

N° d'ordre : 255

50376
1972
13

50376
1972
13

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

MÉMOIRE

présenté à l'Université de Lille I
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES
OPTION BIOCHIMIE

par

Pierre-Marie DEGAND

Classification et éléments de structure des mucines bronchiques



Présenté le 20 Mars 1972 devant la Commission d'Examen

MM. J. MONTREUIL, Président

G. BISERTE, Rapporteur

R.W. JEANLOZ

M^{lle} G. SPIK

Ce travail a été réalisé à l'Unité N°16 de Recherches
sur la Biochimie des Protéines Normales et Pathologiques de
l'I.N.S.E.R.M. , sous la direction de Messieurs les Professeurs
G. BISERTE et R. HAVEZ.

A MA MERE,

Je te dédie cette Thèse. Ta vie toute faite d'abnégation
et de courage est pour moi un exemple. Crois bien que
tout ce que tu as entrepris n'a pas été inutile.

A LA MEMOIRE DE MON PERE,

Ton souvenir demeure. J'espère que ton humanisme me
guidera toute la vie.

A MES FRERES ET SOEURS,

A TOUTE MA FAMILLE,

A MES AMIS,

A MON PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté des
Sciences de Lille ,
Chef de Service de Biochimie Cellulaire de l'Institut
de Recherches sur le Cancer de Lille.

Nous vous remercions pour le très grand honneur que
vous nous faites en acceptant de présider le Jury de
cette Thèse. Vos qualités scientifiques, la clarté de
votre enseignement ont toujours provoqué mon
admiration au cours de mes études en Faculté des
Sciences.

Nous vous prions de croire en notre profond respect.

A MES JUGES,

Monsieur le Professeur Gérard BISERTE

Professeur de Biochimie Pathologique à la Faculté de
Médecine de Lille.

Au cours des nombreuses années passées au laboratoire,
nous avons toujours apprécié les qualités scientifiques
et humaines qui sont vôtres, jointes à une très grande
simplicité.

Nous vous sommes particulièrement reconnaissant de
nous avoir accordé votre confiance. Nous vous prions
de croire en notre profond respect et en notre profond
attachement.

Monsieur le Professeur Roger W. JEANLOZ

Directeur du Laboratoire de Recherches sur les Glucides
Harvard Medical School of Massachusetts General
Hospital, Boston.

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter d'être membre
de notre Jury de Thèse, votre autorité scientifique,
votre personnalité, nous font réclamer votre indulgence
dans l'appréciation de ce travail.

Nous vous remercions et vous assurons de nos sentiments
respectueux.

Mademoiselle Geneviève SPIK

Maître de Conférences à l'Université des Sciences et
Techniques de Lille.

Nous avons profité de votre enseignement en Faculté
des Sciences. Vous nous avez toujours accueilli avec
gentillesse et vous en remercions vivement.

A Monsieur le Professeur Paul BOULANGER

Professeur de Biochimie Médicale,
Directeur de l'Unité de Recherches sur la Biochimie des
Protéines Normales et Pathologiques de l'INSERM.

Nous ne saurions oublier l'accueil que vous nous avez
réservé lors de notre arrivée au laboratoire. Nous sommes
conscient de l'énorme tâche qui fut vôtre pour la création
et le développement de votre Ecole.
Soyez assuré de notre profond et respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur Raymond HAVEZ

Professeur de Biochimie Médicale,

Votre enthousiasme, votre goût de la recherche ont su
créer une équipe. Votre rigueur scientifique, votre
patience et aussi, votre ténacité nous ont permis de
réaliser ce travail.
Soyez remercié et croyez en notre profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Michel DAUTREVAUX

Professeur de Biochimie Médicale,

Nous avons pu apprécier vos qualités d'enseignement au
cours du CES de Biochimie. Vous nous avez toujours
accueilli avec bienveillance. Soyez en remercié très
sincèrement.

A Monsieur le Professeur Marc-Marie DEMINATTI

Professeur de Cyto-Génétique,

Vous nous avez accueilli dans votre laboratoire. Votre aide
nous a été précieuse au cours de ce travail. Nous vous en
remercions.

A Monsieur Philippe ROUSSEL,

Depuis des années, nous travaillons ensemble. Entre nous s'est créée une profonde amitié. J'aurais aimé que tu sois là aujourd'hui. Crois en la sincérité de mes sentiments.

A Monsieur Marc MAZZUCA,

Les contacts que nous avons sont toujours empreints d'une grande cordialité. Tu m'as aidé pour la présentation de ce travail. Crois en ma sincère amitié.

A Madame Geneviève LAMBLIN,

Nous vous remercions très sincèrement pour l'aide que vous venez de nous apporter et vous prions de croire en nos sentiments amicaux.

A Monsieur Kia-Ki HAN,

Je te remercie de ton aide précieuse. Elle a été spontanée et aussi empreinte d'amitié.

A Monsieur Yves MOSCHETTO,

Dès mon arrivée au Laboratoire, j'ai apprécié tes qualités scientifiques. Ensemble nous avons eu souvent des rapports cordiaux. Crois, je te prie, en mes meilleurs sentiments.

A Monsieur Pierre RUFFIN,

J'ai eu le plaisir de travailler avec toi. Je tiens à t'exprimer ma sympathie.

A Mesdemoiselles Colette RICHET, Danièle VAN DER LOO,
Monique VAN BOCKSTAELE

A Monsieur Claude VANDEPERRE

Je tiens à vous remercier de l'aide constante que vous
m'avez apportée au cours de ce travail. Soyez assurés
de mes sentiments amicaux.

A Mademoiselle Thérèse HUART

Avec une extrême gentillesse, vous m'avez aidé à présenter
cette Thèse. Soyez en remerciée.

A Tous mes Camarades du Laboratoire de Biochimie et de
l'Unité des Protéines

Que ceux qui m'ont accordé leur aide et leur amitié
soient ici remerciés.

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

DOYENS HONORAIRES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DEHORS, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, MM. LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKY.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE

DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

M. René DEFRETIN

Professeur de Biologie Marine
Directeur de l'Institut de Biologie
Maritime et Régionale de Wimereux

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	Physique
M. BLAYS Pierre	Géographie
M. BLOCH Vincent	Psychophysiologie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie et Physico-chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CAPET Marcel-Francis	Institut de Préparation aux Affaires
M. CELET Paul	Géologie
M. CONSTANT Eugène	Physique Industrielle-Electronique

M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques Générales
M. DEFRETIN René	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Zoologie Générale et Appliquée
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Radio-Électricité-Électronique
M. GEHU Jean-Marie	Institut Agricole
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. JOLY Robert	Biologie Animale
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Expérimentale
M. LOMBART Jacques	Sociologie
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. POUZET Pierre	Informatique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Analyse Supérieure
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WERTHEIMER Raymond	Physique

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. DELHAYE Michel	Chimie
M. FLATRES Pierre	Géographie
M. LEBRUN André	Électronique
M. LINDER Robert	Botanique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. PARREAU Michel	Mathématiques Appliquées
M. PRUDHOMME Rémy	Droit et Sciences Économiques
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BILLARD Jean	Physique
M. BODARD Marcel	Botanique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. DERCOURT Jean-Michel	Géologie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAULT Pierre	Biologie
M. LACOSTE Louis	Biologie
M. LANDAIS Jean	Chimie
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
M. LOUCHEUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
Melle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTEL Marc	Physique
M. PANET Marius	I. E. E. A.
M. PROUVOST Jean	Minéralogie

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés de Fonctions)

M. ADAM Michel	Economie Politique
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Mathématiques
M. AUBIN Thierry	Mathématiques
M. BART André	Biologie
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	I. E. E. A.
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COULON Jean	I. E. E. A.
M. DEBRABANT Pierre	Sciences Appliquées
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique
M. DRIEUX Baudouin	I. E. E. A.

M. DYMENT Arthur	Mathématiques
M. ESCAIG Bertrand	Physique
M. FONTAINE Jacques	Génie Electrique
M. FROELICH Daniel	Sciences Appliquées
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Mathématiques
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD de la Marre Jacques	I.E.E.A.
M. JOURNAL Gérard	Sciences Appliquées
Melle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie
M. LAURENT François	Automatique
M. LAVAGNE Pierre	Sciences Economiques et Sociales
Melle LEGRAND Denise	Mathématiques
Melle LEGRAND Solange	Mathématiques (Calais)
Me. LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M. LEROY Jean-Marie	Chimie
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
Me MAILLET Monique	Sciences Economiques
M. MAIZIERES Christian	I.E.E.A.
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques et Sociales
M. MANBRINI Jean	Biologie
M. MERIAUX Emile	Sciences de la Terre
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Chimie (Sciences Appliquées)
M. MUSSCHE Guy	Sciences Economiques
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. OLIVEREAU Jean-Michel	Biologie
M. OUZIAUX Roger	Technologie des Machines
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mathématiques
M. PERROT Pierre	Chimie
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY Ladislas	Physique
Me RENVERSEZ Françoise	Sciences Economiques et Sociales

M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SALMER Georges	Radio Electricité Electronique
M. SEGUIER Guy	Electronique
M. SIMON Michel	Psychologie
M. SLIWA Henri	Chimie
M. SMET Pierre	Physique
M. SOMME Jean	Géographie
Melle SPIK Geneviève	Chimie Biologique
M. THOMAS Daniel	Chimie Minérale Appliquée
M. TOULOTTE Jean-Marc	Sciences Appliquées
M. TREANTON Jean-André	Sciences Economiques et Sociales
M. VANDORPE Bernard	Chimie Physique
M. VILETTE Michel	Génie Mécanique
M. WATERLOT Michel	Géologie

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION</u>	1
 <u>CHAPITRE I : MATERIEL D'ETUDE</u>	 5
A) PHASE SUPERFICIELLE	6
B) PHASE AQUEUSE DE L'EXPECTORATION ..	7
C) MUCUS FIBRILLAIRE DE L'EXPECTORATION	10
 <u>CHAPITRE II : PURIFICATION DES MUCINES</u>	
<u>BRONCHIQUES</u>	12
A) PREPARATION DES PROTEINES DU MUCUS PAR UN MECANISME D'ECHANGE IONIQUE	13
B) ACTION DES AGENTS REDUCTEURS SUR LE MUCUS FIBRILLAIRE	15
1) Mode d'action des agents réducteurs sur le mucus fibrillaire	17
2) Etude électrophorétique et immunoélectrophoré- tique des produits de réduction du mucus fibrillaire	20
a) Electrophorèse en agarose à pH 8,2	21
b) Etude immunoélectrophorétique en agar de pH 8,2	22
C) ISOLEMENT DES MUCINES BRONCHIQUES A PARTIR DU MUCUS REDUIT PAR LE MERCAPTO- ETHANOL	23
1) Couplage de l'électrophorèse préparative en film liquide et de la chromatographie sur colonne de Sepharose 2B ou 4B	24
a) Electrophorèse préparative à haut voltage en film liquide à pH 8,6.....	24

b) Chromatographie de gel-filtration du mucus réduit	31
1°) Chromatographie de gel-filtration sur Sephadex G-200	31
2°) Chromatographie d'exclusion sur Sepharose 2B ou 4B	32
c) Couplage Sepharose 2B - Electrophorèse préparative à haut voltage	34
2) Fractionnement du mucus réduit par précipitation en milieu acide et chromatographie d'exclusion sur gel	37
a) Précipitation à pH 2,3	38
b) Purification de la fraction soluble à pH 2,3 ..	40
c) Purification des mucines précipitées à pH 2,3	44
1°) Précipitation par le Cetavlon	45
2°) Etude des mucines isolées	46
3°) Couplage d'une chromatographie d'échange ionique (Ecteola-cellulose) et d'une chromatographie d'exclusion sur colonne de Sepharose 2B ou 4B	48
a) Protocole expérimental	49
b) Résultats obtenus	49
c) Composition en acides aminés des mucines purifiées par chromatographie sur Ecteola-cellulose et gel-filtration sur Sepharose 4B ou 6B	51
D) CHOIX D'UNE METHODE DE PURIFICATION DES MUCINES BRONCHIQUES	60
<u>CHAPITRE III : CRITERES DE PURETE DES MUCINES</u>	
<u>ISOLEES</u>	62
A) CARACTERISTIQUES REMARQUABLES DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES	63
B) IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES EN POSITION N-TERMINALE	63
C) POIDS MOLECULAIRE DES MUCINES PURIFIEES	65
1) Préparations utilisées	65

2) Détermination du volume spécifique partiel	66
3) Mesure du coefficient de diffusion	67
4) Détermination de la constante de sédimentation	68
a) Constantes de sédimentation de la fucomucine et de la sialomucine	69
b) Influence de la concentration saline du solvant sur la constante de sédimentation d'une sialomucine	71
5) Calcul de la masse moléculaire	72
6) Discussion des résultats	72

CHAPITRE IV : CLASSIFICATION DES MUCINES BRONCHIQUES

76

A) CLASSIFICATION BIOCHIMIQUE DES MUCINES DE KYSTES BRONCHOGENIQUES	77
1) Sécrétion des sulfomucines et des fucomucines	77
2) Sécrétion d'une sialomucine	78
3) Résultats	79
4) Conclusions	81
B) ETUDE DES GLYCOPEPTIDES DU MUCUS FIBRILLAIRE D'HYPERSÉCRETIONS BRONCHIQUES	82
1) Préparation des glycopeptides du mucus bronchique fibrillaire	83
a) Fractionnement de l'hydrolysât papaïne-pronase par le Rivanol à pH 1,5 - chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A 25	84
b) Electrophorèse préparative en film liquide	86
2) Résultats	86
a) Fractionnement par le Rivanol et chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A 25	86
b) Fractionnement de l'hydrolysât de mucus fibrillaire par électrophorèse préparative à haut voltage sur appareil Elphor-Vap	89
c) Etude critique des deux méthodes de fractionnement	90

3) Composition glucidique des glycopeptides du mucus fibrillaire	90
4) Conclusions	94
C) CLASSIFICATION DES MUCINES D'HYPERSÉCRETIONS BRONCHIQUES	95
1) Composition glucidique de mucines purifiées à partir d'expectorations individuelles	95
2) Eléments de classification des fucomucines bronchiques	99
3) Eléments de classification des sialomucines	100
a) Action de la neuraminidase bactérienne	101
b) Etude électrophorétique de sialomucine avant et après action de la neuraminidase	102
4) Eléments de classification des sulfomucines	102
5) Conclusions	102
D) QUALITÉ D'ÉCHANGEUR D'IONS DES MUCINES BRONCHIQUES	103
1) Colorations histochimiques de caractère polyanionique	104
2) Modifications du spectre d'une solution de Bleu de Toluidine par addition des divers types de glycopeptides de mucines bronchiques	104
a) Protocole expérimental	104
b) Résultats	106
1°) Glycopeptides de bronchite chronique	106
2°) Glycopeptides de mucus fibrillaire de mucoviscidose	108
3°) Etude des mucines natives	108
3) Modifications de la capacité de fixation du Bleu de Toluidine par les sialo-sulfoglycopeptides	108
a) Effet de la force ionique et du pH	108
b) Fixation des peptides basiques par les sialosulfo-glycopeptides	109
c) Fixation des protéines	110

