating from the stomach and/or locally released during inflammation, leptin might thus be one of the actors of mucosal defense. These findings disclose what may be an important pathway in the defense mechanisms of the colonic mucosa.

## REFERENCES

- Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. *Physiol Behav* 81: 223–241, 2004.
- Ahn DH, Crawley SC, Hokari R, Kato S, Yang SC, Li JD, Kim YS. TNF-alpha activates MUC2 transcription via NF-kappaB but inhibits via JNK activation. *Cell Physiol Biochem* 15: 29–40, 2005.
- Andrianifahanana M, Agrawal A, Singh AP, Moniaux N, van Seuningen I, Aubert JP, Meza J, Batra SK. Synergistic induction of the MUC4 mucin gene by interferon-gamma and retinoic acid in human pancreatic tumour cells involves a reprogramming of signalling pathways. *Oncogene* 24: 6143–6154, 2005.
- Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta* 1765: 189–222, 2006.
- Aparicio T, Guilmeau S, Goiot H, Tsocas A, Laigneau JP, Bado A, Sobhani I, Lehy T. Leptin reduces the development of the initial precancerous lesions induced by azoxymethane in the rat colonic mucosa. *Gastroenterology* 126: 499–510, 2004.
- Bozkurt A, Cakir B, Ercan F, Yegen BC. Anti-inflammatory effects of leptin and cholecystokinin on acetic acid-induced colitis in rats: role of capsaicin-sensitive vagal afferent fibers. *Regul Pept* 116: 109–118, 2003.
- Buyse M, Sitaraman SV, Liu X, Bado A, Merlin D. Luminal leptin enhances CD147/MCT-1-mediated uptake of butyrate in the human intestinal cell line Caco2-BBE. *J Biol Chem* 277: 28182–28190, 2002.
- Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23: 77–99, 2004.
- Cammisotto PG, Gingras D, Renaud C, Levy E, Bendayan M. Secretion of soluble leptin receptors by exocrine and endocrine cells of the gastric mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G242–G249, 2006.
- Claustre J, Toumi F, Trompette A, Jourdan G, Guignard H, Chayvialle JA, Plaisancie P. Effects of peptides derived from dietary proteins on mucus secretion in rat jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G521–G528, 2002.
- Damera G, Xia B, Ancha HR, Sachdev GP. IL-9 modulated MUC4 gene and glycoprotein expression in airway epithelial cells. *Biosci Rep* 26: 55–67, 2006.
- Damera G, Xia B, Sachdev GP. IL-4 induced MUC4 enhancement in respiratory epithelial cells in vitro is mediated through JAK-3 selective signaling. *Respir Res* 7: 39, 2006.
- Ducroc R, Guilmeau S, Akasbi K, Devaud H, Buyse M, Bado A. Luminal leptin induces rapid inhibition of active intestinal absorption of glucose mediated by sodium-glucose cotransporter 1. *Diabetes* 54: 348–354, 2005.
- Enss ML, Cornberg M, Wagner S, Gebert A, Henrichs M, Eisenblatter R, Beil W, Kownatzki R, Hedrich HJ. Proinflammatory cytokines trigger MUC gene expression and mucin release in the intestinal cancer cell line LS180. *Inflamm Res* 49: 162–169, 2000.
- Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763–770, 1998.
- Gouyer V, Wiede A, Buisine MP, Dekeyser S, Moreau O, Lesuffleur T, Hoffmann W, Huet G. Specific secretion of gel-forming mucins and TFF peptides in HT-29 cells of mucin-secreting phenotype. *Biochim Biophys Acta* 1539: 71–84, 2001.
- Guilmeau S, Buyse M, Tsocas A, Laigneau JP, Bado A. Duodenal leptin stimulates cholecystokinin secretion: evidence of a positive leptin-cholecystokinin feedback loop. *Diabetes* 52: 1664–1672, 2003.
- Hardwick JC, Van Den Brink GR, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 121: 79–90, 2001.
- Ho SB, Dvorak LA, Moor RE, Jacobson AC, Frey MR, Corredor J, Polk DB, Shekels LL. Cysteine-rich domains of muc3 intestinal mucin promote cell migration, inhibit apoptosis, and accelerate wound healing. *Gastroenterology* 131: 1501–1517, 2006.
- Inatomi T, Tisdale AS, Zhan Q, Spurr-Michaud S, Gipson IK. Cloning of rat Muc5AC mucin gene: comparison of its structure and tissue

- distribution to that of human and mouse homologues. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 789–797, 1997.
21. Iwashita J, Sato Y, Sugaya H, Takahashi N, Sasaki H, Abe T. mRNA of MUC2 is stimulated by IL-4, IL-13 or TNF- $\alpha$  through a mitogen-activated protein kinase pathway in human colon cancer cells. *Immunol Cell Biol* 81: 275–282, 2003.
  22. Jass JR, Walsh MD. Altered mucin expression in the gastrointestinal tract: a review. *J Cell Mol Med* 5: 327–351, 2001.
  23. Kim YD, Jeon JY, Woo HJ, Lee JC, Chung JH, Song SY, Yoon SK, Baek SH. Interleukin-1 $\beta$  induces MUC2 gene expression and mucin secretion via activation of PKC-MEK/ERK, and PI3K in human airway epithelial cells. *J Korean Med Sci* 17: 765–771, 2002.
  24. Kyo K, Muto T, Nagawa H, Lathrop GM, Nakamura Y. Associations of distinct variants of the intestinal mucin gene MUC3A with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Hum Genet* 46: 5–20, 2001.
  25. Kyo K, Parkes M, Takei Y, Nishimori H, Vyas P, Satsangi J, Simmons J, Nagawa H, Baba S, Jewell D, Muto T, Lathrop GM, Nakamura Y. Association of ulcerative colitis with rare VNTR alleles of the human intestinal mucin gene, MUC3. *Hum Mol Genet* 8: 307–311, 1999.
  26. Lesuffleur T, Porchet N, Aubert JP, Swallow D, Gum JR, Kim YS, Real FX, Zweibaum A. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucin-secreting HT-29 cell subpopulations. *J Cell Sci* 106: 771–783, 1993.
  27. Lewin MJ, Bado A. Gastric leptin. *Microsc Res Tech* 53: 372–376, 2001.
  28. Lin J, Ho S, Shekels L, Paparella MM, Kim Y. Mucin gene expression in the rat middle ear: an improved method for RNA harvest. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 108: 762–768, 1999.
  29. Murad A, Nath AK, Cha ST, Demir E, Flores-Riveros J, Sierra-Honigmann MR. Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing. *FASEB J* 17: 1895–1897, 2003.
  30. Niv-Spector L, Gonen-Berger D, Gourdou I, Biener E, Gussakovsky EE, Benomar Y, Ramanujan KV, Taouis M, Herman B, Callebaut I, Djiane J, Gertler A. Identification of the hydrophobic strand in the A-B loop of leptin as major binding site III: implications for large-scale preparation of potent recombinant human and ovine leptin antagonists. *Biochem J* 391: 221–230, 2005.
  31. Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Lett* 579: 295–301, 2005.
  32. Perrais M, Pigny P, Ducourouble MP, Petitprez D, Porchet N, Aubert JP, Van Seuning I. Characterization of human mucin gene MUC4 promoter: importance of growth factors and proinflammatory cytokines for its regulation in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 276: 30923–30933, 2001.
  33. Plaisancie P, Ducroc R, El Homsy M, Tsocas A, Guilmeau S, Zoghbi S, Thibaudeau O, Bado A. Luminal leptin activates mucin-secreting goblet cells in the large bowel. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G805–G812, 2006.
  34. Porchet N, Aubert JP. [MUC genes: mucin or not mucin? That is the question.] *Med Sci (Paris)* 20: 569–574, 2004.
  35. Pullan RD, Thomas GA, Rhodes M, Newcombe RG, Williams GT, Allen A, Rhodes J. Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* 35: 353–359, 1994.
  36. Shaoul R, Okada Y, Cutz E, Marcon MA. Colonic expression of MUC2, MUC5AC, and TFF1 in inflammatory bowel disease in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38: 488–493, 2004.
  37. Shekels LL, Anway RE, Lin J, Kennedy MW, Garside P, Lawrence CE, Ho SB. Coordinated Muc2 and Muc3 mucin gene expression in *Trichinella spiralis* infection in wild-type and cytokine-deficient mice. *Dig Dis Sci* 46: 1757–1764, 2001.
  38. Shekels LL, Ho SB. Characterization of the mouse Muc3 membrane bound intestinal mucin 5' coding and promoter regions: regulation by inflammatory cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1627: 90–100, 2003.
  39. Singh PK, Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol* 16: 467–476, 2006.
  40. Sitaraman S, Liu X, Charrier L, Gu LH, Ziegler TR, Gewirtz A, Merlin D. Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD. *FASEB J* 18: 696–698, 2004.
  41. Stadnyk AW. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can J Gastroenterol* 16: 241–246, 2002.
  42. Takaya K, Ogawa Y, Isse N, Okazaki T, Satoh N, Masuzaki H, Mori K, Tamura N, Hosoda K, Nakao K. Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs—identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun* 225: 75–83, 1996.
  43. Tei M, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Gipson IK. Vitamin A deficiency alters the expression of mucin genes by the rat ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 82–88, 2000.
  44. Trompette A, Blanchard C, Zoghbi S, Bara J, Claustre J, Jourdan G, Chayvialle JA, Plaisancie P. The DHE cell line as a model for studying rat gastro-intestinal mucin expression: effects of dexamethasone. *Eur J Cell Biol* 83: 347–358, 2004.
  45. Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, Buller HA, Dekker J, Van Seuning I, Renes IB, Einerhand AW. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131: 117–129, 2006.
  46. Velcich A, Yang W, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, Kuchelapati R, Lipkin M, Yang K, Augenlicht L. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 295: 1726–1729, 2002.
  47. Wu K, Fregien N, Carraway KL. Molecular cloning and sequencing of the mucin subunit of a heterodimeric, bifunctional cell surface glycoprotein complex of ascites rat mammary adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* 269: 11950–11955, 1994.
  48. Zoghbi S, Trompette A, Claustre J, El Homsy M, Garzon J, Jourdan G, Scoazec JY, Plaisancie P.  $\beta$ -Casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a  $\mu$ -opioid pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G1105–G1113, 2006.

