

# Evaluation longitudinale de l'activité du canal CFTR : modèle de sécrétion salivaire chez la souris

Marion Blayac<sup>1</sup>, Richard Souktani<sup>1</sup>, Valérie Urbach<sup>1</sup>, Sophie Lanone<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Univ Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, F-94010 Créteil, France

\* Correspondance : [marion.blayac@outlook.com](mailto:marion.blayac@outlook.com)

## Résumé

La mucoviscidose est une maladie génétique due à une mutation du gène *CFTR*. Cette mutation entraîne l'absence de la protéine CFTR ou la production d'une protéine présentant des anomalies fonctionnelles. Ces anomalies affectent le transport d'électrolytes (ions Cl<sup>-</sup> et Na<sup>+</sup>) et d'eau au niveau des épithéliums, incluant ceux des glandes sudoripares et des glandes salivaires. Chez l'Homme, la fonction de CFTR est évaluée en première instance par le test de la sueur dont l'équivalent murin est le test de sécrétion salivaire. Chez l'Homme, ce test est réalisé dans un but de diagnostic initial de la maladie mais également à des fins de suivi de l'efficacité thérapeutique de modulateurs de CFTR. Chez la souris, le test de sécrétion salivaire n'a, à notre connaissance, jamais été réalisé à des fins de suivi évolutif de la fonction de CFTR. Ainsi, nous avons mis au point une version longitudinale du test de sécrétion salivaire permettant d'évaluer une éventuelle modification de la fonction de CFTR au cours du temps. Nous nous intéressons, dans l'équipe, aux effets d'agressions environnementales sur le phénotype de la mucoviscidose et nous avons choisi d'évaluer l'impact d'une exposition à la pollution atmosphérique sur l'activité de CFTR. Par la réalisation de ce test, nous avons ainsi pu mettre en évidence une modification partielle de l'activité de la protéine CFTR après exposition à la pollution atmosphérique. Cette modification suggérerait une augmentation de l'activité de la protéine CFTR à la suite d'une telle exposition. Par ailleurs, il apparaît que le sexe semble être une variable importante dans la modulation de l'activité fonctionnelle du canal CFTR.

## Mots-Clés

Mucoviscidose, CFTR, sécrétion salivaire, souris, test longitudinal

## Introduction

La mucoviscidose est une maladie génétique due à une mutation du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Le gène *CFTR* code un canal anionique exprimé à la surface de nombreux épithéliums (poumon, intestin, pancréas, glandes exocrines) et permet le transport d'ions chlorure (Cl<sup>-</sup>) et bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) à travers la membrane apicale des cellules épithéliales (1). De plus, la protéine CFTR est impliquée dans la régulation d'autres mécanismes électrophysiologiques et inhibe notamment le canal sodique épithélial ENaC.

Dans la mucoviscidose, la mutation du gène *CFTR* est responsable de l'absence de la protéine CFTR ou de la synthèse d'une protéine dont les fonctions sont altérées. Dans les deux cas, la mutation de *CFTR* entraîne une réduction

de la sécrétion transépithéliale des ions Cl<sup>-</sup> associée à une hyperabsorption d'ions sodium (Na<sup>+</sup>) conduisant à une déshydratation des surfaces épithéliales (2). Le diagnostic de mucoviscidose, tout comme la mesure de l'efficacité des traitements thérapeutiques, est basé en partie sur la démonstration de ces anomalies de transport ionique, conséquences directes de la dysfonction de la protéine CFTR. Pour cela, le test de la sueur est le test de référence car il est très prédictif de l'activité de CFTR (3). Celui-ci consiste à stimuler la production de sueur par les glandes sudoripares – par technique de l'iontophorèse à la pilocarpine – puis d'y mesurer la concentration en sel. Chez les individus atteints de mucoviscidose, cette concentration en sel est excessive par rapport aux individus sains car : 1) la réabsorption de chlorure par le canal CFTR au niveau de l'épithélium réabsorbant des glandes

eccrines est altérée et 2) l'incapacité de l'épithélium à réabsorber les ions  $\text{Cl}^-$  empêche les ions  $\text{Na}^+$  d'être réabsorbés à leur tour conduisant de ce fait à la sécrétion d'une sueur salée (4,5).