E) ORIGINE CELLULAIRE DES MUCINES SULFATEES DE L'EXPECTORATION	112
1) Protocole expérimental	112
a) Etude histologique	113
b) Démonstration de l'incorporation du radio-sulfate dans les glycopeptides	113
1°) Chromatographie de gel-filtration sur Biogel P 20	114
2°) Localisation cellulaire des sulfo-transférases	114
2) Etude des glycopeptides isolés des fragments tissulaires et marqués par le $^{35}\text{SO}_4^{--}$	117
a) Isolement des glycopeptides	117
b) Localisation du sulfate au niveau des glycopeptides du mucus fibrillaire	118
3) Conclusion	119
F) ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DES CELLULES SEREUSES ET DES CELLULES MUQUEUSES	119
<u>CHAPITRE V : ELEMENTS DE STRUCTURE DES MUCINES BRONCHIQUES</u>	122
A) ETUDE DE L'EXTREMITÉ N-TERMINALE DES MUCINES	123
B) ETUDE DU POINT D'ATTACHE GLYCANE-PROTEINE DES MUCINES BRONCHIQUES	125
1) Modifications de l'absorption spectrophotométrique à 241 nm	126
2) Identification des acides α -cétoniques formés dans la lithine 0,09 N	127
3) Composition en acides aminés après traitement par la soude	129
a) Conditions de rupture des liaisons alcali-labiles	130
b) Résultats obtenus	131
C) DISTRIBUTION DES GLYCANNES SUR L'AXE POLYPEPTIDIQUE	134

1) Etude des glycopeptides du mucus fibrillaire ...	134
a) Composition en acides aminés après traitement alcalin	135
b) Etude chromatographique des glycopeptides après traitement par la soude 0,5 N	136
2) Etude des glycopeptides préparés à partir des mucines purifiées	139
a) Préparation des glycopeptides des mucines bronchiques	140
1°) Hydrolyse par un mélange de carboxypeptidases A et B	141
2°) Hydrolyse par l'aminopeptidase M	141
b) Homogénéité des glycopeptides obtenus par protéolyse des mucines	142
1°) Protocole expérimental	142
- Chromatographie de gel-filtration sur Sephadex G-15	142
- Chromatographie d'échange ionique des glycopeptides de mucine	142
2°) Résultats	143
D) ETUDE DES GLYCANNES D'UN GLYCOPEPTIDE DE MUCINE RICHE EN FUCOSE ET POSSEDANT UNE ACTIVITE DE SUBSTANCE DE GROUPE SANGUIN H	147
1) Traitement alcalin	147
2) Oxydation periodique	149
a) Conditions opératoires	149
b) Résultats	152
c) Discussion des résultats	152
E) ETUDE DE LA SEQUENCE AU VOISINAGE DU POINT D'ATTACHE GLYCANNE-PROTEINE	154
1) Etude du sialoglycopeptide	154
a) Préparation et composition en acides aminés	154
b) Séquence N-terminale déterminée par dégradation d'Edman et identification des acides aminés N-terminaux par méthode de dansylation	156
2) Etude du fucoglycopeptide	156

3) Discussion des résultats obtenus	158
F) CONCLUSIONS	160
<u>RESUME</u>	164
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	168

APPENDICE TECHNIQUE

I - <u>ETUDE ELECTROPHORETIQUE ET IMMUNOELECTROPHORETIQUE</u>	T 2
A) ELECTROPHORESE EN AGAROSE	2
1) Gel d'agarose à 0,9 p.100	2
2) Tampon véronal sodé-HCl de pH 8,2	2
3) Préparation des lames	2
4) Révélation des lames d'électrophorèse	3
a) Coloration par l'Amidoschwarz	3
b) Coloration par le Réactif de Schiff après oxydation periodique	3
c) Coloration par le Bleu de Toluidine	4
d) Coloration par le Violet de Crésyl	5
e) Coloration par le Bleu Alcian	5
B) IMMUNOELECTROPHORESE	6
II - <u>TECHNIQUES DE PURIFICATION DES GLYCOPROTEINES</u>	7
A) CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION	7
1) Préparation du gel	7
2) Préparation de la colonne	7
3) Mode opératoire	8
B) CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE IONIQUE	8
1) Préparation de l'échangeur et montage de la colonne	9
2) Conditions d'élution	10

a) Gradient discontinu	T 10
b) Gradient continu	10
C) ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN FILM LIQUIDE A HAUT VOLTAGE	10
1) Principe	11
2) Protocole opératoire	11
III - <u>METHODES D'ETUDE DES GLUCIDES</u>	13
A) DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTE- SIMALE DES OSES	13
1) Dosage du galactose	13
a) Réactifs	14
b) Mode opératoire	14
2) Dosage des hexosamines	16
3) Dosage du fucose	17
4) Dosage de l'acide sialique	18
5) Groupements sulfate	18
a) Repérage semi-quantitatif	18
b) Dosage par la méthode de DOGSON et PRICE	19
B) IDENTIFICATION DES GLUCIDES ET COMPOSI- TION MOLAIRES DES OSES	20
1) Identification des oses neutres	20
2) Identification des osamines	21
a) Matériel	21
b) Mode opératoire	22
3) Identification de l'acide sialique	23
IV - <u>METHODES D'ETUDE DES ACIDES AMINES</u>	23
A) DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES	23
B) DOSAGE A LA NINHYDRINE SUR AUTO- AUTOANALYSEUR TECHNICON	25
1) Réactif à la ninhydrine	26
2) Mode opératoire	26
C) DETERMINATION DES AMINO-ACIDES EN POSITION N-TERMINALE : METHODE DES DANSYL-AMINO-ACIDES	27

1) Dansylation du matériel utilisé	T 27
2) Chromatographie des dansyl-amino-acides ...	27
D) DEGRADATION D'EDMAN	29
1) Matériel et réactifs	29
2) Technique	29
E) IDENTIFICATION DE L'AMINO-ACIDE EN POSITION C-TERMINALE	31
1) Matériel et réactifs	31
2) Préparation des enzymes	31
3) Hydrolyse enzymatique	31
<u>BIBLIOGRAPHIE DE L'APPENDICE TECHNIQUE ...</u>	33

INTRODUCTION

De nombreuses difficultés s'attachent à la définition des mucines bronchiques. La sécrétion normale ne peut en effet être obtenue qu'en très faible quantité, toujours insuffisante pour permettre une définition chimique précise de ses constituants. A l'inverse, les états d'hypersécrétions chroniques relèvent de processus pathologiques qui conduisent à l'élimination au cours des efforts de toux de l'expectoration. C'est donc généralement vers l'étude de l'expectoration que la plupart des auteurs se sont orientés pour tenter d'approcher la définition des glycoprotéines sécrétées au niveau de la muqueuse trachéo-bronchique.

Dès 1953, WERNER (1)^{*} souligne la richesse en glucides combinés (galactose, mannose, fucose, acide sialique et N-acétyl-hexosamines) des composants adialysables de l'expectoration. Bien que l'isolement et la purification de glycoprotéines individuelles de l'expectoration aient été tentés par de nombreux auteurs (CURTAIN, MARMION et PYE, 1953)(2), (BUKANTZ et BERNIS, 1958)(3), (BROGAN, 1959)(4)(5), (WHITE, ELMES et WHITLEY, 1959)(6), (ATASSI, BARKER et STACEY, 1959)(7) (1962 (8)), la plupart de ces préparations n'ont pu satisfaire aux critères d'homogénéité et n'ont donc pu faire l'objet d'une étude suffisante pour leur définition et leur classification. La plupart des techniques de fractionnement sont d'ailleurs appliquées à des hydrolysats pepsiques qui risquent d'altérer la structure peptidique de certains de ces composants ou font

(*) Le numéro entre parenthèses correspond à l'ordre d'apparition des citations dans le texte.

appel au contraire à des méthodes de précipitation au point isoélectrique mises en oeuvre sur l'expectoration homogénéisée, méthodes certainement insuffisantes pour conduire à une élimination complète des protéines plasmatiques ou des protéines de sécrétion caractérisées par les méthodes immunologiques (BISERTE, HAVEZ et CUVELIER, 1963)(9).

En 1963, GIBBONS (10) décrit brièvement l'isolement d'une glycoprotéine de l'expectoration dont il rapporte la composition : hexosamines 19,1 p.100, galactose 21,9 p.100, fucose 12,5 p.100 et acide N-acétyl-neuraminique 8,3-9,1 p.100. Il souligne la sensibilité de cette glycoprotéine à l'action de la neuraminidase qui libère 83 p.100 de l'acide N-acétyl-neuraminique.

Ces résultats encore très partiels démontraient pourtant la possibilité d'obtenir à partir de l'expectoration des glycoprotéines épithéliales, mais soulignaient l'importance d'une meilleure connaissance des propriétés physico-chimiques de la sécrétion bronchique et d'une adaptation des méthodes de fractionnement aux propriétés particulières de ces glycoprotéines.

Une étape décisive est franchie en 1963 lorsqu'on peut mettre en évidence l'action d'agents divers : urée 6M, chlorhydrate de guanidine 3,2 M, bromure de lithium 8 M sur les propriétés visco-élastiques du mucus bronchique. De même, un agent réducteur (cystéine 0,075 M, mercapto-éthanol) est capable de détruire totalement l'organisation fibrillaire du mucus, visible en microscopie optique (BISERTE, HAVEZ et CUVELIER)(11). Des liaisons hydrogène, l'intervention de ponts disulfure pouvaient alors être invoquées dans la structure des réseaux fibrillaires et permettait aisément de centrer

l'intérêt sur le mucus organisé débarrassé de ses produits solubles dans l'eau et qui ne constitue qu'une partie des hypersécrétions pathologiques.

L'écueil majeur que représente l'influence de la contamination bactérienne sur les produits de sécrétion stagnant dans l'arbre bronchique peut alors être éliminé dans la mesure où l'étude va porter sur la sécrétion organisée, débarrassée par lavage à l'eau des produits de dégradation bactérienne ou de lyse cellulaire. Ces réseaux fibrillaires totalement insolubles dans l'eau perdent leurs propriétés visco-élastiques sous l'action d'un agent réducteur et libèrent les protéines et les mucines qui peuvent alors être fractionnées.

Une seconde étape importante est représentée par l'apport des méthodes nouvelles de fractionnement telles que l'électrophorèse préparative en film liquide à haut voltage, l'introduction de tamis moléculaire adaptés à la séparation de protéines et de glycoprotéines de poids moléculaires compris entre 50.000 et 1.000.000. Cet apport technologique nouveau devait être confronté aux méthodes de précipitation au point isoélectrique, à l'utilisation déjà classique des celluloses à pouvoir d'échange ionique. Cette étude entreprise dès 1966 nous a conduit progressivement à définir les critères de pureté d'une préparation de mucines bronchiques. Nous avons alors été amené à confronter ces préparations obtenues à partir d'hypersécrétions pathologiques à des productions épithéliales protégées de toute contamination bactérienne telles que les sécrétions de kystes bronchogéniques.

Les résultats obtenus nous permettent actuellement de réfuter les nombreuses assertions qui tendent à reconnaître dans les glyco-

protéines épithéliales un caractère de polydispersion en rapport avec la structure et les mécanismes de synthèse de ces productions glandulaires. Une définition précise des mucines bronchiques peut se référer aux critères habituellement retenus pour la caractérisation d'une glycoprotéine homogène : composition en acides aminés, nature de l'acide aminé N-terminal, constante de sédimentation. Leur polydispersion réapparaît au contraire dans l'hétérogénéité du caractère polyanionique des multiples glycannes qui entrent dans leur structure et confèrent à ces molécules tout un ensemble de propriétés biologiques fondées sur cet élément de classification des divers types de productions cellulaires.

Ces critères de pureté des diverses classes de mucines bronchiques nous ont permis d'aborder quelques éléments de structure de l'axe polypeptidique au voisinage de l'extrémité N-terminale, ainsi que de préciser les particularités remarquables des séquences peptidiques environnant le point d'attache des glycannes.

Nous diviserons donc la présentation de ces résultats en cinq parties :

- 1) La présentation du matériel d'étude.
- 2) Les diverses méthodes utilisées pour la purification des mucines bronchiques.
- 3) Les critères de pureté retenus pour la définition des mucines.
- 4) La classification des mucines bronchiques fondée sur l'hétérogénéité des glycannes.
- 5) Les éléments de structure des mucines bronchiques.

CHAPITRE I

MATERIEL D'ETUDE

A l'état physiologique, l'ensemble des voies respiratoires est tapissé d'une mince couche fluide qui constitue un élément fondamental aussi bien dans la microphysiologie de surface que dans les mécanismes d'épuration bronchique. Ce mucus bronchique, recueilli au niveau de la bifurcation trachéale possède des qualités physico-chimiques d'élasticité, de viscosité et d'adhérence qui lui permettent d'assurer les fonctions d'épuration et de protection des voies aériennes grâce à la structure particulière de ces sécrétions qui s'adapte parfaitement à l'action propulsive du système ciliaire. Il est cependant impossible de recourir aux techniques endoscopiques pour prélever "in situ" des quantités suffisantes de sécrétion physiologique. D'ailleurs, la simple introduction du bronchoscope au niveau de la trachée déclenche une réaction locale d'hypersécrétion liée à des phénomènes importants d'extravasation capillaire.

L'étude biochimique de la sécrétion bronchique se heurte donc dès l'abord à des problèmes qui tiennent à la fois, à la variabilité de sa composition d'une sécrétion individuelle à l'autre, à son hétérogénéité de constitution et d'origine, à sa visco-élasticité et aux difficultés quasi-insurmontables de prélèvement "in situ" qui nous amènent à étudier des sécrétions pathologiques.

L'examen macroscopique de l'expectoration nous conduit à distinguer plusieurs phases dans l'organisation et dans la composition chimique des sécrétions bronchiques. Le stade préliminaire d'une étude biochimique de l'expectoration a donc été représenté par une tentative de séparation de ces différentes phases. Les différences enregistrées dans la composition chimique de chacune d'elles soulignent leur particularité qui est fonction de leur origine et peut-être de leur signification physio-pathologique.

L'addition de trois volumes d'eau distillée à une expectoration fraîchement émise, permet après 20 minutes d'agitation douce d'obtenir par centrifugation trois parties distinctes :

- une phase fibrillaire recueillie au fond du tube de centrifugation ;
- une phase aqueuse de composants solubles dans l'eau ;
- et enfin, une phase superficielle d'épaisseur variable, douée de propriétés tensio-actives.

Ce fractionnement de base nous permet d'entrevoir l'hétérogénéité d'organisation et de structure de l'expectoration.

A) PHASE SUPERFICIELLE

La phase superficielle se caractérise par ses propriétés tensio-actives et par la facilité avec laquelle elle donne une "mousse" par simple agitation (figure 1). La présence d'une lécithine riche en acide palmitique et en tous points semblable à celle décrite par ABRAMS (12)(13), FINLEY (14), MORGAN (15), HARLAN (16) et FINLEY (17), comme étant constitutive du surfac-

tant alvéolaire, nous conduit à penser que la phase superficielle de l'expectoration correspond au surfactant alvéolaire à l'état presque pur et sous forme libre. Nous avons pu vérifier (WAREMBOURG et al.)(18) la similitude de composition de cette dipalmitoyl-lécithine avec celle obtenue à partir d'un broyat pulmonaire ou à partir d'un liquide de lavage endopulmonaire. Le mode de préparation du surfactant présent dans l'expectoration s'apparente d'ailleurs à celui préconisé par BONDURANT (19) et WATKINS (20) qui préparent et purifient le surfactant alvéolaire à partir de lavages bronchiques.

Nous verrons également que le surfactant alvéolaire existe aussi dans l'expectoration sous une forme combinée aux mucines et aux protéines de sécrétion réalisant un complexe de haut poids moléculaire entrant dans la structure de la phase fibrillaire.