**Discussion Générale**  
**Conclusion**  
**et Perspectives**

L'épithélium gastrointestinal est revêtu d'une couche de mucus, cette barrière protectrice lui permettant de faire face à des conditions agressives de nature chimique, mécanique ou bactérienne. Les molécules structurales majeures du gel de mucus sont les mucines, produites et secrétées par les cellules caliciformes. Ces cellules étant situées à l'interface entre l'organisme et le chyme intestinal, elles peuvent recevoir, au niveau de leur pôle basolatéral, des messages nerveux et hormonaux tandis que, par leur pôle apical, elles sont à même de percevoir des informations en provenance du contenu luminal. La leptine, produite principalement par les adipocytes, a d'abord été considérée pour son rôle principal dans la régulation de la prise alimentaire et de l'équilibre énergétique. L'expression de la leptine a été également relevée dans d'autres tissus, y compris l'épithélium fundique de l'estomac, et d'autres fonctions ont été reliées à cette hormone.

La leptine gastrique est sécrétée principalement dans la lumière digestive. Plusieurs auteurs ont montré que la leptine, libérée par l'estomac, peut atteindre la lumière intestinale sous forme active. La leptine est en effet présente dans le suc gastrique, liée à son récepteur soluble, ce qui lui permet de faire face à des conditions enzymatiques difficiles [268]. Par ailleurs, la présence des récepteurs Ob-R de la leptine sur les cellules intestinales épithéliales suggère également la possibilité que la leptine, qui parvient au niveau de la lumière intestinale, puisse agir directement sur l'épithélium intestinal pour contrôler ses diverses fonctions. Ainsi, Ducroc *et al* ont montré que la leptine gastrique jouait un rôle essentiel dans la régulation du transport glucidique intestinal *via* le transporteur SGLT1 en induisant une diminution de l'absorption du glucose par les entérocytes [239]. Buyse *et al* ont montré également que cette hormone peut agir sur les entérocytes en augmentant l'absorption des peptides *via* le transporteur PepT-1 localisé au niveau du pôle apical de ces cellules [241]. En plus d'une production au niveau gastrique, Sitaraman *et al* ont récemment démontré que lors de l'inflammation, les cellules épithéliales coliques humaines secrètent de la leptine dans la lumière intestinale [5]. La concentration en leptine étant alors 15 fois plus élevée que celle trouvée dans la lumière du côlon normal. La détection de la leptine dans le contenu colique d'une part et la mise en évidence de récepteurs de la leptine au pôle apical des colonocytes d'autre part suggèrent fortement que la leptine luminale puisse jouer un rôle dans la régulation des fonctions de l'épithélium colique [5, 241]. En effet, il a été montré que la leptine appliquée au pôle apical des cellules coliques Caco-2 est capable d'augmenter l'absorption du butyrate *via* le transporteur de monocarboxylate de type I « MCT1 » [216]. Dans le cadre de



mon travail de thèse, je me suis intéressé aux effets de la leptine sur une autre population de cellules épithéliales coliques, les cellules caliciformes.

Ces travaux ont été réalisés *in vivo* chez le rat et *in vitro* sur des lignées cellulaires intestinales mucipares issues d'adénocarcinomes coliques : la lignée DHE de rat et la lignée humaine HT-29 MTX. La lignée DHE est dérivée d'un adénocarcinome colique, obtenu chez le rat BD-IX après traitement à la 1,2-diméthylhydrazine. Elle exprime rMuc1, rMuc2, rMuc3, rMuc4 et rMuc5AC. Les cellules HT29-MTX proviennent d'un sous-clonage de la lignée parentale HT29 (cellules issues d'un adénocarcinome colique humain) après traitement par le Méthotrexate (MTX) à  $10^{-6}$ M [269]. La sous-population ainsi obtenue reste stable, même dans un milieu dépourvu de MTX. A confluence, ces cellules se différencient en cellules à mucus et expriment les mucines MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC6, MUC11 et MUC12.

Après avoir montré la présence de la leptine dans le contenu colique de rats sains, les résultats obtenus ont révélé un impact jusque-là ignoré de la leptine luminale sur la sécrétion de mucines dans un modèle de côlon isolé perfusé *in vivo*. La leptine était également capable d'augmenter l'expression de la principale mucine sécrétée rMuc2 et donc de permettre de reconstituer le stock intracellulaire de mucines. L'administration veineuse de leptine a également induit une sécrétion de mucus mais avec une efficacité réduite par rapport à la leptine luminale. La leptine d'origine adipocytaire pourrait donc aussi moduler l'activité sécrétoire des cellules caliciformes. Ces résultats sont corrélés avec la présence des récepteurs de leptine au niveau de la membrane apicale et basolatérale des colonocytes [270].

La leptine, en augmentant la sécrétion de mucus et l'expression de la mucine rMuc2 favoriserait ainsi la protection épithéliale et pourrait donc jouer un rôle majeur dans la protection de la muqueuse colique et dans le maintien du potentiel de défense. En accord avec cette hypothèse, une étude récente montre ainsi que l'administration de leptine exogène permet de réduire les lésions induites dans le côlon par l'acide acétique [271]. Une étude réalisée sur la glande salivaire de rat a également permis de montrer que la leptine permet de contrer les conséquences d'une infection à *porphyromonas gingivalis* en augmentant la synthèse des mucines salivaires [272].

Suite à ces résultats, nous avons analysé, à l'aide des modèles cellulaires, l'effet direct de la leptine sur la sécrétion et l'expression des mucines. La présence des deux récepteurs

(Ob-Ra et Ob-Rb) de la leptine dans les deux lignées coliques mucosécrétantes de rat (DHE) et humaine (HT29-MTX) nous a permis de les utiliser comme modèles.

Nous avons montré que le traitement des cellules DHE par la leptine augmente l'expression de la mucine sécrétée rMuc2 (principale mucine sécrétée par les cellules en gobelet du tractus intestinal) et des mucines membranaires rMuc3 et rMuc4 de façon dose-dépendante. En revanche, l'expression de rMuc1 et rMuc5AC n'était pas modifiée, ce qui tend à montrer qu'il existe une spécificité d'action sur le niveau d'expression de certaines mucines. Ainsi, la leptine induit l'augmentation des transcrits de trois mucines essentielles pour la protection de la muqueuse. Les résultats obtenus montrent également que la leptine exerce un effet précoce sur l'expression de rMuc2, rMuc3 et rMuc4, l'augmentation du niveau des transcrits étant maximale dès une heure de traitement. La leptine, en augmentant à la fois la sécrétion et l'expression de rMuc2, rMuc3 et rMuc4, pourrait donc, jouer un rôle clé de protection de la muqueuse contre les agents nocifs et les maladies inflammatoires. De fait, il a été montré récemment que l'inactivation du gène Muc2 chez la souris se traduit par l'apparition de tumeurs intestinales mais également de colites [1, 2]. Ceci souligne l'importance de cette mucine et de son rôle critique dans la protection du côlon contre les maladies inflammatoires. Nos résultats ont également montré que la leptine augmente l'expression des mucines membranaires rMuc3 et rMuc4. La mucine rMuc3 joue un rôle actif dans la restitution épithéliale tout en stimulant la migration cellulaire et en inhibant l'apoptose *via* son domaine riche en cystéine [273]. La mucine rMuc4 contribue à la protection des surfaces épithéliales des muqueuses et est impliquée dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales [83]. L'effet de la leptine sur les mucines membranaires rMuc3 et rMuc4 pourrait également jouer un rôle essentiel dans le mécanisme de défense de la muqueuse intestinale.

Dans notre étude, la pertinence des données obtenues avec la leptine en physiologie humaine a été suggérée grâce à l'utilisation de la lignée cellulaire intestinale humaine HT29-MTX. Les expériences réalisées sur ces cellules ont mis en évidence un effet de la leptine sur l'augmentation des transcrits de MUC2, MUC4 et MUC5AC. La leptine pourrait donc être un stimulant efficace de la sécrétion et de l'expression des mucines chez le rat comme chez l'homme (figure 21). Nous avons également prouvé que le prétraitement des cellules HT29-MTX avec le L39A/D40A/F41A, utilisé comme antagoniste spécifique des récepteurs Ob-R, inhibe l'effet observé sur la sécrétion et l'expression de mucines, confirmant la mise en jeu de

ces récepteurs dans la réponse observée. Cet antagoniste possède la même affinité que la leptine pour les récepteurs Ob-R et a été développé par NIV-SPECTOR et al, suite à une modalisation du récepteur de la leptine sur celui de l'IL6 [274].

Nous avons voulu ensuite déterminer par quelle voie de transduction la leptine induisait l'augmentation de la sécrétion et de l'expression des mucines. Les voies de transduction du signal régulées par la leptine sont diverses [275]. Dans notre étude, nous avons montré que la leptine stimule l'expression des mucines en passant par les voies de signalisation de la PKC, la PI3K et des MAPK. En accord avec ces résultats, il a été montré que la leptine augmente l'expression des mucines salivaires de rat *via* la voie de la PI3K [276]. Kim *et al* ont également établi que la voie de la PI3K pouvait être impliquée dans la sécrétion de la mucine MUC2 dans la lignée pulmonaire NCI-H292 [222, 277]. Dans cette même lignée, la voie des MAP-kinases s'est également avérée jouer un rôle dans l'expression de MUC5AC induite par le TNF-alpha.