La réalisation du test de la sueur dans des modèles précliniques est très utile dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité de molécules thérapeutiques sur la restauration de la fonction de CFTR. Or chez la souris, un des modèles animaux les plus utilisés dans l'étude de la mucoviscidose, la localisation des glandes sudoripares limitée à l'intérieur de la patte a restreint le développement d'un test de la sueur murin au profit du test de sécrétion salivaire (6,7). C'est ce modèle établi que nous avons adapté. En effet, plutôt que d'utiliser le test de sécrétion salivaire à des fins d'évaluation ponctuelle du potentiel thérapeutique de molécules pharmaceutiques, nous avons modifié le protocole existant afin de suivre, dans le temps, la fonction de CFTR en réponse à une agression environnementale - ici une exposition à la pollution atmosphérique. Plusieurs études ont en effet montré des effets d'une exposition à différents polluants atmosphériques sur l'activité de CFTR dans des modèles cellulaires mais très peu de données *in vivo* ont été rapportées (8–10). En outre, aucune de ces études ne s'est intéressée au suivi longitudinal de l'activité de CFTR chez un même individu, nécessitant notamment la survie des animaux entre les prélèvements salivaires successifs.

### Matériel et réactifs

1. Tubes Eppendorf 1.5 mL
2. Tubes Eppendorf 0.5 mL
3. Boîtes de Pétri (6 cm de diamètre)
4. Tampons de coton absorbants Salivette® (Sarstedt 51.1534)
5. NaCl 0.9% injectable
6. Kétamine® 1000 (Kétamine 100 mg/mL)
7. Rompun® 2% (Xylazine 20 mg/mL)
8. Pilocarpine Faure 2% (Collyre unidose 20 mg/mL)
9. Seringues 1 mL
10. Aiguilles 25G

L'adaptation du protocole original (7) de sécrétion salivaire que nous avons réalisée s'est faite à plusieurs égards : 1) le mix d'anesthésiant utilisé, 2) l'injection de pilocarpine pour la stimulation de la sécrétion salivaire, 3) l'utilisation de tampons absorbants pour la récolte de la salive, et 4) les paramètres biochimiques analysés en aval. Les modifications apportées ont ainsi permis d'optimiser conjointement les doses d'anesthésique et de pilocarpine injectées pour assurer le déroulement le plus fluide possible de la procédure et du réveil ultérieur des animaux. L'utilisation de tampons de coton absorbants a permis de faciliter la récolte de la salive ainsi que le traitement de celle-ci lors de la phase suivante d'analyse. Enfin, en plus de la mesure classique de concentration en ions  $\text{Cl}^-$ , nous avons réalisé la mesure du pH salivaire grâce à une micro-électrode de pH ainsi que le dosage des ions  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{Na}^+$ , paramètres biochimiques intrinsèquement liés à la fonction de la protéine CFTR.

Le modèle décrit ici permet finalement l'évaluation longitudinale de l'activité de CFTR. Il présente l'avantage de ne pas être invasif car le protocole est réalisé sans intervention chirurgicale. La procédure n'étant pas terminale, elle est reproductible sur un même animal et chaque individu constitue son propre contrôle. Enfin, la méthode est quantitative, simple et rapide à mettre en œuvre.

11. Scotch chirurgical
12. Micropipettes
13. Minuteur
14. Papier absorbant (type essuie-tout)
15. Glace
16. Tapis chauffant
17. Balance de précision
18. Balance de pesée
19. Centrifugeuse
20. pH-mètre
21. Micro-électrode de pH (Thermo Scientific, Micro-électrode Orion™ 9810BN)
22. Analyseur de biochimie Cobas® 8000

## Procédure

L'évaluation longitudinale de l'activité de CFTR a ici été réalisée sur la lignée *Cftr*<sup>tm1EUR</sup>, lignée de fond génétique 129/FVB mutée dans le gène *Cftr* et présentant la mutation F508del (11). Des souris sauvages (WT) de même fond génétique ont été utilisées comme groupes contrôles.