B) PHASE AQUEUSE DE L'EXPECTORATION

La phase aqueuse représente le produit d'extraction des composants directement solubles dans l'eau, de l'expectoration. Cette fraction correspond à de nombreux composants d'origine sérique, mais aussi à des produits de contamination d'origine salivaire, l' α -amylase par exemple (BISERTE)(21) (MASSON (22)). Son étude électrophorétique ou immunoélectrophorétique a permis dès 1961 à HAVEZ et al. (23) de caractériser la présence de sérumalbumine, d'orosomucoïde, d' α_1 -antitrypsine, d'haptoglobine, d'hémopexine, de sidérophiline, de la fraction C'3 du complément et d'immunoglobulines telles que les IgA et les IgG. Ces protéines se trouvent pré-

sentes en quantité variable d'une sécrétion individuelle à l'autre.

L'application de l'immunoélectrophorèse en double dimension aux produits de lavage de l'expectoration nous permet de saisir l'importance et la richesse relative des sécrétions bronchiques en ces différentes protéines et glycoprotéines (figure 1).

La présence de 20 à 30 p. 100 de glucides libres ou combinés dans la phase aqueuse de l'expectoration nous conduit également à envisager la présence de produits de dégradation des mucines bronchiques qui appartiennent à la phase fibrillaire des sécrétions bronchiques. CUVELIER en 1963 (24) soulignait la nécessité d'un protocole précis pour le recueil et la conservation des expectorations. Le maintien à température du laboratoire d'une expectoration entraîne très rapidement une lyse des glycoprotéines qui peut être mise en évidence par l'enrichissement progressif de la phase aqueuse en acide sialique, en fucose, en galactose et enfin en hexosamines.

De nombreux enzymes ont d'ailleurs été mis en évidence : l' α -amylase, le lysozyme, des protéases et exoenzymes d'origine cellulaire ou bactérienne (LIEBERMAN)(25)(26) (HEREMANS)(27).

L'examen bactériologique de l'expectoration nous montre qu'il existe dans les états d'hypersécrétion une flore bactérienne, constante en dehors de tout épisode de surinfection aiguë. Cette flore "a minima" est représentée en particulier par deux germes : Diplococcus pneumoniae et Hemophilus influenzae. On peut souligner ainsi l'éventualité dans le milieu bronchique et dans l'expectoration de la présence de glycosidases telles que neuraminidase, fucosidase, galactosidase ou hexosaminidase.

La possibilité de lyse partielle des glycoprotéines de sécrétion nous a donc amené à retenir des conditions précises pour le recueil et la conservation des expectorations qui sont soit congelées à -20°C , soit traitées dans les heures qui suivent leur émission.

C) MUCUS FIBRILLAIRE DE L'EXPECTORATION

La phase fibrillaire, insoluble dans l'eau, représente la structure organisée de l'expectoration. Elle possède des qualités rhéologiques de visco-élasticité qui ne nous permettent pas d'appliquer directement sur le produit natif les techniques de fractionnement ou d'études biochimiques telles que l'électrophorèse de zone ou l'immunoélectrophorèse. Cette phase organisée est une structure de type fibrillaire. Ceci a été montré dès 1954 en microscopie électronique par WHITE, ELMES et WALSH (28) et étudié en microscopie optique par BURGI (29). L'étude de l'expectoration par coloration d'un frottis par le Bleu de Toluidine nous permet de visualiser un réseau de fibrilles d'épaisseur et de longueur variables, parfois confluentes pour réaliser de véritables fibres. Dans les mailles de ce réseau et baignant dans un liquide de moindre viscosité, sont présents des éléments cellulaires tels que des polynucléaires dont les noyaux sont parfaitement colorés par le Bleu de Toluidine. L'utilisation d'une coloration à l'orangé d'acridine à pH 2,0, préconisée par BURGI (30), montre l'hétérogénéité de composition des fibres du réseau. En effet, sous ultra-violet, les fibres présentent une fluorescence jaune-verdâtre caractéristique des acides nucléiques.

En fonction de ces affinités tinctoriales, les fibres apparaissent donc constituées de glycoprotéines de caractère acide et d'acides nucléiques.

BURGI (31), en microscopie optique, a pu observer la fragmentation de ces fibres lors de surinfections bronchiques de caractère aigu et mettre ainsi en évidence l'activité des enzymes bactériens ou cellulaires sur les constituants glycoprotéiques de la phase fibrillaire de l'expectoration.

C'est essentiellement vers l'étude des constituants de la phase organisée du mucus bronchique que nous avons orienté notre travail. En dehors des expectorations de bronchite chronique, nous avons également examiné les sécrétions d'enfants atteints de mucoviscidose, affection génétique dont on connaît la fréquence et la gravité des manifestations broncho-pulmonaires.

Depuis trois ans enfin, nous avons été amené à étudier le contenu de kystes bronchogéniques. Il s'agit de dysembryoplasies qui aboutissent à la formation de tumeurs bénignes fermées. Ces formations tumorales sont le résultat du développement et de la multiplication de quelques cellules embryonnaires provenant du bourgeon respiratoire et qui n'ont pas suivi une migration normale à la rencontre du mésenchyme pulmonaire pour participer au développement de l'arbre trachéo-bronchique. Ces cellules isolées vont se multiplier pour donner une formation kystique dont les caractères histologiques et anatomiques rappellent une "bronche". Ces tumeurs sécrétantes sont fermées, ne sont pas ventilées et sont de ce fait stériles. Le produit sécrété représente donc un matériel de choix, à l'abri de toute contamination.

CHAPITRE II

PURIFICATION DES MUCINES BRONCHIQUES

Après lavage des sécrétions bronchiques par trois volumes d'eau distillée, une centrifugation à faible vitesse (3.000 tours/minute pendant 10 minutes) nous permet de préparer le mucus fibrillaire et d'éliminer la phase superficielle et la phase aqueuse de l'expectoration.

Ce mucus fibrillaire, insoluble dans l'eau, renferme 70 p.100 de glucides combinés et 30 p.100 de protéines, de lipides et d'acides nucléiques. Parmi les glucides combinés figurent des hexoses et essentiellement le galactose : 22,8 p.100 (il n'existe que des traces de mannose), des hexosamines (glucosamine et galactosamine) : 22,8 p.100 ; du fucose : 15,8 p.100 et de l'acide sialique : 7,5 p.100. Ces valeurs ont été obtenues avec une expectoration émise par un sujet présentant une bronchite simple du fumeur. Les résultats seront différents d'une sécrétion individuelle à l'autre ; retenons toutefois que le pourcentage des protéines augmente dans la bronchite chronique (55 p.100) et atteint même des taux de 70 p.100 chez l'asthmatique. Il apparaît donc que les différents états de la pathologie bronchique s'inscrivent à travers le rapport glucides combinés/protéines (DEGAND)(32).

A) PREPARATION DES PROTEINES DU MUCUS PAR UN MECANISME D'ECHANGE IONIQUE

CUVELIER (33) obtient un fractionnement des composants du mucus bronchique traité par l'urée 6 M et déposé sur une colonne de DEAE-cellulose. ROUSSEL, en 1965 (34) parvient à éviter ce traitement par l'urée, en mélangeant directement le mucus à l'échangeur. Après une agitation en présence de DEAE-cellulose équilibrée en tampon phosphate $0,05\text{ M}$ de pH 8,0, le mélange est déposé sur une colonne de DEAE-cellulose équilibrée dans le même système tampon. L'élution est conduite selon un gradient discontinu par passage successif de trois solutions tamponnées :

- Tampon phosphate de sodium $0,05\text{ M}$ de pH 8,0
- Tampon phosphate de sodium $0,15\text{ M}$ de pH 5,5
- Tampon phosphate de sodium $0,3\text{ M}$ de pH 4,3

puis d'une solution de carbonate de sodium $0,3\text{ M}$.

Une solution de soude $0,1\text{ M}$ permet en fin de gradient de désioniser complètement l'échangeur et d'éluer le reliquat.

L'élution est suivie par lecture de la densité optique à 278 nm des fractions obtenues et recueillies sur collecteur.

Après dialyse et lyophilisation, un bilan électrophorétique et immunoélectrophorétique est réalisé sur les différents éluats.

ROUSSEL (34) précise le rendement de chacune des fractions par rapport au matériel déposé sur la colonne et donne les résultats concernant leur composition en glucides combinés.

(Tableau I)

Tableau I

Bilan des fractions séparées sur colonne de DEAE-cellulose
(ROUSSEL)(34)

Tampon d'élution	Phosphate 0,05 M pH 8,0	Phosphate 0,15 M pH 5,5	Phosphate 0,3 M pH 4,3	CO ₃ Na ₂ 0,3 M	NaOH 0,1 N
Répartition en % du total	5	20	9	46	20
Osamines (*)	3	4	11,5	12,5	18
Oses (*)	3,5	5,5	12,5	11,5	18
Acide sialique (*)	1,5	1,5	4	7	7
Fucose (*)	3	5,5	8	11,5	15
Total de la copule polysaccharidique	11	16,5	36	42,5	58

(*) Résultats exprimés en pourcentage du poids sec.

Ce fractionnement sur échangeur d'ions permet donc de classer les constituants du mucus bronchique en deux grands groupes :

- Le premier correspondant aux premiers tampons d'élution, se caractérise par l'importance de la teneur en protéines des fractions éluées. Les études électrophorétique et immunoélectrophorétique (vis-à-vis d'immunsérum humain total ou d'immunsérum anti-expectoration) nous montrent d'ailleurs la présence de protéines ou de glycoprotéines possédant des sites antigéniques analogues à ceux des protéines du sérum et d'autre part des protéines non révélées par l'immunsérum humain total, mais donnant des arcs de précipitation avec l'immunsérum anti-expectoration, ce qui nous permet d'envisa-

ger l'origine spécifiquement bronchique de certaines "protéines de sécrétion" (BISERTE et al.)(35).

- Le deuxième groupe représenté par les éluats CO_3Na_2 0,3 M et NaOH 0,1 N est riche en glucides combinés (42,5 et 58 p. 100). Ces valeurs sont analogues à celles rencontrées dans les mucines de sécrétion.

Cette technique d'étude parvient donc à désorganiser le mucus fibrillaire et à en séparer différents constituants. Toutefois, la difficulté technique que représente la faible vitesse d'élution des colonnes en rend l'utilisation délicate. D'autre part, la nécessité d'élution des mucines en milieu alcalin est susceptible d'introduire une modification importante de la structure de ces glycoprotéines et fait que cette méthode ne peut guère être retenue que pour la préparation des protéines du mucus fibrillaire éluées en tampon phosphate.

B) ACTION DES AGENTS REDUCTEURS SUR LE MUCUS FIBRILLAIRE

Dès 1964, (HAVEZ et al.)(36), nous nous sommes attaché à définir un protocole expérimental qui permette une dégradation satisfaisante du mucus fibrillaire et qui soit compatible avec l'étude des éléments caractéristiques de la structure des molécules libérées. La viscosimétrie représente une technique intéressante pour saisir l'importance d'une action mucolytique. Ce sont ces études viscosimétriques (HAVEZ et al.)(37) qui nous ont amenés à distinguer

différents types d'activité mucolytique selon l'importance de la dégradation obtenue. Une lyse très limitée du mucus géliforme peut être obtenue par l'utilisation d'agents visant à rompre les liaisons non covalentes établies entre les protéines et glycoprotéines du mucus ou visant à modifier la structure tertiaire ou quaternaire de ces molécules. Nous avons ainsi étudié l'effet obtenu par modification du pH, par modification de la force ionique, par élimination du Ca^{++} et par des solutions d'urée à forte concentration. Ces diverses tentatives de dépolymérisation, de désorganisation du gel sont insuffisantes et ne permettent pas l'étude et la purification des produits libérés.

En fonction des résultats déjà obtenus par SHEFFNER (38) sur les sécrétions digestives, nous avons en 1964 utilisé les agents réducteurs tels que la cystéine ou la N-acétyl-cystéine comme mucolytique de l'expectoration. On peut en effet en quelques heures obtenir une mucolyse satisfaisante du mucus fibrillaire, par rupture de ponts disulfure dont l'intégrité apparaît essentielle pour assurer la cohésion des réseaux tridimensionnels.

L'effet de la cystéine a été observé à différentes concentrations 0,025 M, 0,050 M, 0,075 M et 0,1 M en tampon phosphate de pH 7,3. On constate que la mucolyse est fonction de la concentration en cystéine. Le maximum d'action est obtenu pour une concentration finale en cystéine de 0,075 M. Des concentrations plus importantes n'apportent pas de chute de viscosité supérieure à 70 p. 100 de la viscosité initiale (mesure effectuée sur Micro Cone-Plate Viscosimeter Brookfield). Nous avons pu constater, selon les sécrétions bronchiques, des différences significatives de leur sensibilité à l'action des agents réducteurs. Il apparaît que le mucus

d'asthme est particulièrement sensible à l'action de ces agents. Ceci peut d'ailleurs être rapproché du taux élevé des protéines et en particulier des immunoglobulines, enregistré dans ces sécrétions (DEGAND)(39).

Bien qu'obtenant une mucolyse satisfaisante, nous avons ensuite remplacé la cystéine par le mercapto-éthanol à la concentration de 1 p. 100 pour éviter toute contamination de nos préparations purifiées par la cystéine susceptible d'interférer dans l'étude de leur composition en amino-acides.

1) Mode d'action des agents réducteurs sur le mucus fibrillaire

Pour étudier le mode d'action des agents réducteurs, nous avons soumis le mucus bronchique à une réduction par le mercapto-éthanol à 1 p. 100 en tampon phosphate 0,075 M de pH 7,3. Le blocage des groupes thiol libérés est obtenu par addition au milieu réducteur d'iodo-acétamide marqué par le ^{14}C . Après dialyse, le mucus réduit et alkylé est soumis à une chromatographie sur colonne de Sepharose 2B équilibrée en tampon Tris 0,1 M NaCl 0,2 M, pH 8,0. La lecture au spectrophotomètre à 278 nm, le dosage des oses à l'orcinol sulfurique permettent d'obtenir le diagramme d'élution présenté figure 2. La radioactivité est mesurée en flux continu sur enregistreur Packard (Figure 2).

Trois groupes de composants sont séparés par cette chromatographie de gel-filtration :

- Une fraction de haut poids moléculaire représentant un complexe entre des glycoprotéines et des constituants lipidiques

parmi lesquels se trouve la dipalmitoyl-lécithine d'origine alvéolaire, identifiée au surfactant (WAREMBOURG)(40).

- Une fraction riche en glucides combinés qui correspond à l'ensemble des mucines.

- Enfin, une fraction retardée dans le gel de Sepharose contient les éléments de plus faible taille moléculaire.

L'étude électrophorétique en agarose à pH 8,2 de cette fraction permet de caractériser la sérumalbumine, le lysozyme et des protéines de mobilité $\alpha\beta$ et γ -globulinique. L'immunoélectrophorèse identifie la transferrine bronchique et des immunoglobulines A et G. La radioactivité est essentiellement retrouvée dans cette fraction et peut donc être rapportée aux protéines des sécrétions bronchiques et plus particulièrement à la transferrine et surtout aux immunoglobulines. Le nombre de ponts disulfure de ces protéines peut expliquer l'importance de la radioactivité retrouvée :

Sérumalbumine	35
Transferrine bronchique	32
Immunoglobulines	78

Il apparaît ainsi que l'action du mercapto-éthanol se situe au niveau des ponts disulfure des protéines de sécrétion et non au niveau de la fraction riche en oses combinés qui correspond aux mucines.