L'altération de la barrière de mucus est retrouvée dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) [278-280]. Il est à noter que l'une des caractéristiques des MICI est la perturbation de l'équilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires, souvent associée à un important infiltrat inflammatoire et à une altération de la muqueuse colique [5]. Des études récentes prouvent par ailleurs que l'épithélium colique humain représente également une source de leptine uniquement lors d'inflammation. Cette hormone a été détectée dans la lumière colique de patients atteints de rectocolite hémorragique ou atteints de maladie de Crohn [5, 31]. Un tel résultat peut être rapproché de la capacité des cellules épithéliales à produire et à sécréter des cytokines participant ainsi directement au développement de l'inflammation intestinale. Ces résultats suggèrent que les cellules épithéliales coliques inflammatoires peuvent constituer l'une des principales sources de leptine luminale chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales. En outre, la présence des récepteurs de la leptine à l'apex des colonocytes, et l'activation du facteur de transcription NF-kB, qui régule l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et immunitaire, par la leptine luminale dans les cellules intestinales Caco-2, suggèrent que la leptine puisse être impliquée dans la physiopathologie des MICI [5]. Dans ce contexte, nos résultats montrant un effet de la leptine sur la sécrétion et l'expression de MUC2, et de mucines membranaires par les cellules caliciformes ne sont pas contradictoires. En effet, la sécrétion et l'expression de mucines semblent être contrôlées par plusieurs

cytokines qui peuvent réguler la formation de la couche protectrice de mucus lors d'inflammation. Les données récentes ont ainsi démontré que l'expression de MUC3 peut être contrôlée par les cytokines IL-4, IL-6, TNF-alpha et IFN-gamma [281, 282]. De façon intéressante, les cytokines IL1, 4, 6, 13, TNF-alpha augmentent également l'expression de MUC2 dès la première heure de stimulation dans des lignées coliques humaines (LS180 et LS174T) [283, 284]. Cette augmentation rapide de l'expression et de la sécrétion de MUC2 a été proposée comme pouvant intervenir dans les mécanismes de défense mis en jeu pour éliminer les agents pathogènes. L'expression de MUC4 est également connue pour être augmentée par l'IL-4, l'IL-6, le TNF-alpha et l'IFN-gamma [276, 285, 286]. L'ensemble de ces données suggèrent que les cytokines, et en particulier les membres de la famille de la cytokine IL-6 à laquelle la leptine appartient, sont des facteurs cruciaux d'activation des gènes de mucines pendant l'inflammation.

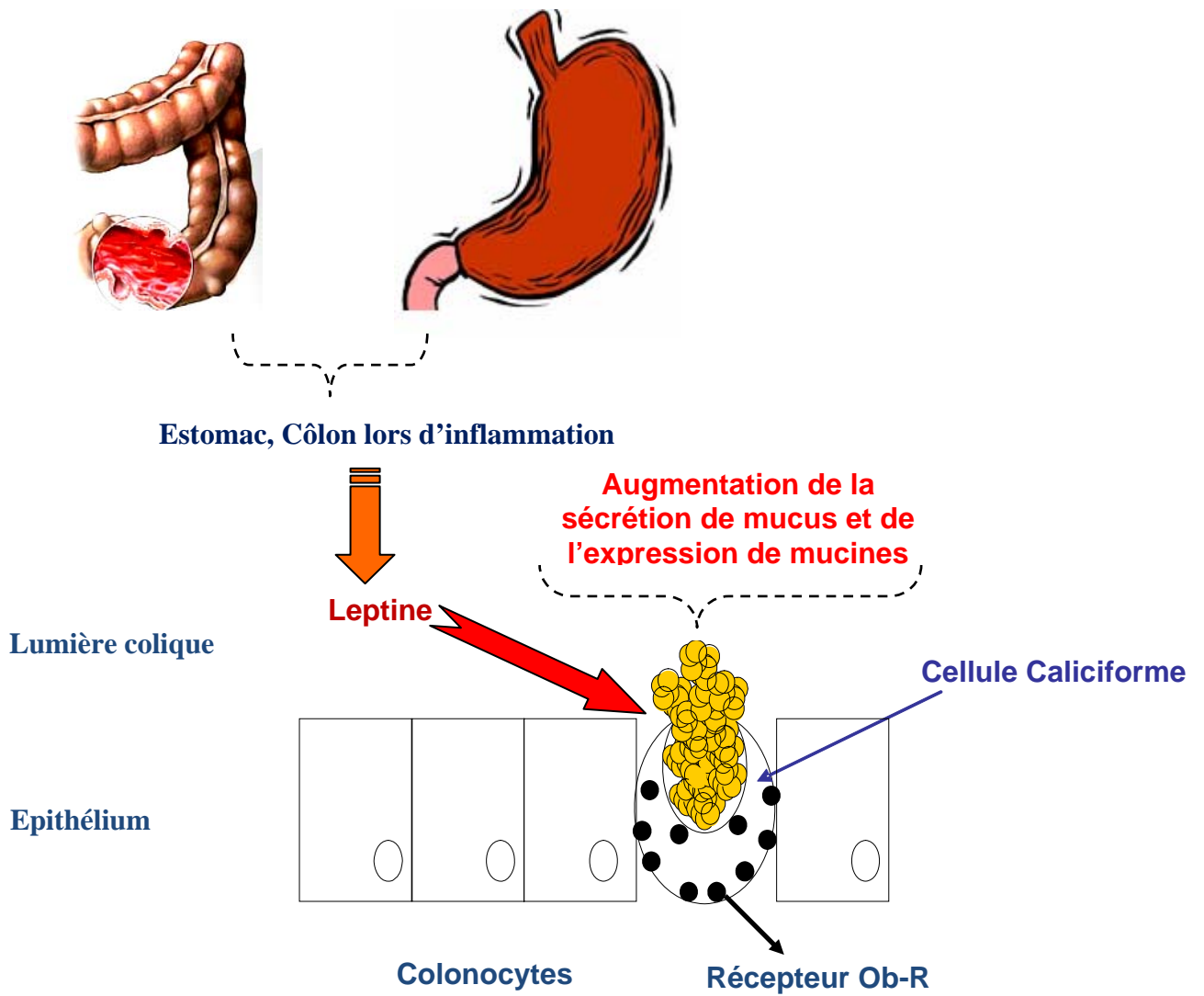
Certaines données cependant ne plaident pas en faveur d'un rôle protecteur et / ou anti-inflammatoire de la leptine. En effet, il est à noter que les souris *ob/ob* déficientes en leptine fonctionnelle sont résistantes à l'induction d'une colite expérimentale. Les mécanismes responsables d'une telle action impliquent en grande partie la capacité d'activation de cellules T par la leptine [287, 288]. Cependant, il est important de préciser que les souris déficientes en leptine ou en son récepteur présentent également des taux circulants élevés de corticostérone [287-289]. Etant donné que les glucocorticoïdes, tels que la corticostérone, peuvent moduler la réponse immune et inflammatoire, il est difficile de distinguer les effets propres de la leptine des effets indirects dus à la présence d'un excès de glucocorticoïdes. Par conséquent, les taux élevés de corticostérone pourraient en partie expliquer les modifications de la réponse immune et inflammatoire chez les souris déficientes en leptine.

En conclusion, nous avons mis en évidence un nouveau rôle de la leptine au niveau colique. En agissant à la fois sur la sécrétion et sur l'expression des mucines, la leptine induit une action en cascade d'une part en provoquant une augmentation de la sécrétion des mucines sécrétées et d'autre part en permettant à la muqueuse, *via* l'augmentation de l'expression des mucines, d'activer et de restaurer son potentiel de défense. Provenant de l'estomac et/ou localement libérée pendant l'inflammation, la leptine pourrait jouer un rôle dans la protection et le maintien de l'intégrité de l'épithélium colique. Ces résultats révèlent ce qui pourrait être une voie importante dans les mécanismes de défense de la muqueuse colique.

Il serait intéressant de poursuivre ce travail en approfondissant nos études *in vivo* et *in vitro* ; ainsi nous souhaiterions rechercher l'effet de la leptine, sur la sécrétion et l'expression des mucines, au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle. Nous voudrions également mettre en place une étude visant à déterminer le rôle de la leptine luminale dans la sécrétion et l'expression de mucines lors de colite expérimentale induite par le sulfate de dextran ou l'acide acétique, ce qui nous permettra de définir l'impact de cette hormone dans un cadre pathologique.

Les données obtenues en culture cellulaire seront également complétées en déterminant l'état de phosphorylation de certains éléments potentiellement impliqués dans les cascades de signalisation précédemment identifiées (Ras, Raf1, MEK, Grb2, Shc, Src, PLC, etc..) grâce à l'utilisation d'anticorps et d'agonistes spécifiques et suite à une stimulation de nos cellules par la leptine. Notre but est de mettre à jour la cascade des événements intracellulaires menant de la liaison de la leptine à son / ses récepteurs jusqu'à l'augmentation de la sécrétion et de l'expression des mucines. Nous déterminerons également si l'impact de la leptine sur l'expression des mucines passe par un effet transcriptionnel ou par un effet lié à la stabilité des ARNm. Pour cela, nous réaliserons un traitement des cellules DHE et HT29-MTX soit par l'actinomycine D (inhibiteur de la transcription), soit par le cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique).

En conclusion, le rôle physiologique de la leptine produite par l'estomac n'est pas encore totalement élucidé. Cependant, il apparaît de plus en plus clairement que son rôle ne se limite pas au déclenchement de la satiété postprandiale, mais concerne également le maintien de l'homéostasie de l'épithélium gastrointestinal en contrôlant ses fonctions de réparation-protection, de développement, de sécrétion et d'absorption.