### A. Préparation du matériel

- Préparer autant de tubes 1.5 mL, de tubes 0.5 mL, de boîtes de Pétri et de Salivette® que de souris.
- Couper les cotons Salivette® en 8 morceaux égaux comme indiqué dans la Figure 1A.
- Peser les tubes de 1.5 mL à la balance de précision et noter les poids.
- Couper le bout conique des tubes de 0.5 mL (voir Figure 1B).
- Préparer le mix d'anesthésiant dans du NaCl 0.9% de sorte à injecter une dose finale de 80 mg/kg de Kétamine et 10 mg/kg de Xylazine\*. Le volume d'anesthésiant injecté par animal est de 10 µL/g de poids corporel.
- Diluer la solution de Pilocarpine 2% au 1:100 dans du NaCl 0.9% (Tableau 1) \*.

\* *A faire le jour même de la manipulation et à protéger de la lumière.*

### B. Collecte de la salive

- Peser les animaux afin de déterminer le volume d'anesthésiant à injecter (10 µL/g de poids corporel).
- Anesthésier les animaux par voie intrapéritonéale.
- Une fois les animaux complètement endormis, injecter par voie intrapéritonéale le volume nécessaire de la solution de Pilocarpine diluée au 1:100 en fonction du poids de la souris afin d'obtenir une dose de 0.5 mg/kg (Tableau 1).
- Placer les souris sur un support incliné à 35°, allongées sur le ventre et maintenues à la base de la queue par un morceau de scotch chirurgical. Placer une boîte de Pétri sous la mâchoire des souris et déposer le coton Salivette® dans la boîte de Pétri (Figure 1C). Les souris doivent conserver la même position pendant toute la durée de la manipulation.
- Dès l'apparition de la première goutte de salive (soit environ 5 minutes après injection de la Pilocarpine), placer le coton absorbant Salivette® sous la bouche de la souris (Figure 1C). Déclencher le minuteur et poursuivre la récolte de salive pendant 15 minutes.
- Surveiller les animaux pendant toute la durée de la collecte de salive. Si nécessaire, essuyer le museau de la souris à l'aide de papier absorbant afin de prévenir la pénétration de salive dans les voies aériennes et ainsi empêcher l'asphyxie de la souris. Un maximum de 5 souris peut être manipulé simultanément sous la surveillance d'un seul opérateur.
- Une fois la récolte terminée, récupérer le coton Salivette® et le placer dans un tube 1.5 mL. Maintenir les tubes dans la glace. Récupérer si besoin l'éventuel excédent de salive dans la boîte de Pétri à l'aide d'une micropipette.
- Retirer les animaux du support incliné et les placer dans une cage de réveil sur un tapis chauffant et du papier absorbant.
- Surveiller les animaux jusqu'à leur réveil complet. Une fois réveillés, replacer les animaux dans leur cage et y placer des croquettes imbibées d'eau ainsi qu'un (ne boîte d'Hydrogel afin d'éviter leur déshydratation).

### C. Traitement des échantillons

- Transférer le coton imbibé de salive dans le tube de 0.5 mL perforé (Tube A). Refermer le tube puis le placer dans un nouveau tube de 1.5 mL (Tube B) (Figure 1B).
- Centrifuger l'ensemble des tubes (A+B) à 1 000 g pendant 2 minutes pour récupérer la salive.
- Récupérer et jeter le tube A contenant le coton.
- Peser de nouveau le tube B afin de pouvoir calculer le volume de salive récolté.
- Mesurer le pH salivaire à l'aide du pH-mètre et de la micro-électrode de pH.
- Doser les ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> et Na<sup>+</sup> à l'aide de l'analyseur Cobas® 8000.