Nous verrons d'ailleurs, lors de l'étude de la composition en acides aminés des mucines bronchiques purifiées, que ces glycoprotéines sont pauvres en cystéine et ne possèdent pas de ponts disulfure.

Le réseau fibrillaire apparaît ainsi comme une association des mucines par l'intermédiaire de ponts d'union réalisés par les protéines du mucus riches en ponts disulfure.

Ces résultats s'accordent d'ailleurs avec la grande sensibilité vis-à-vis des agents réducteurs des mucus de sujets asthmatiques dont nous avons déjà souligné la richesse en protéines et surtout en immunoglobulines : IgA. (DEGAND) (41)

La solubilisation de la phase fibrillaire peut donc être obtenue par réduction douce du mucus bronchique lavé et dialysé. La poudre lyophilisée de mucus fibrillaire est remise en suspension en tampon phosphate 0,075 M de pH 7,3 à la concentration de 10 mg par millilitre. Après 24 heures d'agitation à +4°C, la réduction du mucus est effectuée à l'aide du mercapto-éthanol utilisé à la concentration de 1 p. 100 (v/v) pendant 4 heures à 37°C. Une centrifugation à 3.000 tours/minute pendant 15 minutes permet de séparer le mucus solubilisé d'un culot de réduction qui est éliminé. Le surnageant ou gel réduit est dialysé contre eau distillée pendant 8 jours à +4°C, puis lyophilisé.

2) Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique des produits de réduction du mucus fibrillaire

Les produits de réduction du mucus fibrillaire représentent 60 à 70 p. 100 du mucus lyophilisé. Les études électrophorétiques et immunoélectrophorétiques nous ont permis de caractériser et d'identifier leurs composants majeurs (Figure 1).

a) Electrophorèse en agarose à pH 8,2

L'étude électrophorétique en agarose à pH 8,2 permet de caractériser quatre groupes de composants en fonction de leur mobilité électrophorétique et en fonction de leur affinité tinctoriale vis-à-vis de trois types de coloration :

- L'Amidoschwarz : colorant des protéines.
- Le réactif de Schiff après oxydation periodique : coloration des glycoprotéines (PAS).
- Le Bleu de Toluidine : colorant basique révélant les molécules de caractère acide.

Quatre groupes de constituants peuvent ainsi être décrits :

- Une fraction mineure révélée par le Bleu de Toluidine, de migration très anodique, possède un comportement électrophorétique analogue à celui des acides nucléiques.
- Une seconde fraction uniquement colorée par l'Amidoschwarz, possède une mobilité identique à celle de la sérumalbumine.
- Sur le versant anodique du godet de dépôt, un ensemble de composants sont colorés par l'Amidoschwarz, par le PAS et présentent un front anodique intensément révélé par le Bleu de Toluidine donnant parfois une métachromasie qui traduit l'existence à ce niveau de glycoprotéines de caractère polyanionique.
- Enfin, dans la zone de migration cathodique, une fraction protéique colorée par l'Amidoschwarz, possède un comportement analogue à celui d'une préparation témoin de lysozyme.

b) Etude immunoélectrophorétique en agar de pH 8,2

L'étude immunoélectrophorétique de la préparation d'adialysable réduit du mucus fibrillaire est réalisée à l'aide d'immunsérums préparés à partir du sérum humain total, de la salive, d'une fraction de lait de Femme (qui contenait des IgA, de la lactotransferrine et un peu de sérumalbumine). Enfin, nous avons également disposé d'immunsérums préparés à partir de mucus bronchique réduit.

Nous avons rapporté en 1966 (HAVEZ et al.)(42)(43), la présence des IgA, de la transferrine et de la kallikréine dans les sécrétions bronchiques. En 1965, TOMASI et coll. (44) caractérisent un déterminant antigénique spécifique des IgA salivaires et colostrales que leur étude par immunofluorescence permet de rattacher à une production glandulaire. Nous avons préparé chez le Lapin un immun-sérum anti-IgA colostrales selon un protocole utilisant le zymosan (HAVEZ et al.)(45). Cet immun-sérum révèle les IgA et les IgG du sérum humain saturé par des IgG purifiées, il est rendu spécifique des IgA du sérum (chaînes lourdes α des IgA). Nous obtenons chaque fois un arc de précipitation entre cet immun-sérum et les sécrétions bronchiques. Si nous saturons cet immun-sérum par une préparation d'IgA 7S isolées du sérum humain, nous obtenons encore une réaction de précipitation. Ces résultats confirment pleinement ceux de TOMASI (44) en les généralisant aux sécrétions bronchiques. Nous avons proposé de dénommer chaîne α_s , cette chaîne nouvelle incorporée dans la structure des IgA de sécrétion, et dont la présence doit être rapprochée des caractères macromoléculaires des IgA de sécrétion (MUH)(46).

Nous avons enfin pu caractériser dans le mucus réduit la transferrine bronchique qui possède des sites antigéniques communs

avec la lactotransferrine identifiée et isolée par MONTREUIL (47) du lait de Femme.

Une protéine de mobilité β -globulinique est présente dans le mucus réduit. Il s'agit d'une β_{25} -globuline qui correspond à la kallicréine, enzyme dont le rôle est maintenant bien établi dans la libération des kinines à partir du kallidinogène plasmatique.

Ces différents antigènes, IgA, transferrine, kallicréine, ont pu également être identifiés dans le produit d'extraction de lambeaux de muqueuse trachéale (HAVEZ et al.) (48)

Rappelons enfin que la présence de transferrine dans les glandes séreuses bronchiques a été démontrée en immunofluorescence par MASSON, HEREMANS et PRIGNOT (49).

Il apparaît donc que les protéines du mucus fibrillaire sont d'origine tissulaire au même titre que les mucines bronchiques dont nous envisageons ultérieurement l'origine tissulaire ou cellulaire.

C) ISOLEMENT DES MUCINES BRONCHIQUES A PARTIR DU MUCUS REDUIT PAR LE MERCAPTO-ETHANOL

Le protocole de préparation des mucines bronchiques a subi d'importantes modifications au cours de la réalisation de ce travail.

Les méthodes de préparation des mucines sont basées essentiellement sur deux propriétés de ces glycoprotéines :

- leur haut poids moléculaire
- et leur caractère acide.

Les techniques que nous avons été amené à utiliser sont donc représentées par :

- la chromatographie de gel-filtration
- l'électrophorèse préparative en film liquide à haut voltage
- les échangeurs d'ions et plus particulièrement les échangeurs d'anions du type ECTEOLA-cellulose.

Divers couplages de ces techniques ont été comparés en fonction de la composition en acides aminés des mucines purifiées.

1) Couplage de l'électrophorèse préparative en film liquide et de la chromatographie sur colonne de Sepharose 2B ou 4B

a) Electrophorèse préparative à haut voltage en film liquide à pH 8,6

Cette technique d'électrophorèse à haut voltage représente une méthode de choix pour l'analyse des produits de réduction du mucus fibrillaire. Nous rapportons figure 3 le diagramme obtenu chez un malade de groupe sanguin A atteint de bronchite chronique.

400 mg d'adialysable réduit sont soumis à l'électrophorèse préparative. L'électrophorèse est réalisée sous une tension de 1.750 à 1.850 volts et une intensité de 160 mA. La vitesse d'injection dans la chambre d'électrophorèse est de 70 ml/heure. Le point d'injection se situe au niveau du 40ème tube. La lecture à 260 et 278 nm, le dosage à l'orcinol des 48 tubes qui correspondent au fractionnement nous permettent d'individualiser cinq fractions :

A l'extrémité anodique du diagramme (tubes 1 à 5), une

fraction bien individualisée correspond à des acides nucléiques, caractérisés par leur spectre d'absorption. Etudiés en électrophorèse en agarose à pH 8,2, ces acides nucléiques sont intensément colorés par le Bleu de Toluidine.

Les tubes 6 à 12 représentent la fraction la plus importante quantitativement. Ce groupe majeur précipite à pH 2,3 et possède en électrophorèse en agarose à pH 8,2 une mobilité anodique. Colorées par le réactif de Schiff après oxydation periodique, les glycoprotéines qui le constituent présentent une intense affinité tinctoriale pour le Bleu de Toluidine. Cette fraction correspond essentiellement à des glycoprotéines de caractère acide, la préparation étant souillée par la présence de sérumalbumine mise en évidence en immunoélectrophorèse.

Les tubes 13 à 22 correspondent également à des glycoprotéines riches en oses et sont bien individualisés dans la courbe de dosage à l'orcinol. Cette fraction possède une faible absorption à 260 et à 278 nm. Etudiée en électrophorèse en agarose, cette préparation est colorée à la fois par l'Amidoschwarz et par le réactif de Schiff après oxydation periodique qui confirment sa nature glycoprotéique. Elle possède d'autre part, et ceci la distingue également de la fraction précédente, une activité importante de substance de groupe sanguin A. Son caractère acide moins marqué est mis en évidence par l'absence de révélation par le Bleu de Toluidine. L'immunoélectrophorèse montre que cette substance de groupe sanguin est souillée par la présence d'un faible contingent de transferrine bronchique.

Au niveau des tubes 23 à 40, la réaction à l'orcinol est faible. On note l'absorption des fractions à 278 nm. L'étude électrophorétique et immunoélectrophorétique des différentes fractions séparées en fonction de leur absorption à 278 nm permet d'identifier la transferrine bronchique, les IgA, puis la kallicréine au voisinage du point de dépôt où l'on peut noter la présence d'un faible contingent de glycopeptides neutres caractérisés par le dosage à l'orcinol.

Une fraction protéique obtenue dans les tubes 41 à 48 occupe la partie cathodique du diagramme. Elle correspond à un composant basique déjà décrit lors de l'étude du mucus réduit en électrophorèse en agarose. Il s'agit du lysozyme bronchique dont nous avons pu vérifier l'activité sur Micrococcus lysodeikticus.

L'électrophorèse préparative en film liquide à haut voltage permet donc un fractionnement satisfaisant des composants du mucus réduit. Elle assure une individualisation beaucoup plus nette que l'électrophorèse en agarose de deux groupes majeurs de glycoprotéines (F_2 et F_3) dont le moins anodique possède une importante activité de substance de groupe sanguin (F_3).

La composition glucidique et leur activité biologique soulignent leur parenté structurale avec les glycoprotéines épithéliales. Les fractions F_2 et F_3 se distinguent toutefois par leur richesse en acide sialique et en sulfate (tableau II).

La fraction F_2 contient 11 p. 100 d'acide sialique, mais également 5,5 p. 100 de groupement sulfate. La présence simultanée d'acide sialique et de sulfate dans les mucines de caractère acide peut être le fait d'une structure hybride des mucines ou le fait d'un mélange de mucines riches en acide sialique et de mucines

sulfatées. L'action de la neuraminidase sur la fraction F_2 obtenue en électrophorèse préparative nous a permis de constater l'hétérogénéité de cette fraction et nous a amené à rechercher un autre protocole visant à obtenir la séparation de ces deux groupes de mucines.

Tableau II

Composition glucidique des glycoprotéines épithéliales
séparées en électrophorèse préparative en film liquide à haut voltage

	F_2	F_3
Hexosamines	19	20
Hexoses (galactose)	17,5	19
Fucose	9,5	15
Acide sialique	11	4
Sulfate	5,5	0

Il faut toutefois noter que l'on ne peut obtenir une purification totale de ces glycoprotéines puisque la fraction II est souillée de sérumalbumine et que la transferrine possède une mobilité électrophorétique qui la situe au niveau du versant cathodique de la fraction III. Il apparaît donc impossible, de purifier les mucines bronchiques, par une seule étape de fractionnement électrophorétique.

Nous rapportons dans la figure 4 les résultats de l'étude de quatre sécrétions bronchiques individuelles. On reconnaît facilement les groupes essentiels caractéristiques des composants fibrillaires. Dans tous les cas, exceptée l'observation de cancer bronchique

ETUDE EN ELECTROPHORESE EN FILM LIQUIDE A HAUT VOLTAGE
DE SECRETIONS INDIVIDUELLES

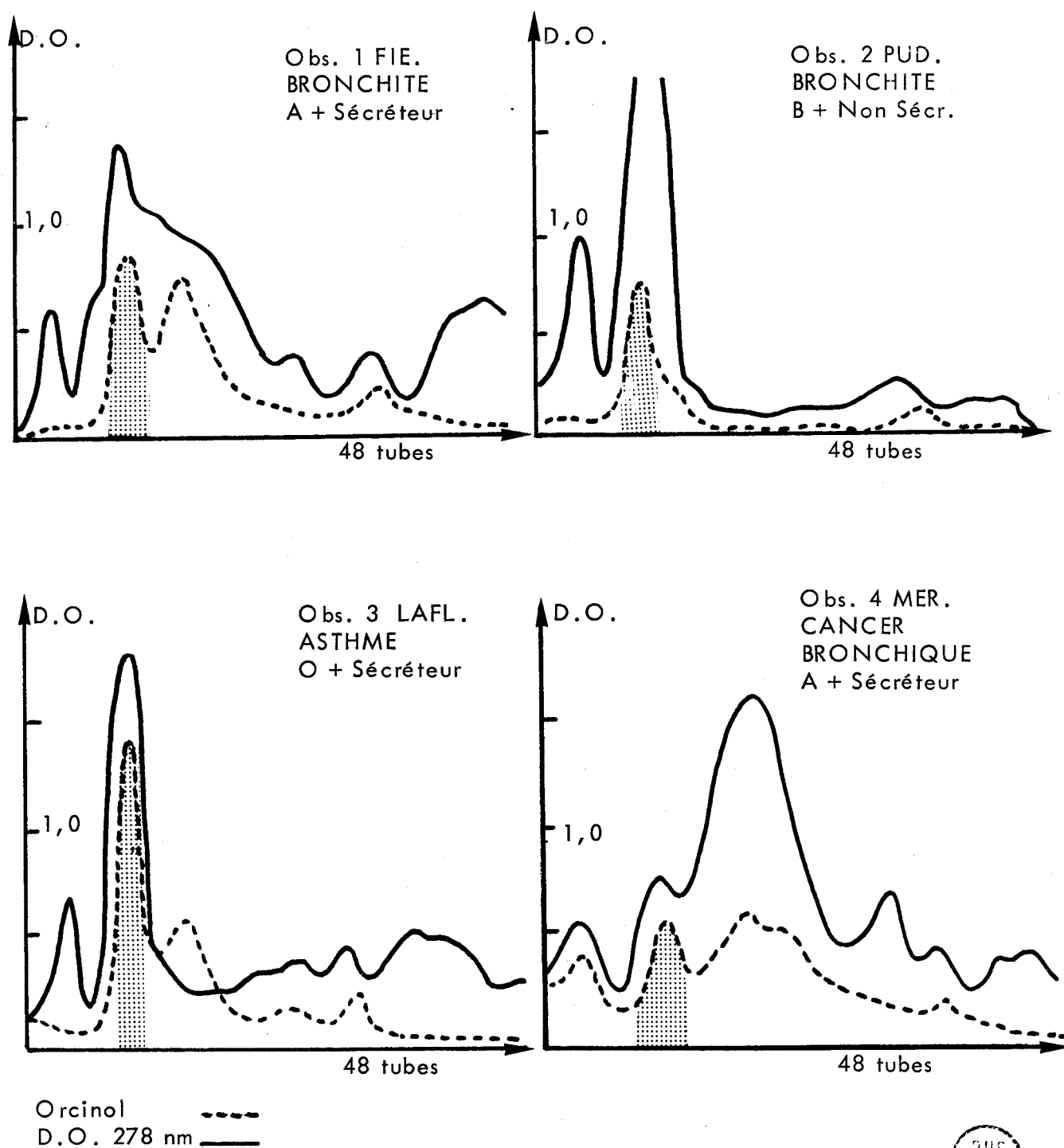


Figure 4



(Observation n° 4), le groupe des glycoprotéines acides représente la fraction majeure. Dans le cas du sujet de groupe sanguin B non sécréteur, on retrouve une importante activité Le^a . On peut noter à travers les résultats des observations n° 1 et n° 3, la grande variabilité de la fraction F_3 qui est essentiellement responsable de l'activité A ou H des sécrétions bronchiques étudiées.