**Figure 21: Action possible de la leptine sur l'expression de mucines et sur la sécrétion de mucus via les récepteurs Ob-R des cellules caliciformes**

# Références

# Références

1. Van der Sluis, M., et al., *Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection*. *Gastroenterology*, 2006. 131(1): p. 117-29.
2. Velcich, A., et al., *Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2*. *Science*, 2002. 295(5560): p. 1726-9.
3. Barcelo, A., et al., *Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon*. *Gut*, 2000. 46(2): p. 218-24.
4. Satchithanandam, S., et al., *Effects of dietary fibers on gastrointestinal mucin in rats*. *Nutr Res*, 1996. 16(7): p. 1163-77.
5. [5] Sitaraman, S., et al., *Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD*. *Faseb J*, 2004. 18(6): p. 696-8
6. Frexinos, J. Hépatogastro-entérologie clinique. 1988, Simep. p. 127-133.
7. Madara, J.-L., *Functional morphology of epithelium of the small intestine*. *The Gastrointestinal System*, American Physiological Society, 1968. 4: p. 83-120.
8. Madara, J.-L., *The Functionnal Morphology of the Mucosa of the Small Intestine*, in *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. R. Press, Editor. 1994. p. 1577-1622.
9. Meunier, P., *La digestion*. 2<sup>ème</sup> édition ed. 1988: Simep. 1-4/ 88-93.
10. Potten, C.S. and M. Loeffler, *Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt*. *Development*, 1990. 110(4): p. 1001-20.
11. Walters, J.R., *Cell and molecular biology of the small intestine: new insights into differentiation, growth and repair*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2004. 20(2): p. 70-6.
12. Walters, J.R., *Recent findings in the cell and molecular biology of the small intestine*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2005. 21(2): p. 135-40.
13. Moore, K.A. and I.R. Lemischka, *Stem cells and their niches*. *Science*, 2006. 311(5769): p. 1880-5.
14. Moore, K.A. and I.R. Lemischka, *Stem cells and their niches*. *Science*, 2006 311 (5769): p. 1880-5.
15. Fre, S., et al., *Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine*. *Nature*, 2005. 435(7044): p. 964-8.
16. Forstner, J.F., *Gastrointestinal Mucus*, in *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, R. Press, Editor. 1994. p. 1255-1283.
17. Cheng, H., et al., *Methods for the determination of epithelial cell kinetic parameters of human colonic epithelium isolated from surgical and biopsy specimens*. *Gastroenterology*, 1984. 86(1): p. 78-85.
18. Specian, R.D. and M.R. Neutra, *Mechanism of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine*. *J Cell Biol*, 1980. 85(3): p. 626-40.
19. Specian, R.D. and M.R. Neutra, *Cytoskeleton of intestinal goblet cells in rabbit and monkey. The theca*. *Gastroenterology*, 1984. 87(6): p. 1313-25.
20. Tran, C.P., et al., *Trefoil peptide TFF2 (spasmolytic polypeptide) potently accelerates healing and reduces inflammation in a rat model of colitis*. *Gut*, 1999. 44(5): p. 636-42.
21. Rindi, G., et al., *Biological and molecular aspects of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*. *Digestion*, 2000. 62 Suppl 1: p. 19-26.
22. Pullan, R.D., et al., *Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis*. *Gut*, 1994. 35(3): p. 353-9.
23. Andrianifahanana, M., et al., *Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 2006.



24. Moniaux, N., et al., *Structural organization and classification of the human mucin genes*. Front Biosci, 2001. 6: p. D1192-206.
25. Li, C.M., et al., *Mucin biosynthesis: molecular cloning and expression of bovine lung mucin core 2 N-acetylglucosaminyltransferase cDNA*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. 18(3): p. 343-52.
26. Huet; G., et al., *GalNAc-alpha-O-benzyl inhibits NeuAcalpha2-3 glycosylation and blocks the intracellular transport of apical glycoproteins and mucus in differentiated HT-29 cells*. J Cell Biol. 1998 Jun 15;141(6):1311-22.
27. Gouyer, V., et al., *Inhibition of the glycosylation and alteration in the intracellular trafficking of mucins and other glycoproteins by GalNAcalpha-O-bn in mucosal cell lines: an effect mediated through the intracellular synthesis of complex GalNAcalpha-O-bn oligosaccharides*. Front Biosci. 2001 Oct 1;6:D1235-44.
28. Robbe, C., et al., *Evidence of region-specific glycosylation in human intestinal mucins: presence of an acidic gradient along the intestinal tract*. J Biol Chem, 2003. 278(47): p. 46337-48.
29. Bell, S.L., et al., *N-linked oligosaccharides play a role in disulphide-dependent dimerization of intestinal mucin Muc2*. Biochem J, 2003. 373(Pt 3): p. 893-900.
30. Aksoy, N. and O.F. Akinci, *Mucin macromolecules in normal, adenomatous, and carcinomatous colon: evidence for the neotransformation*. Macromol Biosci, 2004. 4(5): p. 483-96.
31. Bell, S.L., et al., *Evidence that a peptide corresponding to the rat Muc2 C-terminus undergoes disulphide-mediated dimerization*. Eur J Biochem, 1998. 253(1): p. 123-31.
32. Parry, S., et al., *N-Glycosylation of the MUC1 mucin in epithelial cells and secretions*. Glycobiology, 2006. 16(7): p. 623-34.
33. Baldus, S.E. and F.G. Hanisch, *Biochemistry and pathological importance of mucin-associated antigens in gastrointestinal neoplasia*. Adv Cancer Res, 2000. 79: p. 201-48.
34. Pigny, P., et al., *Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes*. Genomics, 1996. 38(3): p. 340-52.
35. Porchet, N., et al., *[MUC genes: a superfamily of genes? Towards a functional classification of human apomucins]*. J Soc Biol, 1999. 193(1): p. 85-99.
36. Chen, Y., et al., *Genome-wide search and identification of a novel gel-forming mucin MUC19/Muc19 in glandular tissues*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. 30(2): p. 155-65.
37. Paris, M.J. and B.R. Williams, *Characterization of a 500-kb contig spanning the region between c-Ha-Ras and MUC2 on chromosome 11p15.5*. Genomics, 2000. 69(2): p. 196-202.
38. Redeker, E., et al., *An integrated physical map of 210 markers assigned to the short arm of human chromosome 11*. Genomics, 1994. 21(3): p. 538-50.
39. Baylin, S.B. and J.G. Herman, *DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics*. Trends Genet, 2000. 16(4): p. 168-74.
40. Vincent, A, et al., *Epigenetic regulation (DNA methylation, histone modifications) of the 11p15 mucin genes (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) in epithelial cancer cells*. Oncogene.2007 Apr 30
41. Griffiths, B., et al., *Assignment of the polymorphic intestinal mucin gene (MUC2) to chromosome 11p15*. Ann Hum Genet, 1990. 54 (Pt 4): p. 277-85.
42. Allen, A., et al., *The MUC2 gene product: a human intestinal mucin*. Int J Biochem Cell Biol, 1998. 30(7): p. 797-801.

43. Gum, J.R., et al., *The human MUC2 intestinal mucin has cysteine-rich subdomains located both upstream and downstream of its central repetitive region.* J Biol Chem, 1992. 267(30): p. 21375-83.
44. Gum, J.R., et al., *Identification and characterization of the MUC2 (human intestinal mucin) gene 5'-flanking region: promoter activity in cultured cells.* Biochem J, 1997. 325 (Pt 1): p. 259-67.
45. Van Seuningen, I., et al., *Transcriptional regulation of the 11p15 mucin genes. Towards new biological tools in human therapy, in inflammatory diseases and cancer?* Front Biosci, 2001. 6: p. D1216-34.
46. Velcich, A., et al., *Organization and regulatory aspects of the human intestinal mucin gene (MUC2) locus.* J Biol Chem, 1997. 272(12): p. 7968-76.
47. Toribara, N.W., et al., *MUC-2 human small intestinal mucin gene structure. Repeated arrays and polymorphism.* J Clin Invest, 1991. 88(3): p. 1005-13.
48. Byrd, J.C., et al., *Isolation and characterization of colon cancer mucin from xenografts of LS174T cells.* Cancer Res, 1988. 48(23): p. 6678-85.
49. Desseyn, J.L., et al., *Evolution of the large secreted gel-forming mucins.* Mol Biol Evol, 2000. 17(8): p. 1175-84.
50. Xu, G., et al., *Tissue-specific expression of a rat intestinal mucin-like peptide.* Biochem J, 1992. 286 (Pt 2): p. 335-8.
51. Hansson, G.C., et al., *Molecular cloning of a cDNA coding for a region of an apoprotein from the 'insoluble' mucin complex of rat small intestine.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. 198(1): p. 181-90.
52. Perez-Vilar, J. and R.L. Hill, *The carboxyl-terminal 90 residues of porcine submaxillary mucin are sufficient for forming disulfide-bonded dimers.* J Biol Chem, 1998. 273(12): p. 6982-8.
53. Xu, G., et al., *The cationic C-terminus of rat Muc2 facilitates dimer formation post translationally and is subsequently removed by furin.* Eur J Biochem, 2000. 267(10): p. 2998-3004.
54. Ohmori, H., et al., *Molecular cloning of the amino-terminal region of a rat MUC 2 mucin gene homologue. Evidence for expression in both intestine and airway.* J Biol Chem, 1994. 269(27): p. 17833-40.
55. Inatomi, T., et al., *Cloning of rat Muc5AC mucin gene: comparison of its structure and tissue distribution to that of human and mouse homologues.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. 236(3): p. 789-97.
56. Guyonnet Duperat, V., et al., *Characterization of the human mucin gene MUC5AC: a consensus cysteine-rich domain for 11p15 mucin genes?* Biochem J, 1995. 305 (Pt 1): p. 211-9.
57. Li, D., et al., *Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human MUC5AC mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts.* J Biol Chem, 1998. 273(12): p. 6812-20.
58. Buisine, M.P., et al., *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, 1998. 332 (Pt 3): p. 729-38.
59. Escande, F., et al., *Human mucin gene MUC5AC: organization of its 5'-region and central repetitive region.* Biochem J, 2001. 358(Pt 3): p. 763-72.
60. Van de Bovenkamp, J.H., et al., *Molecular cloning of human gastric mucin MUC5AC reveals conserved cysteine-rich D-domains and a putative leucine zipper motif.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. 245(3): p. 853-9.
61. Guzman, K., et al., *Regulation of MUC5 and MUC1 gene expression: correlation with airway mucous differentiation.* Am J Physiol, 1996. 270(5 Pt 1): p. L846-53.