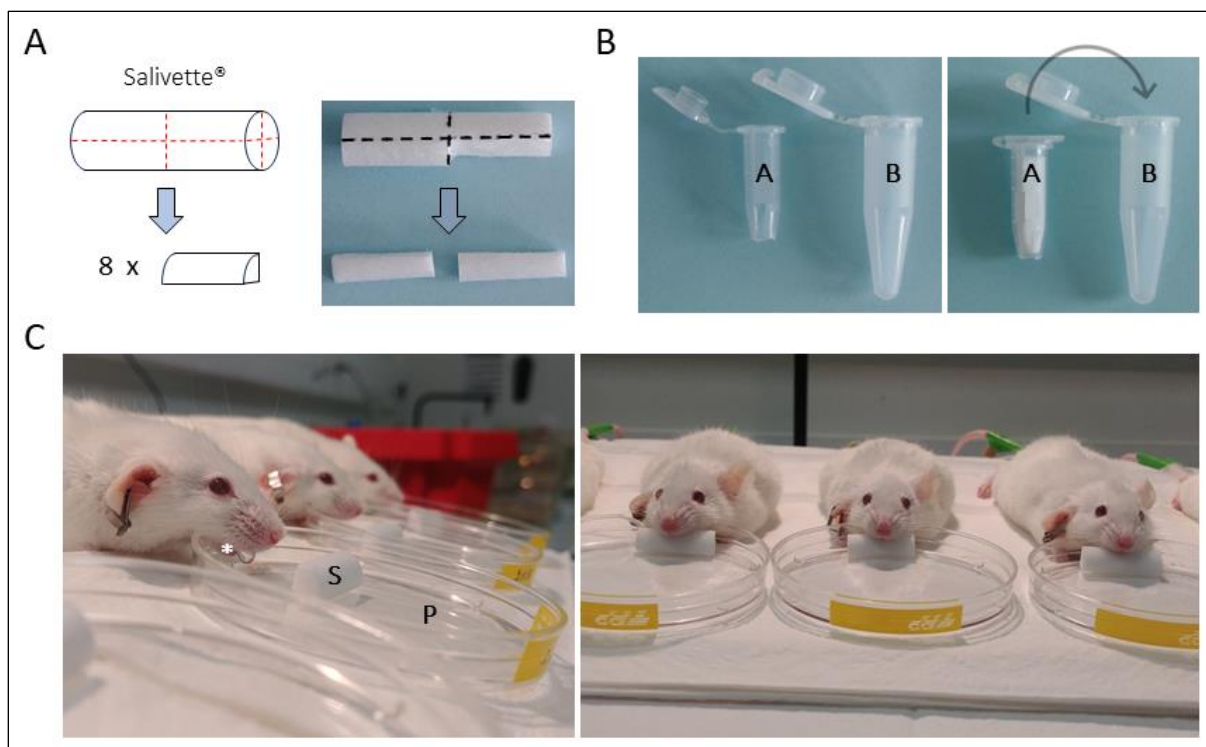
- Les échantillons peuvent être conservés à 4°C s'ils ne sont pas analysés immédiatement.

#### D. Analyse des données

Les analyses statistiques des données ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9. La normalité des données a été testée grâce au test de Shapiro-Wilk. Dans le cas d'une distribution normale des données, les groupes d'animaux ont été comparés entre eux par un test ANOVA suivi, en cas de positivité, de comparaisons 2 à 2 par test t de Student. Dans le cas d'une distribution ne satisfaisant pas l'hypothèse de normalité, les groupes ont été comparés par un test de Kruskal-Wallis suivi, en cas de positivité, du test U de Mann-Whitney. Par le design longitudinal du protocole, chaque souris constitue son propre contrôle. Les mesures répétées sur les souris ont ainsi été comparées par l'utilisation d'un test apparié non paramétrique au vu de la faible taille des effectifs (test apparié de Wilcoxon). Le seuil de significativité a été fixé à 0.5 % ( $p \leq 0.05$ ). Les résultats sont présentés sous la forme Moyenne  $\pm$  Erreur type (SEM).