Notons enfin, que dans les observations n° 2 et n° 3, la séparation électrophorétique est satisfaisante et permet d'obtenir le groupe des glycoprotéines acides. Il en est autrement pour les observations n° 1 et n° 4 où la séparation des glycoprotéines acides et des glycoprotéines riches en fucose est peu satisfaisante.

L'activité de groupe sanguin des mucines acides a été étudiée chez ces différents malades. Cette activité mesurée par une méthode d'inhibition de l'héماغglutination spécifique nous permet de neutraliser avec 156 microgrammes de préparation de FIE... (bronchite chronique) 1 ml d'immunsérum anti-A qui titre 1/32. 72 microgrammes de préparation de LAF... (asthme) inhibent la même quantité d'immunsérum anti-H ayant la même activité.

Il faut par contre 1,25 mg de préparation de MUL... (cancer bronchique) pour inhiber 1 ml de l'immunsérum anti-A.

Les fractions obtenues chez PUD... (sujet de groupe B) ne possèdent aucune activité de substance de groupe sanguin.

b) Chromatographie de gel-filtration du mucus réduit

La chromatographie de gel-filtration offre la possibilité de fractionner les constituants du mucus réduit en fonction de leur taille moléculaire. Cette chromatographie peut être adaptée selon le type de Sephadex utilisé à la préparation des protéines réduites ou à la séparation des mucines bronchiques de plus haute taille moléculaire.

1°) Chromatographie de gel-filtration sur
Sephadex G-200

Le mucus réduit (250 mg d'adialysable) est déposé sur une colonne de Sephadex G-200 (53 x 4 cm) équilibrée en tampon Tris 0,1 M, NaCl M. L'élution est obtenue par passage de ce même tampon. L'éluat est recueilli par fractions de 5 ml sur collecteur et la lecture de la densité optique à 278 nm permet d'identifier quatre fractions.

- La première fraction quantitativement la plus importante est étudiée en agarose à pH 8,2. Elle possède une mobilité anodique faible, migrant immédiatement en avant du godet de dépôt. Elle est révélée par l'Amidoschwarz, mais surtout et très intensément par le PAS. Le front anodique prend la coloration par le Bleu de Toluidine.

Les immunsérums anti-protéines sériques et anti-protéines de lait révèlent dans cette fraction les IgA. L'importance de la coloration PAS nous permet d'envisager que cette fraction est essentiellement de nature glycoprotéique.

- La seconde fraction correspond à un mélange de transferrine, de β_{2S} -globuline et d'albumine.

- La fraction III est identifiée à la kallicréine et à la sérumalbumine.

- La fraction IV qui correspond à un sous-fractionnement de F III contient essentiellement la sérumalbumine.

Ce système chromatographique de gel-filtration sur Sephadex G-200 n'est donc pas adapté au problème de la séparation des mucines puisque ces dernières exclues du gel sont éluées en même temps que les IgA.

L'apparition récente des gels de Sepharose nous a permis de reprendre cette étude de la gel-filtration appliquée directement sur le mucus réduit.

2°) Chromatographie d'exclusion sur Sepharose 2B ou 4B

300 mg de mucus réduit repris dans 10 ml de tampon Tris 0,1 M NaCl 0,2 M de pH 8,0, sont déposés sur une colonne (60 x 4,5 cm) de Sepharose 2B. L'élution est suivie par lecture des variations de densité optique mesurées à deux longueurs d'onde : 260 et 278 nm. On établit en outre, pour identifier les mucines, la courbe du dosage des oses combinés par la méthode à l'orcinol sulfurique adaptée à l'auto-analyseur Technicon. Trois fractions sont individualisées et séparées en fonction de leurs poids moléculaires. (figure 2)

- Une fraction exclue du gel de Sepharose correspond à ce que nous dénommons "muco-protéine". Il s'agit en fait d'un complexe de haut poids moléculaire dans lequel nous avons pu montrer la présence d'une dipalmitoyl-lécithine (surfactant d'origine alvéolaire)

associé à l'ensemble des mucines acides du mucus.

- Une fraction retardée s'inscrit sur le diagramme en fonction de sa réponse au dosage à l'orcinol. Elle possède une absorption très faible à 260 et 278 nm. Il s'agit de l'ensemble des glycoprotéines épithéliales du mucus réduit parmi lesquelles se localise l'activité de groupe sanguin.

- La fraction la plus retardée, correspond à l'ensemble des protéines du mucus. L'étude électrophorétique en agarose et surtout l'étude immunoélectrophorétique permet de caractériser les IgA, la transferrine, la sérumalbumine, la kallikréine et le lysozyme. Des éluats glycoprotéiques de plus faible taille moléculaire y sont également caractérisés. Il est possible de soumettre cette fraction à une seconde chromatographie adaptée au fractionnement des protéines du mucus.

La chromatographie de gel-filtration sur Sepharose nous permet donc d'étudier le rapport mucoprotéine/mucine/protéine d'un mucus réduit. Il apparaît ainsi que les glycoprotéines de sécrétion sont éluées en une seule fraction, ce qui souligne l'homogénéité de taille moléculaire des mucines bronchiques, quelle que soit l'importance de leur caractère acide. Il nous faut surtout retenir la possibilité d'éliminer par ce type de fractionnement le complexe mucoprotéine-surfactant alvéolaire de l'ensemble des mucines.

Ces résultats nous ont amené à associer ces deux méthodes de fractionnement : Sepharose 2B ou 4B et électrophorèse préparative en film liquide à haut voltage, pour améliorer la purification des mucines séparées.

c) Couplage Sepharose 2B - Electrophorèse préparative
à haut voltage

Le mucus réduit est soumis à une gel-filtration sur colonne de Sepharose 2B. Nous illustrons figure 5 le résultat de ce fractionnement à partir d'un mucus réduit de kyste bronchogénique. Les fractions obtenues après gel-filtration sont dialysées et lyophilisées. La fraction II qui correspond à l'ensemble des mucines débarrassées de la mucoprotéine et des protéines d'origine sérique ou tissulaire, fait l'objet dans un second temps, d'une électrophorèse préparative à haut voltage réalisée dans les conditions déjà précisées.

Le dosage à l'orcinol permet d'identifier deux groupes de constituants, l'un de mobilité très anodique correspond à une mucine de caractère sulfaté (comme l'objective le dosage semi-quantitatif du sulfate effectué sur les dix premiers tubes). Une seconde fraction possède la mobilité électrophorétique des mucines de caractère neutre à activité de groupe sanguin.

Ce couplage s'avère très satisfaisant lorsqu'il s'agit de fractionner deux populations distinctes telles que celles que nous avons rencontrées dans cette sécrétion de kyste bronchogénique. Elle l'est déjà beaucoup moins lorsqu'apparaît un gradient progressif du caractère polyanionique tel qu'on le rencontre dans de nombreuses hypersécrétions pathologiques.

Nous rapportons dans le tableau III les compositions en acides aminés de mucines purifiées par ce type de fractionnement dans un cas de bronchite chronique (STE...) et celle d'une sialomucine isolée d'une hypersécrétion de mucoviscidose.

On constate une grande hétérogénéité dans la teneur globale de ces préparations en acides aminés : 15 à 25 p. 100 du poids

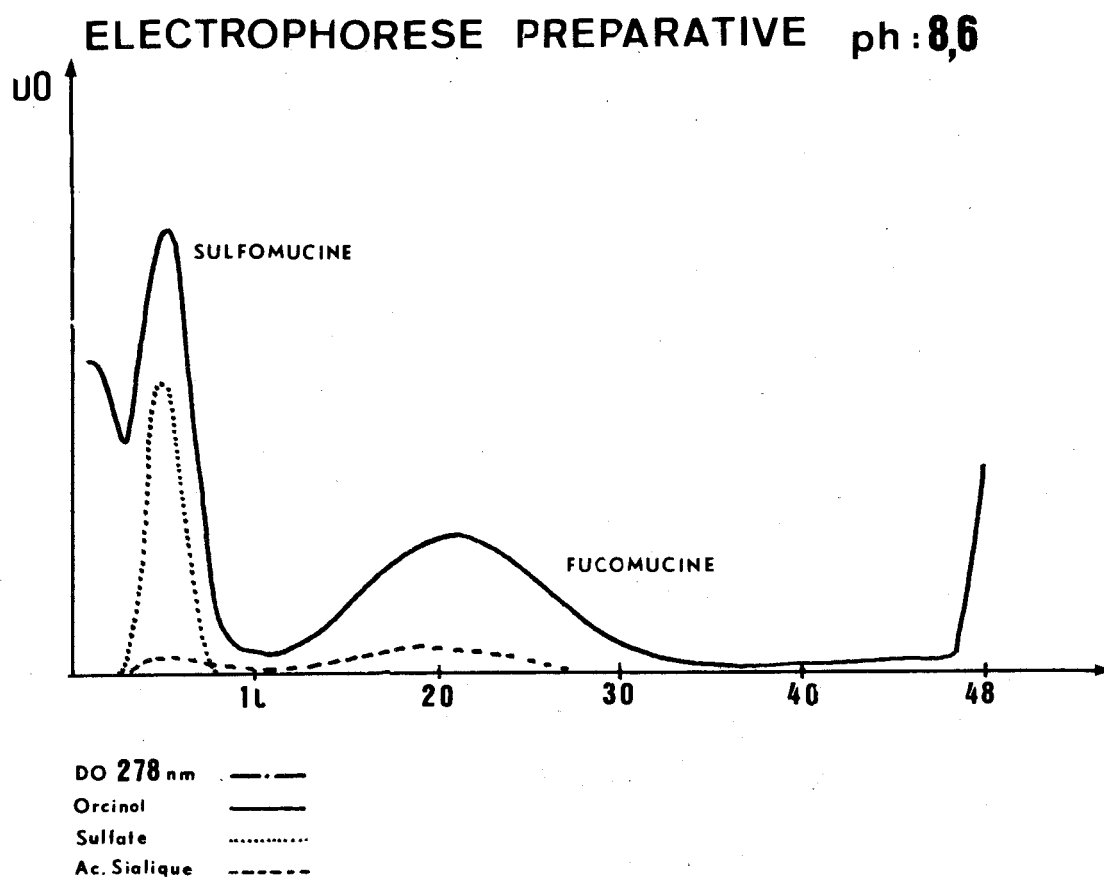
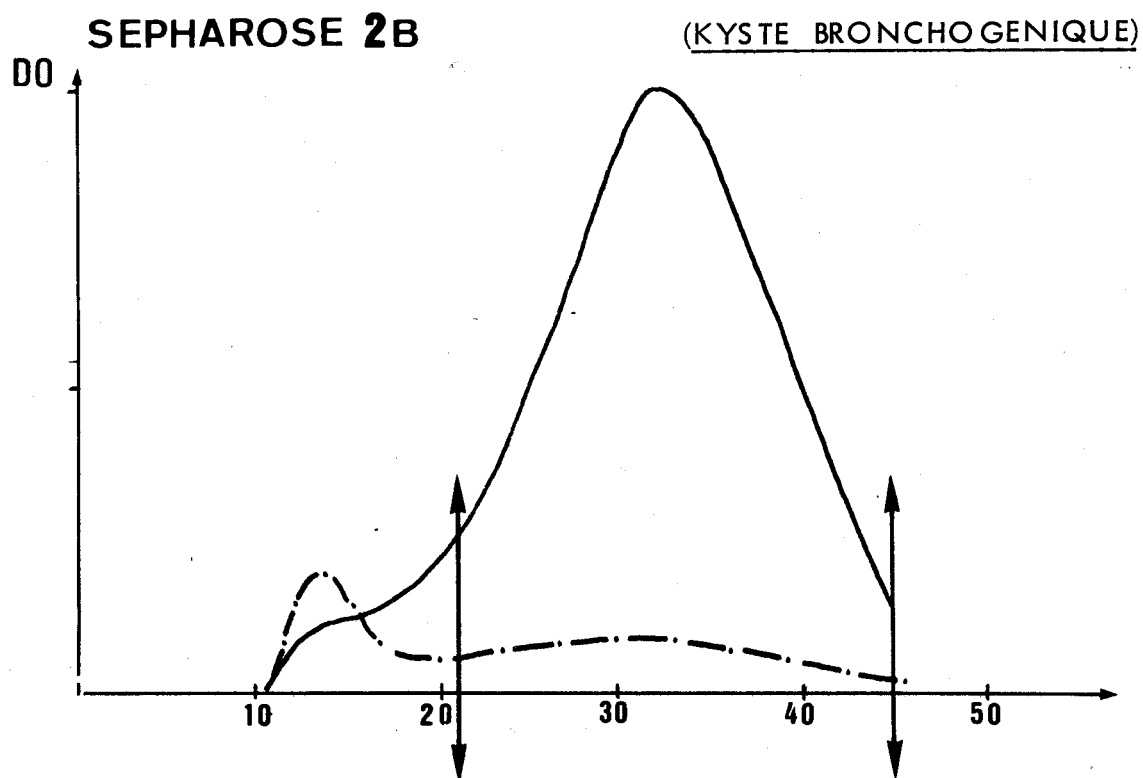


Figure 5



Tableau III

Composition en acides aminés

de mucines préparées par couplage de l'électrophorèse préparative

et de la chromatographie sur colonne de Sepharose 2B

(Résultats exprimés en résidus d'acides aminés pour 100 résidus)

	<u>Bronchite chronique</u>		<u>Mucoviscidose</u>
	F ₁ Sulfo- sialomucine	(STE...) F ₂ Fucomucine	F ₂ Sialomucine
ASP	6,76	6,09	5,67
THR	17,64	16,87	19,44
SER	17,81	12,64	13,62
GLU	7,68	7,32	7,04
PRO	8,39	9,64	8,78
GLY	9,98	7,54	8,64
ALA	8,82	8,21	9,40
CYS	traces	2,25	0,73
VAL	4,17	5,35	4,74
MET	traces	0,71	-
ILEU	2,39	3,05	2,65
LEU	4,50	6,74	5,97
TYR	1,54	2,10	1,60
PHE	1,33	2,55	2,55
LYS	3,19	3,21	3,57
HIS	2,58	1,95	2,30
ARG	3,22	3,75	3,27
Acides aminés (*)	15,67	25,62	17,58

(*) Résultats exprimés en pourcentage du poids sec.



sec de la préparation. La somme SER + THR représente 29 à 35 résidus pour 100 résidus d'acides-amino. On retrouve en outre de faible quantité de cystéine.

2) Fractionnement du mucus réduit par précipitation en milieu acide et chromatographie d'exclusion sur gel

Cette possibilité de fractionnement du mucus bronchique en milieu acide a été appliquée dès 1958 et 1959 par BUKANTZ et BROGAN. BUKANTZ (50) préconise l'hydrolyse chlorhydrique ménagée à pH 2,3. BROGAN (51) utilise la digestion par la pepsine à pH 2,3 sur une poudre acétonique d'expectorations. Les deux auteurs démontrent la présence de substances à activité de groupe sanguin dans la fraction soluble à pH 2,3.