62. Duraisamy, S., et al., *Distinct evolution of the human carcinoma-associated transmembrane mucins, MUC1, MUC4 AND MUC16*. *Gene*, 2006. 373: p. 28-34.
63. Choudhury, A., et al., *Human MUC4 mucin cDNA and its variants in pancreatic carcinoma*. *J Biochem (Tokyo)*, 2000. 128(2): p. 233-43.
64. Moniaux, N., et al., *Alternative splicing generates a family of putative secreted and membrane-associated MUC4 mucins*. *Eur J Biochem*, 2000. 267(14): p. 4536-44.
65. Williams, S.J., et al., *The MUC3 gene encodes a transmembrane mucin and is alternatively spliced*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 261(1): p. 83-9.
66. Wreschner, D.H., et al., *Human epithelial tumor antigen cDNA sequences. Differential splicing may generate multiple protein forms*. *Eur J Biochem*, 1990. 189(3): p. 463-73.
67. Gendler, S.J., et al., *Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin*. *J Biol Chem*, 1990. 265(25): p. 15286-93.
68. Gendler, S.J. and A.P. Spicer, *Epithelial mucin genes*. *Annu Rev Physiol*, 1995. 57: p. 607-34.
69. Gendler, S.J., *MUC1, the renaissance molecule*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2001. 6(3): p. 339-53.
70. Hanisch, F.G. and S. Muller, *MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin*. *Glycobiology*, 2000. 10(5): p. 439-49.
71. Zrihan-Licht, S., et al., *Characterization and molecular cloning of a novel MUC1 protein, devoid of tandem repeats, expressed in human breast cancer tissue*. *Eur J Biochem*, 1994. 224(2): p. 787-95.
72. Baruch, A., et al., *The breast cancer-associated MUC1 gene generates both a receptor and its cognate binding protein*. *Cancer Res*, 1999. 59(7): p. 1552-61.
73. DeSouza, M.M., et al., *Reduction of mucin-1 expression during the receptive phase in the rat uterus*. *Biol Reprod*, 1998. 58(6): p. 1503-7.
74. Pratt, W.S., et al., *Multiple transcripts of MUC3: evidence for two genes, MUC3A and MUC3B*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 275(3): p. 916-23.
75. Gum, J.R., Jr., et al., *Initiation of transcription of the MUC3A human intestinal mucin from a TATA-less promoter and comparison with the MUC3B amino terminus*. *J Biol Chem*, 2003. 278(49): p. 49600-9.
76. Van Klinken, B.J., et al., *Molecular cloning of human MUC3 cDNA reveals a novel 59 amino acid tandem repeat region*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. 238(1): p. 143-8.
77. Crawley, S.C., et al., *Genomic organization and structure of the 3' region of human MUC3: alternative splicing predicts membrane-bound and soluble forms of the mucin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 263(3): p. 728-36.
78. Wang, R., et al., *C-terminal domain of rodent intestinal mucin Muc3 is proteolytically cleaved in the endoplasmic reticulum to generate extracellular and membrane components*. *Biochem J*, 2002. 366(Pt 2): p. 623-31.
79. Khatri, I.A., et al., *The carboxyl-terminal sequence of rat intestinal mucin RMuc3 contains a putative transmembrane region and two EGF-like motifs*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. 1326(1): p. 7-11.
80. Khatri, I.A., et al., *Characteristics of rodent intestinal mucin Muc3 and alterations in a mouse model of human cystic fibrosis*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. 280(6): p. G1321-30.
81. Khatri, I.A., et al., *Evidence for a second peptide cleavage in the C-terminal domain of rodent intestinal mucin Muc3*. *Biochem J*, 2004. 378(Pt 1): p. 207-12.
82. Alos, L., et al., *Expression of membrane-bound mucins (MUC1 and MUC4) and secreted mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7) in mucoepidermoid carcinomas of salivary glands*. *Am J Surg Pathol* 2005;29:806–13).

83. Michael A.Hollingsworth and Benjamin J. Swanson *Mucins in cancer protection and control of cell surface* nature reviews cancer volume 4 January 2004 p 45.
84. Carraway, K. L. *et al. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, in cancer and epithelia: to protect and to survive. Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 71, 149–185 (2002).
85. Nicolas Moniaux, *et al., Alternative splicing generates a family of putative secreted and membrane-associated MUC4 mucins European Journal of Biochemistry* 267 (14), 4536–4544.
86. Michael Perrais, *et al., Characterization of Human Mucin Gene MUC4 Promoter JBC* Vol. 276, No. 33, Issue of August 17, pp. 30923–30933, 2001
87. Kermit L. Carraway, *et al., Muc4/Sialomucin Complex, the Intramembrane ErbB2 Ligand, in Cancer and Epithelia: To Protect and To Survive Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. 71*
88. Nollet, S., *et al., Human mucin gene MUC4: organization of its 5'-region and polymorphism of its central tandem repeat array. Biochem. J.* 332, 739±748
89. Nicolas Moniaux, *et al., Structural Organization and Classification of the Human Mucin Genes Frontiers in Bioscience* 6, d1192-1206, October 1, 2001
90. Nicolas MONIAUX, *et al., Complete sequence of the human mucin MUC4: a putative cell membrane-associated mucin, Biochem. J.* (1999) 338, 325-333
91. Ajay P. Singh, *et al.; Emerging Roles of MUC4 in Cancer: A Novel Target for Diagnosis and Therapy Cancer Res* 2007;67(2):433–6
92. S A Price-Schiavi, *et al., Cloning and characterization of the 5' flanking region of the sialomucin complex/rat Muc4 gene: promoter activity in cultured cells. Biochem J.* 2000 July 15; 349(Pt 2): 641–649.
93. Aymee Perez, *et al., PEA3 Transactivates the Muc4/Sialomucin Complex Promoter in Mammary Epithelial and Tumor Cells Vol. 278, No. 38, Issue of September 19, pp. 36942–36952, 2000*
94. Asker, N., *et al., 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,* 1998. 273(30): p. 18857-63.
95. Dekker, J. and G.J. Strous, *Covalent oligomerization of rat gastric mucin occurs in the rough endoplasmic reticulum, is N-glycosylation-dependent, and precedes initial O-glycosylation. J Biol Chem,* 1990. 265(30): p. 18116-22.
96. van Klinken, B.J., *et al., The oligomerization of a family of four genetically clustered human gastrointestinal mucins. Glycobiology,* 1998. 8(1): p. 67-75.
97. McCool, D.J., *et al., Roles of calreticulin and calnexin during mucin synthesis in LS180 and HT29/A1 human colonic adenocarcinoma cells. Biochem J,* 1999. 341 (Pt 3): p. 593-600.
98. Corfield, A.P., *et al., Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. Front Biosci,* 2001. 6: p. D1321-57.
99. Hanisch, F.G., *O-glycosylation of the mucin type. Biol Chem,* 2001. 382(2): p. 143-9.
100. Perez-Vilar, J. and R.L. Hill, *The structure and assembly of secreted mucins. J Biol Chem,* 1999. 274(45): p. 31751-4.
101. Kim, Y.S., *et al., Mucin glycoproteins in neoplasia. Glycoconj J,* 1996. 13(5): p. 693-707.
102. Oliver, M.G. and R.D. Specian, *Cytoskeleton of intestinal goblet cells: role of actin filaments in baseline secretion. Am J Physiol,* 1990. 259(6 Pt 1): p. G991-7.
103. Hoskins, L.C. and E.T. Boulding, *Mucin degradation in human colon ecosystems. Evidence for the existence and role of bacterial subpopulations producing glycosidases as extracellular enzymes. J Clin Invest,* 1981. 67(1): p. 163-72.

104. Tsai, H.H., et al., *A novel mucin sulphatase from human faeces: its identification, purification and characterization*. Clin Sci (Lond), 1992. 82(4): p. 447-54.
105. Wright, D.P., et al., *Cloning of a mucin-desulfating sulfatase gene from Prevotella strain RS2 and its expression using a Bacteroides recombinant system*. J Bacteriol, 2000. 182(11): p. 3002-7.
106. Rho, J.H., et al., *A novel mechanism for desulfation of mucin: identification and cloning of a mucin-desulfating glycosidase (sulfoglycosidase) from Prevotella strain RS2*. J Bacteriol, 2005. 187(5): p. 1543-51.
107. Specian, R.D. and M.G. Oliver, *Functional biology of intestinal goblet cells*. Am J Physiol, 1991. 260(2 Pt 1): p. C183-93.
108. Ehre, C., et al., *Barrier role of actin filaments in regulated mucin secretion from airway goblet cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. 288(1): p. C46-56.
109. Oliver, M.G. and R.D. Specian, *Cytoskeleton of intestinal goblet cells: role of microtubules in baseline secretion*. Am J Physiol, 1991. 260(6 Pt 1): p. G850-7.
110. Phillips, T.E., *Both crypt and villus intestinal goblet cells secrete mucin in response to cholinergic stimulation*. Am J Physiol, 1992. 262(2 Pt 1): p. G327-31.
111. Belley, A. and K. Chadee, *Prostaglandin E(2) stimulates rat and human colonic mucin exocytosis via the EP(4) receptor*. Gastroenterology, 1999. 117(6): p. 1352-62.
112. McCool, D.J., et al., *The T84 human colonic adenocarcinoma cell line produces mucin in culture and releases it in response to various secretagogues*. Biochem J, 1990. 267(2): p. 491-500.
113. Plaisancie, P., et al., *Effects of neurotransmitters, gut hormones, and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon*. Am J Physiol, 1998. 275(5 Pt 1): p. G1073-84.
114. Wright, D.H., et al., *The human prostanoid DP receptor stimulates mucin secretion in LS174T cells*. Br J Pharmacol, 2000. 131(8): p. 1537-45.
115. Willemsen, L.E., et al., *Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts*. Gut, 2003. 52(10): p. 1442-7.
116. Cohan, V.L., et al., *Interleukin-1 is a mucus secretagogue*. Cell Immunol, 1991. 136(2): p. 425-34.
117. Han, V., et al., *Interleukin-1 induces mucus secretion from mouse intestinal explants*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1987. 82(3-4): p. 364-5.
118. Enss, M.L., et al., *Proinflammatory cytokines trigger MUC gene expression and mucin release in the intestinal cancer cell line LS180*. Inflamm Res, 2000. 49(4): p. 162-9.
119. Kim, Y.D., et al., *Regulation of IL-1beta-mediated MUC2 gene in NCI-H292 human airway epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 274(1): p. 112-6.
120. Iwashita, J., et al., *mRNA of MUC2 is stimulated by IL-4, IL-13 or TNF-alpha through a mitogen-activated protein kinase pathway in human colon cancer cells*. Immunol Cell Biol, 2003. 81(4): p. 275-82.
121. Smirnova, M.G., et al., *Up-regulation of mucin secretion in HT29-MTX cells by the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6*. Eur Cytokine Netw, 2001. 12(1): p. 119-25.
122. Neutra, M.R., et al., *Regulation of intestinal goblet cell secretion. II. A survey of potential secretagogues*. Am J Physiol, 1982. 242(4): p. G380-7.
123. Halm, D.R. and S.T. Halm, *Secretagogue response of goblet cells and columnar cells in human colonic crypts*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. 278(1): p. C212-33.
124. Branka, J.E., et al., *Stimulation of mucin exocytosis from human epithelial cells by nitric oxide: evidence for a cGMP-dependent and a cGMP-independent pathway*. Biochem J, 1997. 323 (Pt 2): p. 521-4.