**Tableau 1** : Préparation des solutions de Pilocarpine et volume à injecter en fonction du poids corporel des souris.

Solutions de pilocarpine	
Solution mère (unidose commerciale)	20 mg/mL
Solution fille à préparer (1:100)	200 µg/mL
Pilocarpine à injecter	
Dose <i>in vivo</i>	0.5 mg/kg
Poids de la souris (g)	Volume à injecter (µL)
18	45
20	50
22	55
24	60
26	65
28	70
30	75
32	80
34	85
36	90



**Figure 1** : Préparation du matériel et installation des souris. **(A)** Découpe de la Salivette® (à réaliser en suivant les pointillés). A droite, est donné un exemple d'une découpe permettant d'obtenir 2 morceaux de coton. **(B)** Préparation des tubes Eppendorf. Le Tube A doit être coupé au niveau de la pointe conique. Le Tube B est à peser avant et après récolte de la salive. A = Tube 0.5 mL. B = Tube 1.5 mL. **(C)** Installation des souris lors la salivation. \* Goutte de salive. S = Coton Salivette®. P = Boîte de Pétri.

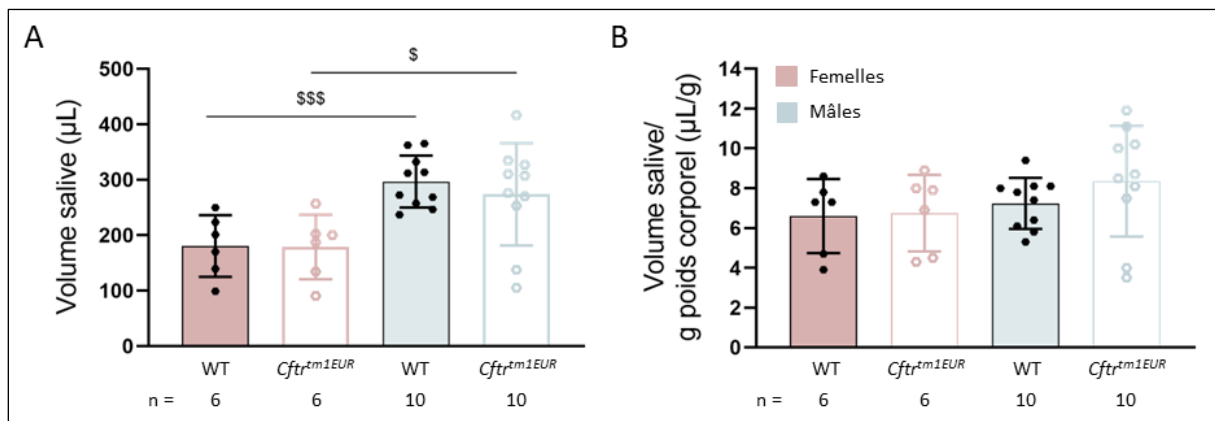
## Résultats

L'expérience de salivation a été réalisée sur un total de 32 animaux. Ces animaux sont répartis de la façon suivante dans les différents groupes : 12 femelles, dont 6 individus WT et 6 individus *Cftr*<sup>tm1EUR</sup> avec, pour chacun des 2 génotypes, 3 individus témoins et 3 individus exposés à la pollution ; 20 mâles, dont 10 individus WT et 10 individus *Cftr*<sup>tm1EUR</sup> avec, pour chacun des 2 génotypes, 5 individus témoins et 5 individus exposés à la pollution (Figure 2 et Figure 4).