Le précipité à pH 2,3 désigné sous le nom de "mucoprotéine" par BROGAN (51) est soluble dans l'eau et apparaît homogène en électrophorèse. BROGAN (51) donne la composition chimique de ce précipité pH 2,3 : 26,3 p.100 de sucres réducteurs totaux, 14,3 p.100 d'osamines, 8,7 p.100 d'azote total et 0,75 p.100 de phosphore. La présence de cet élément l'amène à envisager la possibilité d'une contamination par des acides nucléiques. Parmi les oses réducteurs, BROGAN identifie le galactose, le fucose et le mannose. La présence de mannose est un élément qui évoque également la possibilité d'une contamination des mucines par des glycoprotéines d'origine sérique. Le mannose est en effet toujours absent de la copule polysaccharidique des mucines purifiées.

Nous avons repris ce fractionnement par précipitation au point isoélectrique et nous l'avons appliqué à l'ensemble du mucus

réduit pour obtenir, à la différence de BROGAN, les mucines dans leur état natif en dehors de toute protéolyse initiale.

a) Précipitation à pH 2,3

Avec de l'acide chlorhydrique normal, on abaisse à la valeur de 2,3 le pH d'une solution de mucus réduit à 0,6 p.100 dans l'eau distillée. Le précipité se forme dès l'addition de l'acide chlorhydrique et passage à pH 2,3. Par centrifugation pendant 10 minutes à 3.000 tours/minute, le précipité est séparé du surnageant. Après neutralisation, les fractions sont dialysées et lyophilisées.

Ce fractionnement en milieu acide, étudié par ROUSSEL (42) nous permet d'obtenir deux fractions, l'une précipitée à pH 2,3, l'autre soluble dans ces conditions :

Le précipité pH 2,3 qui correspond à 30 p.100 de l'adialysable du mucus fibrillaire est étudié en électrophorèse en agarose à pH 8,2. Après une migration de une heure sous une différence de potentiel de 20 volts aux extrémités de la lame, on peut reconnaître trois fractions :

- La première, de migration anodique très rapide, colorée par le Bleu de Toluidine correspond aux acides nucléiques.

- La seconde, colorée par l'Amidoschwarz, possède une mobilité électrophorétique analogue à celle de la sérumalbumine. Son identification est d'ailleurs complétée par immunoélectrophorèse où l'on obtient un arc de précipitation en présence d'un immunosérum anti-protéines sériques humaines.

- Une fraction de mobilité $\alpha_2\beta$ -globulinique est colorée par l'Amidoschwarz et par le PAS. Elle est également révélée par le

Bleu de Toluidine. Toutefois, cette préparation apparaît hétérogène en immunoélectrophorèse où il est possible de caractériser la présence d'IgA et de transferrine bronchique sous la forme de deux arcs de précipitation de mobilité $\alpha_2\beta$ -globulinique.

La précipitation en milieu acide des mucines acides riches en acide sialique ou en groupement sulfate, ne permet pas d'éviter une contamination des mucines par les IgA et la transferrine qui sont entraînées par un phénomène de coprécipitation.

Le surageant pH 2,3 qui représente dans l'observation étudiée 28 p.100 de l'adialysable du mucus natif, possède une importante activité de groupe sanguin. Les techniques électrophorétiques montrent la présence dans cette fraction des "protéines de sécrétion". La contamination existe là encore comme dans le cas du précipité pH 2,3. Il semble bien que ces protéines associées aux mucines demeurent solubles ou précipitent en fonction de leur affinité pour les mucines, mais non en fonction de leur comportement propre en milieu acide.

Les mucines présentes dans le surageant pH 2,3 sont faiblement colorées par l'Amidoschwarz et sont intensément révélées par le PAS.

L'absence de coloration par le Bleu de Toluidine confirme la répartition des mucines dans les deux fractions séparées à pH 2,3 :

- Mucines riches en fucose : solubles à pH 2,3
- Mucines acides (colorées par le Bleu de Toluidine) : précipitées à pH 2,3.

Le fractionnement à pH 2,3 nous permet donc de séparer les mucines en deux groupes : mucines riches en fucose et mucines acides.

La contamination par les protéines demande une étape supplémentaire pour la préparation des deux catégories de mucines.

b) Purification de la fraction soluble à pH 2,3

Cette fraction correspond à l'ensemble des fucomucines souillées de protéines comme nous l'avons vu dans l'étude immuno-électrophorétique.

Le surnageant pH 2,3 est déposé sur une colonne de Biogel P 200 équilibrée en tampon de pH 8,6 (urée 4 M, NaCl 0,5 M, Tris 0,076 M, Acide citrique 0,005 M, EDTA 0,01 M). La lecture au spectrophotomètre à 278 nm et le dosage des oses à l'orcinol nous permettent d'obtenir le diagramme rapporté dans la figure 6 .

Cette chromatographie sépare une fraction exclue de la colonne que l'on met en évidence essentiellement sur la courbe obtenue par le dosage des oses à l'orcinol. Les composants mineurs sont retardés sur colonne de Biogel et sont identifiés par électrophorèse et immunoélectrophorèse. Étudié en électrophorèse à pH 8,2, le composant exclu de la colonne apparaît homogène ; il est riche en glucides combinés comme le montre la révélation intense par le réactif de Schiff après oxydation periodique. Cette fraction correspond aux mucines bronchiques.

Nous rapportons dans le tableau IV les compositions en acides aminés de mucines bronchiques individuelles d'activité A et H purifiées par ce protocole de fractionnement.

On peut noter là encore de grandes variations dans la teneur en acides aminés de ces préparations : 16 à 27 p.100 du poids sec.

Tableau IV

Composition en amino-acides de mucines faiblement acides, solubles
à pH 2,3 et chromatographiées sur Biogel P 200

(Résultats exprimés en résidus d'acides aminés pour 100 résidus)

	Activité de groupe sanguin						
	A						H
	1	2	3	4	5	6	
ASP	4,4	6,0	7,0	7,6	6,3	6,5	6,6
THR	23,8	19,3	15,8	16,2	15,6	16,9	16,7
SER	15,6	13,3	12,9	12,0	12,2	12,4	12,2
GLU	6,5	7,8	8,0	10,0	7,8	8,4	8,0
PRO	10,7	10,9	9,3	10,7	8,2	9,4	9,9
GLY	10,7	11,5	13,8	8,1	8,5	7,1	11,4
ALA	9,0	8,7	8,5	9,0	8,2	7,4	9,4
CYS	-	-	-	-	1,5	2,5	-
VAL	3,6	4,4	3,9	6,0	5,1	5,5	4,5
ILE	2,0	1,6	1,5	2,7	2,5	2,9	2,6
LEU	5,0	6,1	6,0	8,0	6,4	5,9	6,7
TYR	-	0,9	1,1	-	4,1	2,0	-
PHE	2,2	2,4	2,5	-	3,9	2,6	3,3
LYS	2,8	2,5	3,3	4,3	3,5	3,7	3,7
HIS	1,2	-	-	2,0	-	-	-
ARG	2,5	2,8	2,7	3,4	3,7	3,7	3,0
Total A.A. *	11,6	12,9	13,9	20,7	22,5	26,4	19,2

(*) Résultats exprimés en pourcentage du poids sec.



Pour préciser la nature des glycoprotéines épithéliales ainsi isolées, la préparation obtenue après chromatographie sur colonne de Biogel P 200 est étudiée en ultracentrifugation (figure 6).

Trois composants sont caractérisés :

- 24 p. 100 d'une fraction de coefficient de sédimentation apparent 14,5 S.
- 67 p. 100 d'une fraction de coefficient de sédimentation apparent 9,2 S.
- et 9 p. 100 d'une fraction de coefficient de sédimentation apparent 4,3 S.

Cette hétérogénéité et l'importance d'un composant de haut poids moléculaire (14,5 S) nous ont amené à adopter une filtration sur colonne de Sepharose 2B. Le fractionnement obtenu objective parfaitement la répartition en trois groupes de constituants dont l'importance relative est superposable à l'analyse fournie par l'ultracentrifugation (figure 6).

Nous rapportons dans le tableau V les compositions en acides aminés obtenues dans l'étude du composant de haut poids moléculaire identifié à la "mucoprotéine" déjà étudiée plus haut et de la mucine ainsi purifiée. Cette mucoprotéine riche en acide aspartique, en acide glutamique et en cystine peut expliquer la variabilité de composition en acides aminés observée dans le tableau IV.

Tableau V

Composition en acides aminés d'une mucine soluble à pH 2,3 et
séparée de la "mucoprotéine" par chromatographie
sur colonne de Sepharose 2B

(Résultats exprimés en résidus d'acides aminés pour 100 résidus)

	Mucoprotéine	Mucine soluble à pH 2,3
ASP	7,6	5,9
THR	12,0	18,4
SER	11,0	13,3
GLU	9,5	7,6
PRO	7,0	11,0
GLY	5,6	7,5
ALA	8,4	8,4
CYS	1,5	1,8
VAL	5,7	4,8
ILEU	3,6	2,7
LEU	8,0	5,9
TYR	1,9	1,6
PHE	3,2	2,3
LYS	4,3	3,3
HIS	1,8	1,8
ARG	3,8	3,5
Total A.A. *	30,3 %	19,9 %

(*) Résultats exprimés en pourcentage du poids sec.

L'introduction d'une étape de chromatographie de gel-filtration adaptée à la séparation de ces composants de haut poids moléculaire s'avère donc indispensable à la purification des mucines bronchiques.

c) Purification des mucines précipitées à pH 2,3

Le précipité formé à pH 2,3 est soumis à une seconde précipitation en présence d'un ammonium quaternaire, le bromure de cétyl-triméthylammonium ou Cetavlon. Cette purification par forma-

tion d'un complexe mucine acide - Cetavlon avait été utilisée par TSUISHI, HASHIMOTO et PIGMAN (52) pour la préparation des mucines sous-maxillaires. Cette étape de précipitation par le Cetavlon a pour but d'éliminer les protéines contaminantes : Ig A- transferrine.

1°) Précipitation par le Cetavlon

Le précipité pH 2,3 est solubilisé dans un tampon phosphate de sodium 0,01 M, pH 8,0 à la concentration de 0,6 p. 100 (v/v). On ajoute le Cetavlon en solution à 10 p. 100 dans l'eau distillée, à raison de 1 millilitre pour 20 millilitres de préparation. Cette addition est faite goutte à goutte et sous agitation continue. Le précipité formé après une heure de contact à +4°C est séparé du surnageant par centrifugation. On le redissout dans le chlorure de sodium 2,5 M et le sel d'ammonium est éliminé par addition de terre à foulon (SCOTT)(53). La solution est dialysée trois à quatre jours contre eau distillée, puis lyophilisée.

Les composants insolubles à pH 2,3 et purifiés par précipitation par le Cetavlon, correspondent à l'ensemble des mucines acides. Une étude en ultracentrifugation nous montre la disparition des contaminants de faible taille moléculaire :

Première préparation :	11,4 S	46 p. 100
	9,1 S	27,4 p. 100
	8,2 S	23,4 p. 100
	6,7 S	3,2 p. 100
Deuxième préparation :	11,6 S	19 p. 100
	7,0 S	77 p. 100

La préparation des glycoprotéines acides précipitées par le Cetavlon, bien qu'homogène en électrophorèse, correspond donc en réalité à un groupe de molécules de tailles moléculaires différentes. Tous les procédés de fractionnement (électrophorèse préparative à différents pH, chromatographie de gel-filtration sur Sephadex G-200 ou sur Biogel P 200-urée 4M) s'avèrent impuissants à éliminer le composant de haute taille moléculaire.

Seule la chromatographie sur Sepharose 2B ou 4B nous permet d'aboutir à la purification des mucines carboxyliques et sulfatées du mucus fibrillaire en les séparant d'un groupe de composants de haute taille moléculaire.

2°) Etude des mucines acides isolées

La composition en acides aminés des mucines acides purifiées par chromatographie sur colonne de Sepharose 2B est rapportée dans le tableau VI. Le composant exclu du gel de Sephadex a une composition analogue à celle de la "mucoprotéine" soluble à pH 2,3.

On note dans cette étape de purification la disparition des résidus de cystine, la baisse notable des pourcentages de résidus d'acide aspartique et d'acide glutamique. Le pourcentage des résidus SER + THR est notablement augmenté.

Nous avons pu démontrer à partir de cette préparation de mucines acides l'existence de deux groupes distincts après hydrolyse par la neuraminidase (neuraminidase isolée de Diplococcus pneumoniae) (DUCHATELLE)(54), (RANDOUX)(55).

Après action de la neuraminidase, l'électrophorèse préparative en film liquide sépare deux groupes de glycoprotéines : les sulfo-

Tableau VI

Composition en acides aminés des divers composants séparés de la
fraction des glycoprotéines précipitées à pH 2,3
et purifiées par le Cetavlon

(Résultats exprimés en résidus d'acides aminés pour 100 résidus)

	Mucoprotéine	Mucines acides carboxyliques et sulfatées	Après neuraminidase	
			Sulfomucine	Sialomucine
ASP	8,09	5,6	6,2	3,1
THR	13,0	22,4	19,5	30,0
SER	11,6	17,4	14,4	19,6
GLU	10,1	5,8	7,8	4,2
PRO	6,8	9,2	8,5	13,2
GLY	8,0	8,0	9,8	6,7
ALA	8,1	9,0	9,4	9,1
CYS	2,0	-	-	-
VAL	5,6	4,6	5,0	4,0
MET	-	-	-	-
ILEU	3,2	2,3	2,2	2,2
LEU	7,1	4,4	5,4	2,7
TYR	2,7	1,1	1,0	
PHE	3,5	1,7	2,0	
LYS	4,0	2,8	2,7	1,9
HIS	2,0	2,0	2,4	1,1
ARG	4,1	3,1	3,5	2,2
Total A.A. *	20,73 %	15,50 %	9,5 %	15,8 %

(*) Résultats exprimés en pourcentage du poids sec.

mucines qui conservent leur caractère polyanionique et les sialomucines qui ont, après action de la neuraminidase, un point isoélectrique nettement supérieur. La composition en acides aminés de ces deux sous-fractions (tableau VI) laisse apparaître une différence portant sur le rapport thréonine/sérine plus élevé dans les sialomucines que dans les sulfomucines. Ces mucines sulfatées présentent également un pourcentage supérieur de résidus d'acides aminés dicarboxyliques

et surtout de glycocolle dont l'importance peut être rapprochée de la valeur plus faible du rapport thréonine/sérine de cette classe de mucines bronchiques.

3) Couplage d'une chromatographie d'échange ionique (ECTEOLA-cellulose) et d'une chromatographie d'exclusion sur colonne de Sepharose 2B ou 4B

La difficulté d'obtenir par électrophorèse préparative ou par précipitation au point isoélectrique, une séparation des mucines en fonction de leur caractère acide nous a amené depuis trois ans à rechercher un protocole de fractionnement fondé sur l'utilisation d'une chromatographie sur colonne d'ECTEOLA-cellulose.

Deux étapes sont nécessaires :

La première étape consiste en une chromatographie d'échange ionique sur colonne d'Ecteola-cellulose : elle nous permet selon un gradient continu ou discontinu de séparer les mucines en fonction de la composition de leur copule polysaccharidique.

La deuxième étape de gel-filtration correspond à la purification ultime des mucines obtenues sur échangeur d'ions. Elle permet d'éliminer les mucoprotéines de haute taille moléculaire et les protéines du mucus bronchique.