125. Stanley, C.M. and T.E. Phillips, *Bradykinin modulates mucin secretion but not synthesis from an intestinal goblet cell line*. Agents Actions, 1994. 42(3-4): p. 141-5.
126. Moore, B.A., et al., *Role of 5-HT in cholera toxin-induced mucin secretion in the rat small intestine*. Am J Physiol, 1996. 270(6 Pt 1): p. G1001-9.
127. Whitaker, T.L., et al., *Uroguanylin and guanylin: distinct but overlapping patterns of messenger RNA expression in mouse intestine*. Gastroenterology, 1997. 113(3): p. 1000-6.
128. Furuya, S., et al., *Intravenous injection of guanylin induces mucus secretion from goblet cells in rat duodenal crypts*. Anat Embryol (Berl), 1998. 197(5): p. 359-67.
129. Augeron, C., et al., *Neurotensin and neuromedin N stimulate mucin output from human goblet cells (Cl.16E) via neurotensin receptors*. Am J Physiol, 1992. 262(3 Pt 1): p. G470-6.
130. Plaisancie, P., et al., *Colonic mucin discharge by a cholinergic agonist, prostaglandins, and peptide YY in the isolated vascularly perfused rat colon*. Digestion, 1997. 58(2): p. 168-75.
131. Barcelo, A., et al., *Selective involvement of calcium and calcium channels in stimulated mucin secretion from rat colon*. Scand J Gastroenterol, 2001. 36(12): p. 1339-43.
132. Greenwood, B. and M. Mantle, *Mucin and protein release in the rabbit jejunum: effects of bethanechol and vagal nerve stimulation*. Gastroenterology, 1992. 103(2): p. 496-505.
133. Hokari, R., et al., *Vasoactive intestinal peptide upregulates MUC2 intestinal mucin via CREB/ATF1*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. 289(5): p. G949-59.
134. Young, G.P., et al., *Dietary fibre and colorectal cancer: a model for environment--gene interactions*. Mol Nutr Food Res, 2005. 49(6): p. 571-84.
135. Brownlee, I.A., et al., *Colonic mucus: secretion and turnover in relation to dietary fibre intake*. Proc Nutr Soc, 2003. 62(1): p. 245-9.
136. Enss, M.L., et al., *Mechanical challenge causes alterations of rat colonic mucosa and released mucins. Alterations of mucosa and mucins*. J Exp Anim Sci, 1994. 36(4-5): p. 128-40.
137. Brownlee, I.A., et al., *Alginate as a source of dietary fiber*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2005. 45(6): p. 497-510.
138. Finnie, I.A., et al., *Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate*. Gut, 1995. 36(1): p. 93-9.
139. Sakata, T. and H. Setoyama, *Local stimulatory effect of short-chain fatty acids on the mucus release from the hindgut mucosa of rats (Rattus norvegicus)*. Comp Biochem Physiol A Physiol, 1995. 111(3): p. 429-32.
140. Gaudier, E., et al., *Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. 287(6): p. G1168-74.
141. Velcich, A., et al., *Patterns of expression of lineage-specific markers during the in vitro-induced differentiation of HT29 colon carcinoma cells*. Cell Growth Differ, 1995. 6(6): p. 749-57.
142. Claustre, J., et al., *Effects of peptides derived from dietary proteins on mucus secretion in rat jejunum*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. 283(3): p. G521-8.
144. Meisel, H. and R.J. FitzGerald, *Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences*. Br J Nutr, 2000. 84 Suppl 1: p. S27-31.
145. Meisel, H., *Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins*. Biopolymers, 1997. 43(2): p. 119-28.

146. Truswell, A.S., *The A2 milk case: a critical review*. Eur J Clin Nutr, 2005. 59(5): p. 623-31.
147. San Segundo, B., et al., *Differences in cathepsin B mRNA levels in rat tissues suggest specialized functions*. FEBS Lett, 1986. 201(2): p. 251-6.
148. Zoghbi, S., et al., *beta-Casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a mu-opioid pathway*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006 Jun;290(6):G1105-13.
149. Bhaskar, K.R., et al., *Viscous fingering of HCl through gastric mucin*. Nature, 1992. 360(6403): p. 458-61.
150. Cross, C.E., et al., *Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus*. Lancet, 1984. 1(8390): p. 1328-30.
151. Aristoteli, L.P. and M.D. Willcox, *Mucin degradation mechanisms by distinct Pseudomonas aeruginosa isolates in vitro*. Infect Immun, 2003. 71(10): p. 5565-75.
152. Berg, R.D., *The indigenous gastrointestinal microflora*. Trends Microbiol, 1996. 4(11): p. 430-5.
153. Moncada, D.M., et al., *Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites*. Trends Parasitol, 2003. 19(7): p. 305-11.
154. Van Klinken, B.J., et al., *Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion*. Am J Physiol, 1995. 269(5 Pt 1): p. G613-27.
155. Mantle, M. and S.D. Husar, *Binding of Yersinia enterocolitica to purified, native small intestinal mucins from rabbits and humans involves interactions with the mucin carbohydrate moiety*. Infect Immun, 1994. 62(4): p. 1219-27.
156. Larson, M.A., et al., *Human serum amyloid A3 peptide enhances intestinal MUC3 expression and inhibits EPEC adherence*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 300(2): p. 531-40.
157. Chen, C.C., et al., *Murine intestinal mucins inhibit rotavirus infection*. Gastroenterology, 1993. 105(1): p. 84-92.
158. Mack, D.R., et al., *Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro*. Gut, 2003. 52(6): p. 827-33.
159. Mack, D.R., et al., *Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression*. Am J Physiol, 1999. 276(4 Pt 1): p. G941-50.
160. Paerregaard, A., et al., *Interactions between Yersinia enterocolitica and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles*. Infect Immun, 1991. 59(1): p. 253-60.
161. Hollingsworth, M.A. and B.J. Swanson, *Mucins in cancer: protection and control of the cell surface*. Nat Rev Cancer, 2004. 4(1): p. 45-60.
162. Hoffmann, W., et al., *Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain*. Histol Histopathol, 2001. 16(1): p. 319-34.
163. Thim, L., et al., *Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels*. Eur J Clin Invest, 2002. 32(7): p. 519-27.
164. Chapoy, P., *Mucus et écosystème intestinal en situation normale et pathologique*, in *Digestive Mucus from research to clinical implications*, Irvin, Editor. 2000. p. 69-75.
165. Clamp, J.R., et al., *Study of the carbohydrate content of mucus glycoproteins from normal and diseased colons*. Clin Sci (Lond), 1981. 61(2): p. 229-34.
166. Shirazi, T., et al., *Mucins and inflammatory bowel disease*. Postgrad Med J, 2000. 76(898): p. 473-8.
167. Kyo, K., et al., *Associations of distinct variants of the intestinal mucin gene MUC3A with ulcerative colitis and Crohn's disease*. J Hum Genet, 2001. 46(1): p. 5-20.