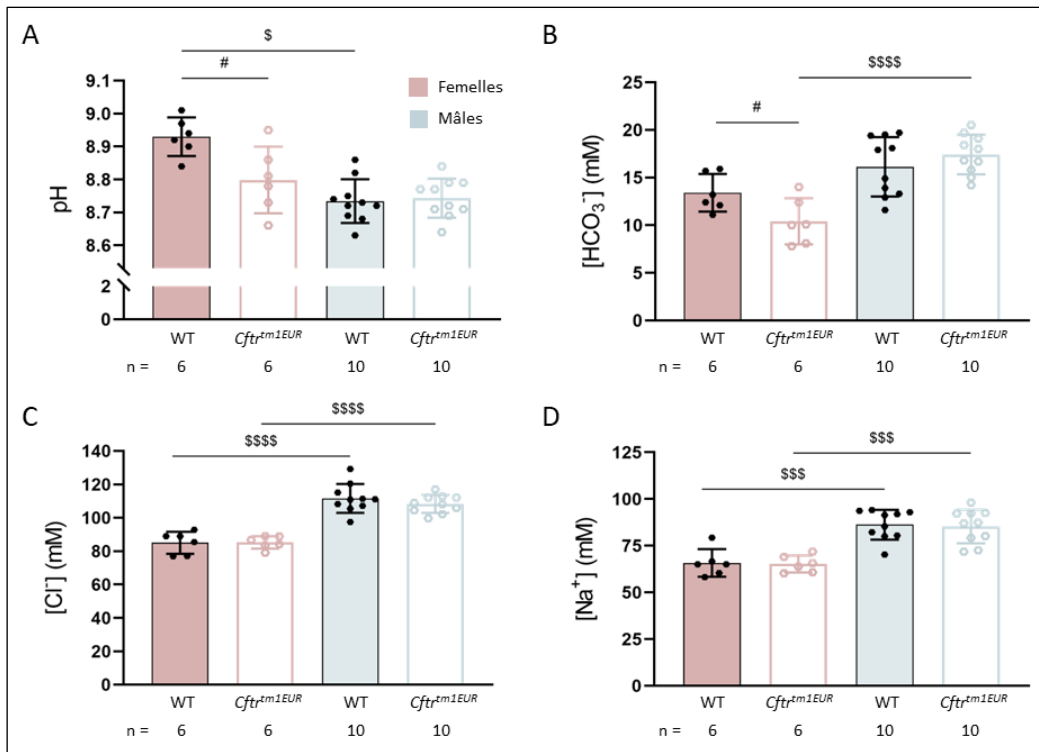
Le volume de salive moyen récolté par souris est de  $181 \pm 23 \mu\text{L}$  chez les femelles WT, de  $179 \pm 24 \mu\text{L}$  chez les femelles *Cftr*<sup>tm1EUR</sup>, de  $297 \pm 15 \mu\text{L}$  chez les mâles WT et de  $274 \pm 29 \mu\text{L}$  chez les mâles *Cftr*<sup>tm1EUR</sup>. Cette différence intersexe est significative (Figure 2A). Lorsque le volume de sécrétion est normalisé par rapport aux poids des individus, cette différence n'existe plus (Figure 2B). Par ailleurs, le volume salivaire récolté ne diffère pas entre les souris WT et les souris atteintes de mucoviscidose (*Cftr*<sup>tm1EUR</sup>).

La réalisation d'un premier test de sécrétion salivaire permet la mesure de l'activité basale de CFTR, soit l'activité en dehors de toute stimulation extérieure (*i.e* avant toute exposition à la pollution atmosphérique). Ce premier test a révélé un pH et une concentration en bicarbonates plus faibles chez les souris femelles *Cftr*<sup>tm1EUR</sup> (pH =  $8.80 \pm 0.04$ ,  $[\text{HCO}_3^-] = 10.4 \pm 1.0 \text{ mmol}$ ) par rapport aux mesures réalisées chez les souris femelles WT (pH =  $8.93 \pm 0.02$ ,  $[\text{HCO}_3^-] = 13.4 \pm 0.8 \text{ mmol}$ ) (Figure 3A, 3B). Cette différence n'est pas observée chez les souris mâles. Aucune différence dans les concentrations en ions chlorure et sodium n'a pu être observée entre les souris WT et *Cftr*<sup>tm1EUR</sup>, indépendamment du sexe (Figure 3C, 3D). Toutefois, ces concentrations apparaissent plus élevées dans la salive des souris mâles que dans celle des souris femelles. A titre d'exemple chez les souris WT, les mâles présentent une concentration en  $\text{Cl}^-$  égale à  $111.6 \pm 2.7 \text{ mmol}$  et une concentration en  $\text{Na}^+$  égale à  $86.3 \pm 2.5 \text{ mmol}$  quand les femelles présentent une concentration en  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$  égale à  $85.0 \pm 2.7 \text{ mmol}$  et  $65.8 \pm 3.0 \text{ mmol}$  respectivement (Figure 3C, 3D).