En deux temps, il est donc possible d'obtenir des préparations hautement purifiées. Toutefois, plusieurs étapes de gel-filtration sont parfois nécessaires en fonction du rapport mucoprotéines/mucines/protéines du mucus étudié.

a) Protocole expérimental

500 mg d'adialysable réduit du mucus fibrillaire dissous dans une solution de NaCl 0,1 M, sont déposés sur une colonne d'Ecteola-cellulose (40 x 4,5 cm). Après passage de la solution d'équilibre de la colonne (NaCl 0,1 M), un gradient discontinu est réalisé par passage successif des solutions suivantes :

NaCl 0,1 M HCl 0,01 N

NaCl 0,3 M HCl 0,01 N

NaCl 0,5 M HCl 0,01 N

NaCl 0,7 M HCl 0,01 N

NaCl 1 M HCl 0,01 N

L'élution est suivie par dosage des oses combinés à l'orcinol sulfurique sur auto-analyseur Technicon. La lecture à 260 et 278 nm nous renseigne sur la teneur en protéines ou en acides nucléiques des différents éluats.

Nous utilisons le plus fréquemment ce système d'élution. Toutefois, il est possible d'appliquer un système d'élution selon un gradient linéaire allant de 0,1 M à 0,7 M NaCl HCl 0,01 N. Le choix est déterminé par la qualité et la nature des mucines présentes dans les sécrétions étudiées.

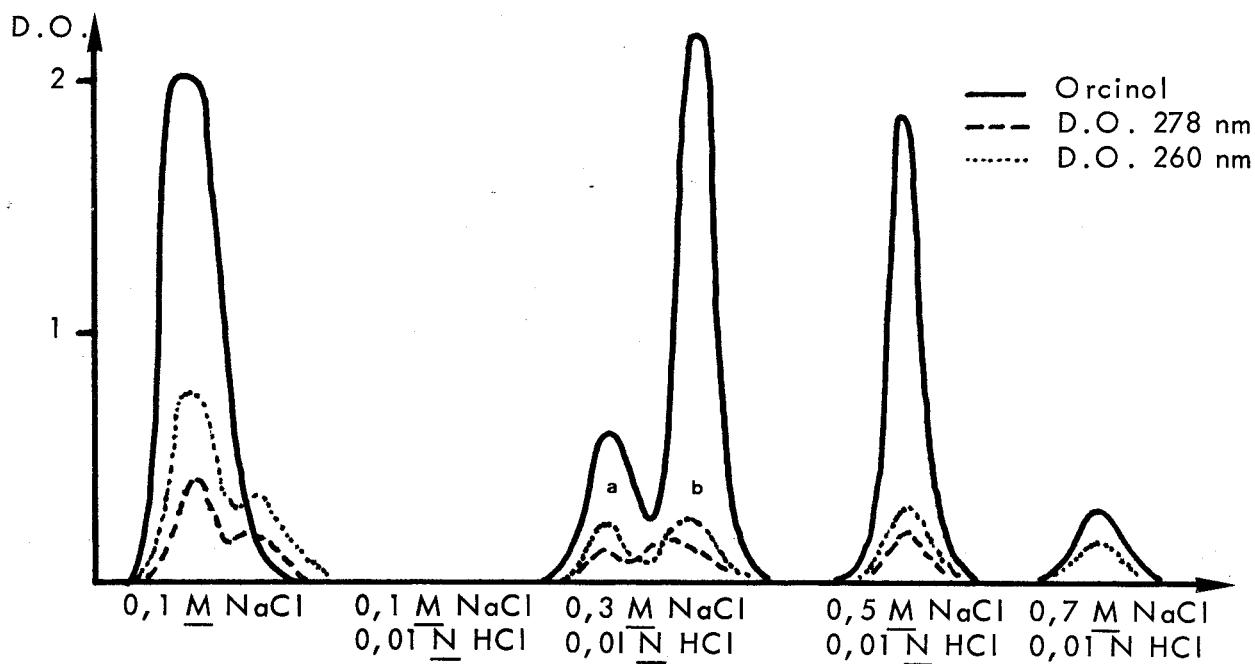
b) Résultats obtenus

La figure 7 illustre les résultats obtenus en gradient continu ou discontinu dans le cas de sécrétions de bronchite chronique ou de mucoviscidose.

Nous avons, dans la plupart des cas, retenu le gradient discontinu ; toutefois, ce modèle de gradient discontinu dans son principe même apporte une définition assez artificielle des mucines acides.

CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS
SUR COLONNE D'ECTEOLA-CELLULOSE

Gradient discontinu : Mucus réduit de bronchite (Cha...)



Gradient continu : Mucus réduit de mucoviscidose (Eti...)

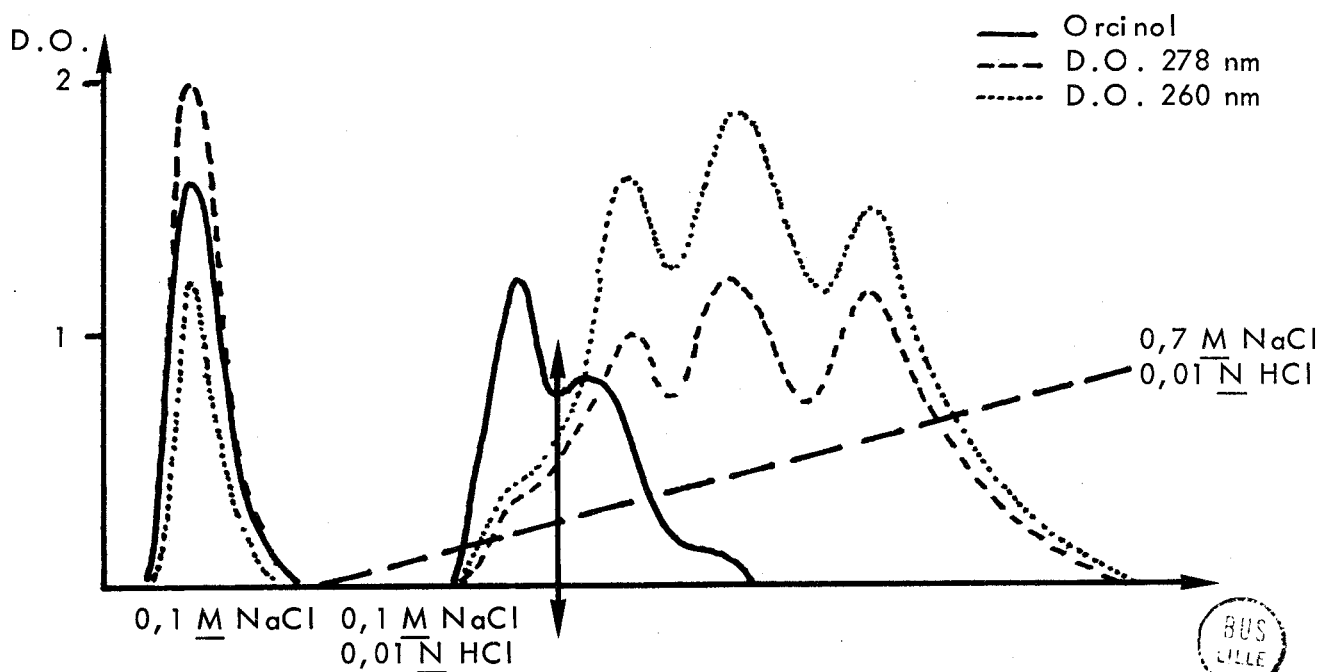


Figure 7

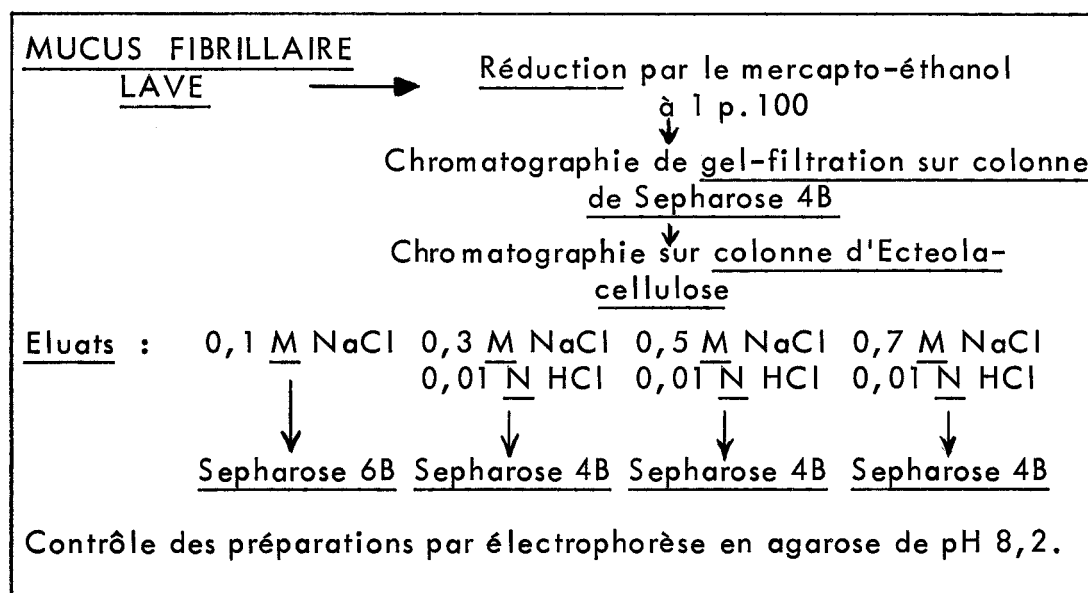


Bien au contraire, les sécrétions bronchiques de mucoviscidose se prêtent généralement au gradient continu et nous permettent de séparer deux à trois populations de sulfo-sialomucines.

Nous pouvons résumer dans le tableau VII le protocole de fractionnement actuellement retenu pour la purification des diverses classes de mucines bronchiques. Nous rapportons dans la figure 8 les résultats de l'étude électrophorétique de mucines riches en fucose ayant diverses activités de groupes sanguins.

Tableau VII

Etapas de purification des diverses classes de mucines
extraites du mucus fibrillaire de l'expectoration



c) Compositions en acides aminés de mucines purifiées
par chromatographie sur Ecteola-cellulose et gel-
filtration sur Sepharose 4B ou 6B

Trois hypersécrétions bronchiques obtenues au cours de

bronchites chroniques et une expectoration de mucoviscidose de l'Enfant ont fait l'objet de ce protocole de fractionnement. Nous rapportons dans le tableau VIII la composition en acides aminés des mucines de bronchite chronique d'un malade de groupe sanguin O, dans les tableaux IX et X figurent les mucines de bronchite chronique de deux malades de groupes sanguin A, enfin le tableau XI concerne les mucines isolées dans l'expectoration d'un enfant atteint de mucoviscidose.

L'examen de ces résultats démontre immédiatement la teneur plus faible de ces préparations en acides aminés. Quelle que soit la sécrétion étudiée, les valeurs oscillent entre 8 et 12 p. 100 d'acides totaux. A l'inverse, le pourcentage des résidus de sérine + thréonine atteint maintenant 45 à 50 p. 100 des résidus dosés.

Le tableau comparatif des compositions en acides aminés de quatre mucines ayant des activités de groupes sanguins H, A et B (tableau XII) ne permet pas de rapprocher ces activités spécifiques des glycanes des faibles variations observées dans la composition en acides aminés de ces préparations.

Ces résultats démontrent l'importance d'une étape de fractionnement sur Ecteola-cellulose. Cet échangeur utilisé en présence de concentrations salines relativement élevées permet d'éliminer les faibles traces de peptides et de protéines retenues sur les mucines bronchiques, même après plusieurs temps de chromatographie de gel-filtration ou d'électrophorèse préparative.

L'importance que revêt l'introduction d'une étape de chromatographie sur colonne de cellulose à pouvoir d'échange ionique est illustrée dans le tableau XIII où nous comparons les compositions

Tableau VIII

Composition en acides aminés de mucines préparées
à partir d'un mucus de bronchite chronique
 (Sujet de groupe sanguin O) CHA ..

	0, 1 <u>M</u> NaCl	0, 3 <u>M</u> NaCl (a)	0, 3 <u>M</u> NaCl (b)	0, 5 <u>M</u> NaCl	0, 7 <u>M</u> NaCl
ASP (**)	2,23	2,85	1,96	2,59	2,89
THR	31,26 2,12	32,72 1,80	32,80 1,80	29,27 1,68	29,27 1,80
SER	14,76 (*)	18,20 (*)	18,20 (*)	17,39 (*)	16,26 (*)
GLU	4,00	2,85	2,91	3,26	3,84
PRO	10,72	11,78	11,43	10,66	11,19
GLY	6,36	6,51	6,73	8,00	6,96
ALA	10,30	9,59	9,88	10,36	9,91
CYS	-	-	-	-	-
VAL	4,00	3,94	3,78	4,16	4,28
ILE	2,12	1,90	2,18	2,06	2,45
LEU	4,85	1,95	3,58	4,34	4,60
TYR	-	-	-	-	-
PHE	1,18	1,09	1,13	1,25	-
LYS	2,36	1,91	1,58	1,88	2,15
HIS	2,64	2,55	1,92	2,49	2,84
ARG	3,24	2,12	1,93	2,35	3,42
Total A.A. (***)	8,97 %	11,05 %	11,64 %	10,62 %	5,82 %

(*) Rapport $\frac{\text{Thr}}{\text{Ser}}$

(**) Résultats exprimés en résidus pour 100 résidus

(***) Résultats exprimés en pourcentage du poids sec



Tableau IX

Composition en acides aminés de mucines préparées

à partir d'un mucus de bronchite chronique

(Sujet de groupe sanguin A) WAS. . .

	0,1 M NaCl	0,1 M NaCl HCl 0,01 N F ₂ A	0,3 M NaCl HCl 0,01 N F ₄ A
ASP *	2,99	3,04	3,48
THR	27,01	28,24	27,82
SER	16,22	16,40	16,92
GLU	4,57	4,35	5,70
PRO	9,58	11,35	12,15
GLY	7,39	6,95	6,43
ALA	9,81	9,53	8,65
CYS	-	-	-
VAL	4,10	4,35	4,13
ILE	2,16	2,38	1,77
LEU	4,91	3,94	3,33
TYR	1,06	traces	0,48
PHE	2,21	1,66	2,09
LYS	2,42	2,36	1,88
HIS	2,68	2,17	1,92
ARG	2,87	3,31	3,20
Total A.A.**	11,47 %	9,10 %	13,23 %

(*) Résultats exprimés en résidus pour 100 résidus.

(**) Résultats exprimés en pourcentage du poids sec.



Tableau X

Composition en acides aminés de mucines préparées
à partir de mucus de bronchite chronique
 (Sujet de groupe sanguin A) VER ...

	0,1 <u>M</u> NaCl	0,3 <u>M</u> NaCl	0,5 <u>M</u> NaCl
ASP *	4,77	2,32	3,53
THR	20,51	32,19	26,01
SER	14,64 ^{1,40}	20,28 ^{1,59}	17,55 ^{1,48}
GLU	5,74	3,58	4,18
PRO	11,52	12,49	11,27
GLY	8,77	6,04	8,14
ALA	9,14	8,76	9,35
CYS	-	-	-
VAL	4,93	3,57	4,66
MET	-	-	-
ILE	2,13	2,02	2,08
LEU	5,40	2,38	4,24
TYR	1,71	-	0,72
PHE	1,88	1,12	1,50
LYS	2,87	1,78	1,97
HIS	2,07	1,33	2,35
ARG	3,87	2,11	2,42
Total A.A. **	13,20	14,04	11,25

(*) Résultats exprimés en résidus pour 100 résidus.

(**) Résultats exprimés en pourcentage du poids sec.