168. Kyo, K., et al., *Association of ulcerative colitis with rare VNTR alleles of the human intestinal mucin gene, MUC3*. Hum Mol Genet, 1999. 8(2): p. 307-11.
169. Rhodes, J.M., *Mucins and inflammatory bowel disease*. Qjm, 1997. 90(2): p. 79-82.
170. Raouf, A.H., et al., *Sulphation of colonic and rectal mucin in inflammatory bowel disease: reduced sulphation of rectal mucus in ulcerative colitis*. Clin Sci (Lond), 1992. 83(5): p. 623-6.
171. Van Klinken, B.J., et al., *Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis*. Gut, 1999. 44(3): p. 387-93.
172. Campbell, B.J., et al., *Direct demonstration of increased expression of Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in colonic adenocarcinoma and ulcerative colitis mucin and its concealment in normal mucin*. J Clin Invest, 1995. 95(2): p. 571-6.
173. Parker, N., et al., *Increased rate of sialylation of colonic mucin by cultured ulcerative colitis mucosal explants*. Digestion, 1995. 56(1): p. 52-6.
174. Tytgat, K.M., et al., *MUC2 is the prominent colonic mucin expressed in ulcerative colitis*. Gut, 1996. 38(4): p. 554-63.
175. Tytgat, K.M., et al., *Quantitative analysis of MUC2 synthesis in ulcerative colitis*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. 224(2): p. 397-405.
176. Buisine, M.P., et al., *Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 1999. 5(1): p. 24-32.
177. Buisine, M.P., et al., *Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease*. Gut, 2001. 49(4): p. 544-51.
178. Hayashi, T., et al., *Mucins and immune reactions to mucins in ulcerative colitis*. Digestion, 2001. 63 Suppl 1: p. 28-31.
179. Schultsz, C., et al., *The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls*. Gastroenterology, 1999. 117(5): p. 1089-97.
180. Myerscough, N., et al., *Expression of mucin genes in ulcerative colitis*. Biochem Soc Trans, 1995. 23(4): p. 536S.
181. Weiss, A.A., et al., *Expression of MUC2 and MUC3 mRNA in human normal, malignant, and inflammatory intestinal tissues*. J Histochem Cytochem, 1996. 44(10): p. 1161-6.
182. Boyle, P. and J. Ferlay, *Cancer incidence and mortality in Europe, 2004*. Ann Oncol, 2005. 16(3): p. 481-8.
183. Bara, J., et al., *Early precancerous modifications in the mucus of human and rat distal colon: a comparative immunohistologic study*. Ann N Y Acad Sci, 1983. 417: p. 182-94.
184. Li, Y., et al., *Human DF3/MUC1 carcinoma-associated protein functions as an oncogene*. Oncogene, 2003. 22(38): p. 6107-10.
185. Itzkowitz, S.H., et al., *Mucin associated Tn and sialosyl-Tn antigen expression in colorectal polyps*. Gut, 1992. 33(4): p. 518-23.
186. Devine, P.L. and I.F. McKenzie, *Mucins: structure, function, and associations with malignancy*. Bioessays, 1992. 14(9): p. 619-25.
187. Jenab, M., et al., *Sialomucin production in aberrant crypt foci relates to degree of dysplasia and rate of cell proliferation*. Cancer Lett, 2001. 165(1): p. 19-25.
188. Chandrasekaran, E.V., et al., *Human ovarian cancer, lymphoma spleen, and bovine milk GlcNAc:beta1,4Gal/GalNAc transferases: two molecular species in ovarian tumor and induction of GalNAcbeta1,4Glc synthesis by alpha-lactalbumin*. Carbohydr Res, 2001. 334(2): p. 105-18.
189. Singh, A.P., et al., *Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis*. Cancer Res, 2004. 64(2): p. 622-30.



190. Yonezawa, S., et al., *Gene expression of gastric type mucin (MUC5AC) in pancreatic tumors: its relationship with the biological behavior of the tumor*. *Pathol Int*, 1999. 49(1): p. 45-54.
191. Yonezawa, S. and E. Sato, *Expression of mucin antigens in human cancers and its relationship with malignancy potential*. *Pathol Int*, 1997. 47(12): p. 813-30.
192. Yonezawa, S., et al., *MUC2 gene expression is found in noninvasive tumors but not in invasive tumors of the pancreas and liver: its close relationship with prognosis of the patients*. *Hum Pathol*, 1997. 28(3): p. 344-52.
193. Ho, S.B., et al., *Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium*. *Cancer Res*, 1995. 55(12): p. 2681-90.
194. Bara, J., et al., *Monoclonal antibodies against oncofetal mucin M1 antigens associated with precancerous colonic mucosae*. *Cancer Res*, 1986. 46(8): p. 3983-9.
195. Bara, J., et al., *Antigens of gastric and intestinal mucous cells in human colonic tumors*. *Brit. J. Cancer*, 1980. 41: p. 209-21.
196. Bara, J., et al., *Oncofetal mucin M1 epitope family: characterization and expression during colonic carcinogenesis*. *Int J Cancer*, 1991. 47(2): p. 304-10.
197. Bara, J., et al., *Gastric M1 mucin, an early oncofetal marker of colon carcinogenesis, is encoded by the MUC5AC gene*. *Int J Cancer*, 1998. 75(5): p. 767-73.
198. Nollet, S., et al., *Mapping of SOMUI and M1 epitopes on the apomucin encoded by the 5' end of the MUC5AC gene*. *Hybrid Hybridomics*, 2004. 23(2): p. 93-9.
199. Bara, J., et al., *Abnormal expression of gastric mucin in human and rat aberrant crypt foci during colon carcinogenesis*. *Tumour Biol*, 2003. 24(3): p. 109-15.
200. Bartman, A.E., et al., *Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps*. *Int J Cancer*, 1999. 80(2): p. 210-8.
201. Li, D., et al., *Molecular pathological subclassification of mucinous adenocarcinoma of the colorectum*. *Pathol Int*, 2005. 55(12): p. 766-74.
202. Park, S.Y., et al., *Clinicopathological characteristics, microsatellite instability, and expression of mucin core proteins and p53 in colorectal mucinous adenocarcinomas in relation to location*. *Virchows Arch*, 2006.
203. Losi, L., et al., *Relationship between MUC5AC and altered expression of MLH1 protein in mucinous and non-mucinous colorectal carcinomas*. *Pathol Res Pract*, 2004. 200(5): p. 371-7.
204. Bara, J., et al., *Immunohistological study of precancerous mucus modification in human distal colonic polyps*. *Cancer Res*, 1983. 43(8): p. 3885-91.
205. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. *Nature* 1994;372:425-32.
206. Friedman, J.M and J.L.Halaas (1998) '*leptin and the regulation of body weight in mammals*'. *Nature* 395 (6704): 763-70
207. Geffroy, S., et al., *Localization of the human OB gene (OBS) to chromosome 7q32 by fluorescence in situ hybridization*. *Genomics* 1995;28:603-4.
208. Cohen, S.L., et al. *Human leptin characterization*. *Nature*1996;382:589.
209. Hotta, K., et al., *Regulation of obese (ob) mRNA and plasma leptin levels in rhesus monkeys. Effects of insulin, body weight, and non-insulin-dependent diabetes mellitus*. *J Biol Chem* 1996;271: 25327-31.
210. Bidwell, C.A., et al., *Cloning and expression of the porcine ob gene*. *Anim Biotechnol* 1997;8:191-206.
211. Taouis, M., et al., *Cloning the chicken leptin gene*. *Gene* 1998;208:239-42.
212. Tartaglia, L.A., et al. *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. *Cell* 1995;83:1263-71.
213. Bado, A., et al., *The stomach is a source of leptin*. *Nature* 1998;394:790-3.

214. Zhang, F., et al., *Crystal structure of the obese protein leptin-E100*. Nature 1997;387:206-9.
215. Imagawa, K., et al., *Structure-function studies of human leptin*. J Biol Chem 1998;273:35245-9.
216. Buyse, M., et al., *Paracrine actions of the stomach-derived leptin*. Med Sci (Paris), 2004. **20**(2): p. 183-8
217. Mix, H., et al., *Expression of leptin and its receptor in the human stomach*. Gastroenterology 1999;117:509.
218. Sobhani, I., et al., *Leptin secretion and leptin receptor in human stomach*. Gut. 2000 Aug;47(2):178-83
219. Cammisotto, PG., et al., *Endocrine and exocrine secretion of leptin by the gastric mucosa*, J Histochem Cytochem. 2005 Jul;53(7):851-60.
220. Cammisotto, PG., et al., *Secretion of soluble leptin receptors by exocrine and endocrine cells of the gastric mucosa*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006 Feb; 290(2):G242-9. Epub 2005 Oct 20.
221. Phillips, MS., et al., *Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat*. Nat Genet 1996;13:18-9.
222. Otero, M., et al., *Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights; FEBS Letters*; 2005, 579: 295-301
223. Ahima Rs and Oseisy., *Leptin signaling*, Physiol Behav. 2004 Apr;81(2):223-41.
224. Chua, SC Jr., et al., *Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor*. Science 1996;271:994-6.
225. Baskin, DG., et al., *Leptin receptor long-form splice-variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus*. J Histochem Cytochem 1999;47:353-62.
226. Hoggard, N., et al., *Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta*. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:11073-8.
227. Löllmann, B., et al., *Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b and, e in different mouse tissues*. Biochem Biophys Res Commun 1997;238:648-52.
228. Emilsson, V., et al., *Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion*. Diabetes 1997;46:313-6.
229. Bjorbaek C, Kahn BB. *Leptin signaling in the central nervous system and the periphery*. Recent Prog Horm Res. 2004;59:305-31
230. Frühbeck, G.; *Intracellular signalling pathways activated by leptin*; Biochem. J.; 2006, 393: 7-20.
231. Kellerer, M., et al., *Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways*. Diabetologia 1997;40:1358-62.
232. White, DW., et al., *Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization*. J Biol Chem 1997;272:4065-71.
233. Wang, Y., et al. *Leptin receptor action in hepatic cells*. J Biol Chem 1997;272:16216-23.
234. Vaisse, C., et al., *Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice*. Nat Genet 1996;14:95-7.
235. Morton, NM., et al., *Leptin action in intestinal cells*. J Biol Chem 1998;273:26194-201.