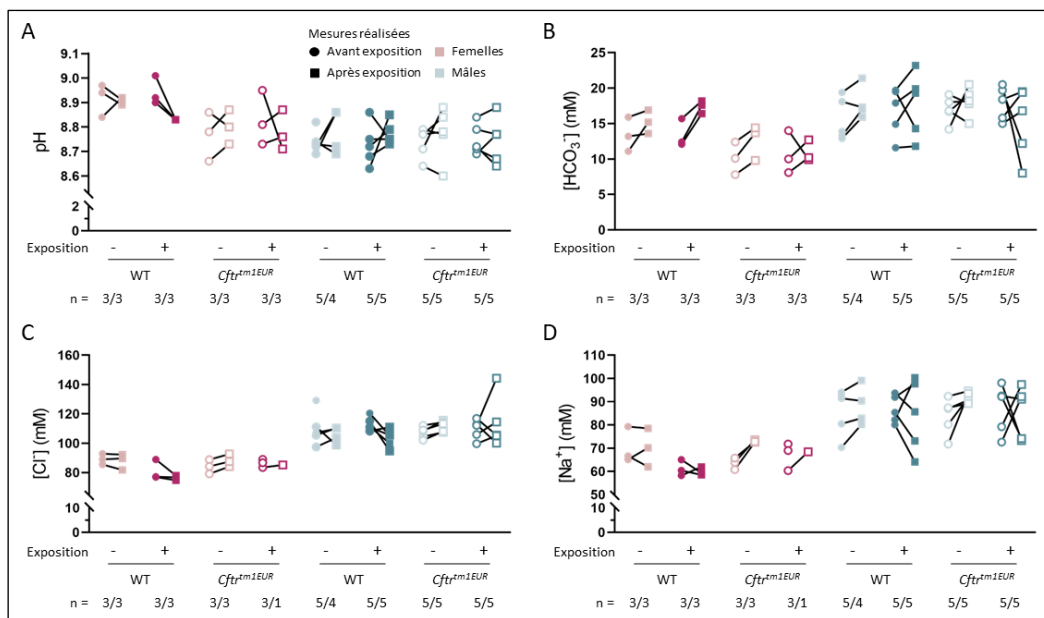
Le test de sécrétion salivaire a été réalisé une seconde fois sur les mêmes souris après que celles-ci aient été exposées à la pollution atmosphérique. L'analyse des données par le test apparié de Wilcoxon ne permet pas de mettre en évidence de différence quel que soit le paramètre mesuré (Figure 4). Il est probable que le faible effectif de chacun des groupes ne permette pas, à ce stade, la puissance statistique suffisante pour montrer d'éventuelle(s) différence(s) entre les groupes. En effet, à titre exploratoire et informatif, l'analyse des données par de simples tests non appariés montre quant à elle une augmentation significative de la concentration salivaire en  $\text{HCO}_3^-$  chez les souris femelles WT ( $13.4 \pm 1.2$  mmol vs  $17.4 \pm 0.5$  mmol) et une diminution de la concentration salivaire en  $\text{Cl}^-$  chez les souris mâles WT ( $113.2 \pm 2.1$  mmol vs  $103.2 \pm 2.8$  mmol) après exposition à la pollution atmosphérique (Figure 4B, 4C). Aucune modification significative du pH salivaire ni des concentrations en électrolytes n'a en revanche pu être relevée chez les souris *Cftr<sup>tm1EUR</sup>* après exposition à la pollution atmosphérique par cette méthode d'analyse. Ces résultats suggèreraient ainsi une stimulation des fonctions sécrétrices et des fonctions de réabsorption de CFTR uniquement chez les souris WT, résultats consistants avec une augmentation de l'activité de CFTR chez ces souris après exposition à la pollution atmosphérique. A la lumière de ces premiers essais réalisés sur des effectifs restreints, ces résultats supportent la réalisation du test de sécrétion salivaire pour la mesure longitudinale de la fonction de CFTR. La confirmation de ces résultats avec des effectifs plus importants devrait également encourager à valider l'utilisation de ce test pour tout suivi de la fonction de CFTR chez la souris.



**Figure 2** : Volume de sécrétion salivaire chez la souris. **(A)** Volume de salive sécrété et récolté pendant 15 minutes. **(B)** Volume de salive récolté pendant 15 minutes et normalisé par unité de poids corporel. Analyse statistique réalisée par un test ANOVA suivi du test-t de Student : § p < 0.05, §§§ p < 0.001 en comparaison avec les souris femelles.



**Figure 3 :** Analyses biochimiques réalisées sur la salive de souris. Mesure du pH salivaire (A) et des concentrations en ions bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (B), chlorure (Cl<sup>-</sup>) (C) et sodium (Na<sup>+</sup>) (D). Analyse statistique réalisée par un test ANOVA suivi du test-t de Student : # p < 0.05 en comparaison avec les souris WT ; \$ p < 0.05, \$\$\$ p < 0.001 et \$\$\$\$ p < 0.0001 en comparaison avec les souris femelles.



**Figure 4 :** Évaluation longitudinale des paramètres biochimiques dans la salive de souris. Mesure du pH salivaire (A) et des concentrations en ions bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (B), chlorure (Cl<sup>-</sup>) (C) et sodium (Na<sup>+</sup>) (D). Pour chaque n, le format de présentation correspond à l'Effectif avant exposition/Effectif après exposition. L'éventuelle différence entre les 2 effectifs s'explique soit par un volume insuffisant d'échantillon ne permettant pas de réaliser la mesure de dosage, soit par la perte d'individu (décès) au cours de l'exposition. Analyse statistique réalisée par un test apparié de Wilcoxon (ns).

## Remerciements

Les auteurs souhaitent remercier le DIM Qi<sup>2</sup> avec le support de la région Ile-de-France pour avoir financé la thèse de Marion Blayac ainsi que le projet Européen REMEDIA #874753 qui soutient le travail des auteurs sur les effets de l'exposome sur le cours de la mucoviscidose.

Nous remercions également le Dr Soraya Fellahi et le Dr Mohammed Nadir Mouri du service de Toxicologie de l'Hôpital Henri Mondor pour la réalisation des analyses biochimiques des échantillons.

## Conflits d'intérêt

Les auteurs n'ont aucun conflit d'intérêt à déclarer.

## Éthique

L'utilisation de souris pour le développement de ce modèle de sécrétion salivaire a été soumise à évaluation par le comité d'éthique Anses/ENVA/UPEC et autorisée par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (APAFIS 32191-2021063012495531v4).

## Références

1. Shteinberg M, Haq IJ, Polineni D, Davies JC. Cystic fibrosis. *The Lancet*. 2021;397(10290):2195-211.
2. Boucher RC. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med*. 2007;58:157-70.
3. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*. 2006;61(7):627-35.
4. Quinton PM. Cystic Fibrosis: Lessons from the Sweat Gland. *Physiology*. 2007;22(3):212-25.
5. Saint-Criq V, Gray MA. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(1):93-115.
6. Best JA, Quinton PM. Salivary secretion assay for drug efficacy for cystic fibrosis in mice. *Exp Physiol*. 2005;90(2):189-93.
7. Droebner K, Sandner P. Modification of the salivary secretion assay in F508del mice — The murine equivalent of the human sweat test. *J Cyst Fibros*. 2013;12(6):630-7.
8. Cantin AM, Hanrahan JW, Bilodeau G, Ellis L, Dupuis A, Liao J, et al. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function Is Suppressed in Cigarette Smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(10):1139-44.
9. Qu F, Qin XQ, Cui YR, Xiang Y, Tan YR, Liu HJ, et al. Ozone stress down-regulates the expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human bronchial epithelial cells. *Chem Biol Interact*. 2009;179(2-3):219-26.
10. Nguyen JP, Huff RD, Cao QT, Tiessen N, Carlsten C, Hirota JA. Effects of environmental air pollutants on CFTR expression and function in human airway epithelial cells. *Toxicol In Vitro*. 2021;77:105253.
11. van Doorninck JH, French PJ, Verbeek E, Peters RH, Morreau H, Bijman J, et al. A mouse model for the cystic fibrosis delta F508 mutation. *EMBO J*. 1995;14(18):4403-11.