236. Tanabe, K., et al., *Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase*. Biochem Biophys Res Commun 1997;241:765-8.
237. Guilmeau, S., et al., *Duodenal leptin stimulates cholecystokinin secretion: evidence of a positive leptin cholecystokinin feedback loop*. Diabetes 2003; 52: 1664-72.
238. Hardwick, J.C., et al., *leptin is a growth factor for colonic epithelial cells* Gastroenterology. 2001 Jul;121(1):79-90.
239. Robert Ducroc, et al., *Luminal Leptin Induces Rapid Inhibition of Active Intestinal Absorption of Glucose Mediated by Sodium-Glucose Cotransporter 1*, Diabetes. 2005 Feb;54(2):348-54
240. Ione Barrenetxe, et al., *Involvement of PKC and PKA in the inhibitory effect of leptin on intestinal galactose absorption* Biochem Biophys Res Commun. 2004 May 7;317(3):717-21
241. Buyse, M., et al., *PepT1- mediated epithelial transport of dipeptides and cephalixin is enhanced by luminal leptin in the small intestine*. J Clin Invest 2001; 108: 1483-94.
242. Barrenetxe, J., et al., *Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes*. Gut 2002; 50: 797-802.
243. Fantuzzi, G. and Faggioni, R.; *Leptin in the regulation of immunity, inflammation and hematopoiesis*; J. Leukoc. Biol.; 2000, 68: 437-446
244. Faggioni, R., et al.; *Leptin in regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition*; FASEB J.; 2001, 15: 2565-2571
245. Ozata, M., et al.; *Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects*; J. Clin. Endocrinol. Metab.; 1999, 84: 3686-3695
246. La Cava, A. and Matarese, G.; *The weight of leptin in immunity*; Nat. Rev. Immunol.; 2004, 4 (12) : 371-379
247. Sanchez-Margalet, V., et al., *Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells : mechanisms of action* ; Clin. Exp. Immunol., 2003, 133: 11-19
248. Howard, J.K., et al., *Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice*; J Clin Invest, 1999, 104 (8): 1051-1059
249. Matarese, G., et al.; *Leptin in immunology*; J. Immunol.; 2005, 173: 3137-3142
250. Dixit, V.D., et al., *Leptin induces growth hormone secretion from peripheral blood mononuclear cells via a protein kinase C- and nitric oxide- dependent mechanism*; Endocrinology; 2003, 144 (12): 5595-5603
251. Murphy, W.J. and Longo, D.L.; *Growth hormone as an immunomodulating therapeutic agent*; Immunol. Today; 2000, 21(5):211-213
252. Barbier, M., et al., *Elevated plasma leptin concentrations in early stages of experimental intestinal inflammation in rats*. Gut 1998;43:783-90.
253. Faggioni, R., et al. *Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality*. Am J Physiol 1999;276 : R136-42.
254. Takahashi, N., et al., *Leptin is an endogenous protective protein against the toxicity exerted by tumor necrosis factor*. J Exp Med 1999;189:207-12.
255. Konturek, P.C., et al., *Gastroprotection and control of food intake by leptin. Comparison with cholecystokinin and prostaglandins*. J Physiol Pharmacol 1998;50:39-48.
256. Ballinger, A., et al., *Plasma leptin in chronic inflammatory bowel disease and HIV : implications for pathogenesis of anorexia and weight loss*. Clin Sci 1998;94:479-83

257. Hoppin, AG., et al., *Serum leptin in children and young adults with inflammatory bowel disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1998;26:500-5.
258. Klapproth, JM., et al., *Role of leptin in regulation of body mass in Crohn's disease*. Gastroenterology 1997;112 : A1015.
259. Breidert, M., et al., *Leptin and its receptor in normal human gastric mucosa and in Helicobacter pylori-associated gastritis*. Scand J Gastroenterol 1999;34:954-61
260. Barrachina, MD., et al., *Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice*. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:10455-60
261. Sobhani, I., et al., *Stimulation rapidly increases leptin secretion in human stomach*. Gastroenterology 2002; 122: 259-63.
262. Wang, YH., et al., *Two types of leptin-responsive gastric vagal afferent terminals : an in vitro single-unit study in rats*. Am J Physiol 1997;273 : R833-7.
263. Konturek PC, et al., *Gastroprotection and control of food intake by leptin. Comparison with cholecystokinin and prostaglandins*. J Physiol Pharmacol 1998;50: 39-48.
264. Yuan, CS., et al., *Gastric effects of cholecystokinin and its interaction with leptin on brainstem neuronal activity in neonatal rats*. J Pharmacol Exp Ther 2000; 295: 177-82.
265. Inigo, C., et al., *Luminal leptin inhibits intestinal sugar absorption in vivo*. Acta Physiol (Oxf). 2007 May 3
266. Anini, Y. and P.L. Brubaker, *Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion*. Diabetes, 2003. **52**(2): p. 252-9.
267. Goldstone, AP., et al., *Leptin interacts with glucagon-like peptide-1 neurons to reduce food intake and body weight in rodents*. FEBS Lett 1997;415:134-8.
268. Cammisotto, P G., et al., *Secretion of soluble leptin receptors by exocrine and endocrine cells of the gastric mucosa*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290: G242-249, 2006.
269. Lesuffleur, T., et al., *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: 771-783, 1993.
270. Aparicio, T., et al., *Leptin reduces the development of the initial precancerous lesions induced by azoxymethane in the rat colonic mucosa*. Gastroenterology 126: 499–510, 2004.
271. Cakir, B., et al., *The anti-inflammatory effect of leptin on experimental colitis: involvement of endogenous glucocorticoids*. Peptides, 2004. **25**(1): p. 95-104.
272. Slomiany, B.L. and A. Slomiany, *Leptin suppresses Porphyromon gingivalis lipopolysaccharide interference with salivary mucin synthesis*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(4): p. 1099-103.
273. Ho, S B., et al., *Cysteine-rich domains of muc3 intestinal mucin promote cell migration, inhibit apoptosis, and accelerate wound healing*. Gastroenterology 131: 1501-1517, 2006.
274. Niv-Spector, L., et al., *Identification of the hydrophobic strand in the A-B loop of leptin as major binding site III: implications for large-scale preparation of potent recombinant human and ovine leptin antagonists*. Biochem J 391: 221–230, 2005.
275. Konturek, P.C., et al., *Role of leptin in ulcer healing*. Eur J Pharmacol, 2001. **414**(1): p. 87-97
276. Damera G, and Sachdev G P. *IL-4 induced MUC4 enhancement in respiratory epithelial cells in vitro is mediated through JAK-3 selective signaling*. Respir Res 7: 39, 2006.

277. Kim, Y.D., et al., *Interleukin-1beta induces MUC2 gene expression and mucin secretion via activation of PKC-MEK/ERK, and PI3K in human airway epithelial cells.* J Korean Med Sci, 2002. **17**(6): p. 765-71.
278. Hanski, C., et al., *Defective post-transcriptional processing of MUC2 mucin in ulcerative colitis and in Crohn's disease increases detectability of the MUC2 protein core.* J Pathol. 1999 Jul;188(3):304-11
279. Christoph, M., et al., *Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease,* J Mol Med (2006) 84 (12):1055–1066
280. Strober, S., et al., *The fundamental basis of inflammatory bowel disease,* J Clin Invest (2007) , 117 (3) :514-521
281. Shekels, L L., et al., *Muc2 and Muc3 mucin gene expression in Trichinella spiralis infection in wild-type and cytokine-deficient mice.* Dig Dis Sci 46: 1757-1764, 2001.
282. Shekels L L, and Ho S B. *Characterization of the mouse Muc3 membrane bound intestinal mucin 5' coding and promoter regions: regulation by inflammatory cytokines.* Biochim Biophys Acta 1627: 90-100, 2003.
283. Ahn, D H, et al., *TNF-alpha activates MUC2 transcription via NF-kappaB but inhibits via JNK activation.* Cell Physiol Biochem 15: 29-40, 2005.
284. Iwashita, J., et al., *mRNA of MUC2 is stimulated by IL-4, IL-13 or TNF-alpha through a mitogen-activated protein kinase pathway in human colon cancer cells.* Immunol Cell Biol 81: 275-282, 2003.
285. Andrianifahanana, M., et al., *Synergistic induction of the MUC4 mucin gene by interferon-gamma and retinoic acid in human pancreatic tumour cells involves a reprogramming of signalling pathways.* Oncogene 24: 6143-6154, 2005.
286. Damera, G., et al., *IL-9 modulated MUC4 gene and glycoprotein expression in airway epithelial cells.* Biosci Rep 26: 55-67, 2006.
287. Guillaume-Gentil, C., et al., *Abnormal regulation of the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the genetically obese fa/fa rat.* Endocrinology, 1990. **126**(4): p. 1873-9.
288. Siegmund, B., et al., *Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice.* Gastroenterology 122: 2011–2025, 2002.
289. Alberts, P., et al., *Effect of high-fat diet on KKAY and ob/ob mouse liver and adipose tissue corticosterone and 11-dehydrocorticosterone concentrations.* Horm Metab Res. 2005 Jul;37(7):402-7.

## **Résumé:**

Les mucines sont les molécules structurales de base du gel de mucus qui assure la protection et la lubrification de la muqueuse gastro-intestinale. Notre but était de déterminer l'effet de la leptine sur la sécrétion et l'expression des mucines gastro-intestinales. Cette étude a été réalisée *in vivo* chez le rat et *in vitro* à l'aide des lignées cellulaires de rat DHE et humaine HT29-MTX. Nous avons trouvé que ces 2 lignées expriment les récepteurs (Ob-R) de la leptine. La perfusion luminale de la leptine dans le côlon de rat ainsi que la stimulation des cellules DHE par la leptine a entraîné une augmentation de la sécrétion de mucines et du niveau des ARNm codant pour rMuc2, rMuc3 et rMuc4. Cet effet de la leptine était dose dépendant. Testée dans les HT29-MTX, la leptine a provoqué une augmentation de la sécrétion de mucines ainsi qu'une augmentation des transcrits de MUC2, MUC4 et MUC5AC *via* la voie de la PKC, la PI3K et les MAPK. Ces résultats montrent que la leptine pourrait jouer un rôle essentiel dans la protection de la muqueuse colique.

**Mots clés: mucus intestinal; mucine ; côlon ; leptine ; récepteur de la leptine; barrière de défense intestinale, MUC2, MUC3, MUC4.**

## **Abstract**

Mucins are the basic components of the mucus layer which ensures the protection and lubrication of the gastrointestinal mucosa. Our aim was to study the leptin effect on gastrointestinal mucins secretion and expression. This study was carried out *in vivo* in the rat and *in vitro* using the DHE and the HT29-MTX cell lines. We found that these cell lines express the leptin receptors. Luminal perfusion of leptin in the colon of rat or stimulation of DHE by leptin increased mucin secretion and the mRNA levels of rMuc2, rMuc3 and rMuc4. This effect of leptin was dose dependent. In the HT29-MTX, leptin produced an increase in mucin secretion in the supernatants as well as MUC2, MUC4 and in MUC5AC mRNA by targeting PKC, PI3K and MAPK pathways. These results showed that leptin could play an essential role in the protection of the colonic mucosa.

**Key words: mucus; mucin; colon; leptin; leptin receptor; intestinal defence barrier, MUC2, MUC3, MUC4.**

Travail réalisé au sein du laboratoire INSERM U865:  
Tumeurs endocrines digestives.  
Université Laennec, 69008 Lyon.