Tableau XI

Composition en acides aminés de mucines isolées à partir des
sécrétions bronchiques d'une mucoviscidose de l'enfant (ETI...)

(Sujet de groupe sanguin A)

	0,1M NaCl	0,1M NaCl 0,01N HCl	0,25M NaCl 0,01N HCl	0,35M NaCl 0,01N HCl
ASP *	3,98	3,40	4,63	2,93
THR	24,51	26,37	26,30	30,23
SER	14,38	15,07	16,98	17,62
GLU	5,53	5,79	4,59	3,77
PRO	10,44	11,10	11,14	11,57
GLY	7,10	7,25	8,10	7,23
ALA	9,59	9,03	9,35	9,91
CYS				
VAL	4,50	3,77	3,95	3,78
ILE	2,90	2,59	2,04	2,09
LEU	5,30	4,49	4,28	3,83
TYR	1,01	2,44	-	-
PHE	2,40	-	1,29	1,18
LYS	3,20	2,49	1,91	1,94
HIS	2,37	2,70	2,66	2,13
ARG	2,78	3,49	2,77	1,79
% d'A.A. **	12,02 %	8,09 %	7,16 %	8,26 %

(*) Résultats exprimés en résidus pour 100 résidus.

(**) Résultats exprimés en pourcentage du poids sec.



Tableau XII

Composition en acides aminés des mucines riches en fucose possédant
une activité de groupe sanguin et purifiées par chromatographie
sur Ecteola-cellulose et gel de Sepharose 4B

	CHA... (H)	WAS... (A)	VER ... (A)	BI G... (B)
ASP **	2,23	2,99	4,8	2,92
THR	31,26 (*)	27,01 (*)	20,51 (*)	28,96 (*)
SER	14,76 46,02	16,22 43,23	14,64 35,15	14,05 43,01
GLU	4,00	4,57	5,74	4,59
PRO	10,72	9,58	11,52	11,33
GLY	6,36	7,39	8,77	6,72
ALA	10,30	9,81	9,14	10,06
VAL	4,00	4,10	4,93	4,60
ILE	2,12	2,16	2,13	2,52
LEU	4,85	4,91	5,40	5,29
TYR	-	1,06	1,71	-
PHE	1,18	2,21	1,88	1,66
LYS	2,36	2,42	2,87	2,03
HIS	2,64	2,68	2,07	2,47
ARG	3,24	2,87	3,87	2,76
Total A.A.***	8,97 %	11,47 %	13,20 %	13,77 %
$\frac{\text{THR}}{\text{SER}} =$	2	1,6	1,4	2,06

(*) THR + SER

(**) Résultats exprimés en résidus pour 100 résidus.

(***) Résultats exprimés en pourcentage du poids sec.



Tableau XIII

Etude comparative de mucines isolées chez le même malade
par deux protocoles de fractionnement différents

	Sepharose - Vap (ensemble des mucines carboxyliques et sulfatées)	Sepharose - Ecteola - Sepharose (fractionnement des sialo-sulfomucines)	
ASP *	5,67	3,02	3,14
THR	19,44	27,36	27,43
SER	13,62	16,52	15,15
GLU	7,04	4,92	4,92
PRO	8,78	12,15	10,94
GLY	8,64	7,12	7,36
ALA	9,40	9,89	10,16
CYS	0,73	-	-
VAL	4,74	3,88	4,23
MET	-	-	-
ILEU	2,65	2,34	2,51
LEU	5,97	4,04	4,95
TYR	1,60	traces	traces
PHE	2,55	1,44	1,17
LYS	3,57	2,56	2,44
HIS	2,30	1,92	2,49
ARG	3,27	2,82	3,10
Total A.A. **	17,58 %	10,1 %	10,7 %

(*) Résultats exprimés en résidus pour 100 résidus.

(**) Résultats exprimés en pourcentage du poids sec.

BUS
LILLE

en acides aminés de deux préparations de mucines de mucoviscidose obtenues chez le même enfant par fractionnement du mucus fibrillaire par couplage d'une électrophorèse préparative et d'une chromatographie sur colonne de Sepharose 2B ou par introduction d'une étape de fractionnement sur colonne d'Ecteola-cellulose.

D) CHOIX D'UNE METHODE DE PURIFICATION DES MUCINES BRONCHIQUES

L'étude comparative des différents protocoles de fractionnement nous conduit à retenir pour la purification des mucines bronchiques une chromatographie sur colonne d'Ecteola-cellulose des produits de réduction du mucus fibrillaire, suivie d'une purification des fractions séparées par chromatographie sur colonne de Sepharose 2B ou 4B. Ce choix est essentiellement guidé par la composition en acides aminés des préparations obtenues et surtout par la reproductibilité de composition que nous donne ce fractionnement appliqué à une même sécrétion.

L'électrophorèse préparative en film liquide, la précipitation à pH 2,3, la chromatographie de gel-filtration ou leurs diverses associations ne peuvent en aucun cas nous fournir des préparations homogènes dont la teneur en acides aminés soit inférieure à 13 p. 100 du poids sec de la préparation.

Il semble que les mucines contractent dans la sécrétion endobronchique comme dans la solution des produits de réduction des associations étroites avec les protéines et les peptides qu'aucune de ces techniques ne suffit à éliminer. Seul l'échange ionique et l'utilisation pour l'élution de solution acide de forte molarité s'avèrent

capables de supprimer ces interactions. La chromatographie sur gel de dextran permet alors d'éliminer les nucléotides et quelques peptides de faible taille qui peuvent être élués de l'échangeur dans les mêmes conditions.

CHAPITRE III

CRITERES DE PURETE DES MUCINES ISOLEES

Au cours de l'étude comparative des méthodes de fractionnement et de purification des mucines bronchiques, l'étude de la composition en acides aminés est apparue rapidement comme un guide précieux pour le choix des méthodes utilisées et l'appréciation de leur reproductibilité. Les caractéristiques remarquables de composition qu'offre le squelette peptidique des mucines bronchiques méritent ainsi d'être retenues pour la définition de ces glycoprotéines.

Les critères de pureté de nos préparations sont en outre appréciés par les méthodes habituelles d'étude des protéines et glycoprotéines : identification des acides aminés en position N-terminale, étude en ultracentrifugation des préparations isolées. La détermination du volume partiel spécifique et de la constante de diffusion nous a permis de déterminer la masse moléculaire d'une de nos préparations.

A) CARACTERISTIQUES REMARQUABLES DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES

Les progrès réalisés depuis 1968 dans les méthodes de purification des mucines bronchiques apparaissent très nettement à la lecture du tableau XIV.

La diminution progressive de la teneur en acides aminés des préparations obtenues s'accompagne d'un enrichissement progressif du squelette polypeptidique en sérine et en thréonine qui représentent 45 résidus pour 100 résidus dosés. La somme des résidus de sérine, de thréonine, de proline, de glycine et d'alanine représente 70 à 78 p.100 des acides aminés dosés. On peut encore remarquer l'absence totale de cystéine et le faible pourcentage d'acide aspartique dans les préparations purifiées.

Le nombre de résidus de proline représente environ la moitié du nombre de résidus de thréonine et les résidus de glycine interviennent pour un tiers environ des résidus de sérine.

Ces éléments de composition offrent donc tout un ensemble de caractéristiques remarquables du squelette polypeptidique des mucines bronchiques.

B) IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES EN POSITION N-TERMINALE

Les préparations de mucines obtenues par électrophorèse préparative, précipitation au point isoélectrique ou chromatographie de gel-filtration présentent toujours plusieurs résidus d'acides aminés

Tableau XIV

<u>COMPARAISON DE MUCINES BRONCHIQUES PURIFIEES</u>			
<u>METHODES</u>	- SEPHAROSE 4B - ELECTROPHORESE (1968)	pH 2,3 SEPHAROSE 2B (1970)	ECTEOLA SEPHAROSE 2B (1972)
Amino Acides Totaux	(12 préparations) <u>20 à 24 p. 100</u>	(9 préparations) <u>13 à 20 p. 100</u>	(18 préparations) <u>10 à 13 p. 100</u>
<u>RESIDUS/100 RESIDUS</u>			
ASP	7 à 9	4 à 7	3
THR	11 à 13	16 à 24	27 à 29
SER	10 à 11	12 à 15	16 à 18
PRO	7 à 9	10 à 13	11 à 13
GLY	8 à 10	7 à 10	7 à 8
ALA	7 à 8	9	9 à 10
CYS	2 à 3	0 à 1,8	0
<u>Basiques</u>	7	7	8
Acides Aminés N-terminaux	ARG - HIS - LYS - PHE... ARG		

en position N-terminale. Par la méthode de dansylation, nous caractérisons dans ces préparations, l'arginine, la lysine et la phénylalanine, parfois l'histidine. Nous constatons une grande variabilité des résultats d'une préparation à l'autre.

Les préparations obtenues par chromatographie sur colonne d'Ecteola-cellulose et gel-filtration sur Sepharose 2B ne possèdent qu'un résidu d'arginine en position N-terminale. Ces résultats sont constants pour toutes les mucines étudiées, quel que soit le caractère d'acidité des glycanes ou l'activité de groupe sanguin des mucines étudiées.

Ces résultats nous amènent à envisager l'existence d'un squelette unipeptidique dans la structure des diverses classes de mucines bronchiques.

C) POIDS MOLECULAIRE DES MUCINES PURIFIEES

Nous avons recherché par l'étude en ultracentrifugation de deux préparations de mucines purifiées, un critère de pureté de ces préparations et une détermination de leur masse moléculaire faisant appel à leur constante de sédimentation (S_{20W}°), à la mesure de leur coefficient de diffusion D à l'approche de l'équilibre de sédimentation et à l'étude du volume spécifique partiel par picnométrie, selon le procédé de KOENIG (56).

1) Préparations utilisées

Nous avons retenu pour cette étude deux préparations de

mucines purifiées homogènes en chromatographie de gel-filtration et ne possédant que l'arginine en position N-terminale.

Une fucomucine (CHA...) possédant une activité de groupe sanguin H, est isolée d'une hypersécrétion de bronchite chronique et renferme 18,7 p.100 de fucose et 4,7 p.100 d'acide N-acétyl-neuraminique.

Une sialomucine isolée d'une sécrétion de kyste bronchogénique renferme 21,1 p.100 d'acide N-acétyl-neuraminique et 6,2 p.100 de fucose.

Les travaux de PIGMAN (57) sur les mucines salivaires ayant montré l'influence de la concentration saline utilisée sur la valeur de la constante de sédimentation, nous avons comparé les résultats obtenus pour l'étude de la sialomucine dans deux systèmes solvants :

- Solution d'acétate de sodium 0,02 M de pH 7,0,
NaCl 1 M.
- et - Solution d'acétate de sodium 0,02 M de pH 7,0,
NaCl 0,1 M.

La solution de mucine est équilibrée par dialyse pendant 48 heures contre la même solution tampon retenue pour l'expérience. Pour éviter toute évaporation, cet équilibre de dialyse est réalisé en flacon bouché et à la température de +4°C.

2) Détermination du volume spécifique partiel

Les mesures de la masse volumique du solvant et de celle d'une solution de mucine de concentration connue dissoute dans le même solvant permettent de calculer le volume spécifique partiel $\bar{V}_2$ du soluté :

$$\bar{V}_2 = \frac{C_2 - (\rho_2 - \rho_1)}{\rho_1 C_2}$$

$\bar{V}_2$ = volume spécifique partiel en cm^3 par gramme

C_2 = concentration en g/cm^3 du composé en solution

ρ_1 = masse volumique du solvant en g/cm^3

ρ_2 = masse volumique de la solution en g/cm^3

Nous utilisons un picnomètre de 2 cm^3 dont le volume réel est déterminé à 20°C à l'aide d'eau distillée de masse volumique égale à $0,998 \text{ g}/\text{cm}^3$. Les mesures des masses volumiques du solvant et de la solution de fucomucine ($4,45 \text{ mg}/\text{ml}$) sont obtenues par pesées à la même température.

Nous obtenons dans ces conditions un volume spécifique partiel : $\bar{V} = 0,59 \text{ cm}^3/\text{g}$ pour la fucomucine.

3) Mesure du coefficient de diffusion

L'étude est réalisée sur Ultracentrifugeuse Beckman E (*).

Nous utilisons une solution de concentration connue ($4,45 \text{ mg}/\text{ml}$) dans une cellule munie d'une pièce centrale à frontière synthétique de type capillaire. Les mesures sont pratiquées à la vitesse de 15.220 tours/minute. Les différents clichés photographiques sont pris à des temps exprimés en temps réel après le début de la diffusion, allant de 37 à 101 minutes (figure 9).

Le coefficient de diffusion (D) est calculé à partir d'agrandissements photographiques des clichés schlieren.

(*) Nous remercions vivement Monsieur P. RUFFIN (Attaché de Recherches CNRS) qui a bien voulu réaliser cette étude de nos préparations.

$$D = \frac{1}{4 \cdot \pi \cdot 60} \times \frac{1}{(G)^2} \times \frac{A_t^2}{H \max} \times \frac{1}{t \text{ corrigé}}$$

D = est exprimé en $\text{cm}^2/\text{seconde}$

G = agrandissement global (grandissement du système optique de l'ultracentrifugeuse X amplification photographique).

A_t = surface du pic en cm^2 déterminée sur l'agrandissement photographique.

H max = hauteur maximum du pic sur l'agrandissement photographique.

t corrigé = temps compté à partir du début effectif du phénomène de diffusion.

La valeur de D est calculée pour les différents temps de diffusion et ramenée ensuite par extrapolation au temps $t = 0$. Cette valeur D_{20} déterminée pour la fucomucine est de $670 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{sec}$. à 20°C pour une concentration de 4,45 mg de mucine par ml de solution.

4) Détermination de la constante de sédimentation

La mesure du coefficient de sédimentation est réalisée à une vitesse de rotation de 59.780 tours/minute. Des clichés photographiques sont pris toutes les huit minutes. Trois concentrations différentes sont utilisées et permettent de déterminer les valeurs des coefficients de sédimentation apparents pour ces trois concentrations.

Le coefficient de sédimentation est obtenu par méthode graphique intégrale et s'exprime par la vitesse de la particule dans

le champ unité. La relation qui le définit :

$$S = \frac{dx}{dt} \times \frac{1}{\omega^2 x}$$

a pour forme intégrée :

$$S \omega^2 t = \text{Log}(x) + \text{Cste}$$

On obtient donc le coefficient de sédimentation en traçant la courbe du $\text{Log}(x)$ en fonction du temps. La pente de la courbe donne la valeur de $S \omega^2$.

Pour ramener aux conditions standards (eau et 20°C) et corriger les valeurs des coefficients de sédimentation apparents, nous appliquons la correction suivante :

$$S_{20W} = S_{\text{app}} \times \frac{\eta_t}{\eta_{20W}} \times \frac{1 - \bar{V} \rho_{20W}}{1 - \bar{V} \rho_t}$$

η_t = viscosité du tampon utilisé à 20°C (conditions expérimentales).

η_{20W} = viscosité de l'eau à 20°C (tables).

$\bar{V}$ = volume spécifique partiel de l'échantillon étudié.

ρ_{20W} = masse volumique de l'eau à 20°C.

ρ_t = masse volumique du tampon.

a) Constantes de sédimentation de la fucomucine et de la sialomucine

Les mesures sont pratiquées sur des solutions de fucomucine en tampon acétate de sodium 0,02 M de pH 7,0, NaCl M. Les coefficients de sédimentation apparents (S_{app}) pour les trois concentrations utilisées sont respectivement :

$$8,9 \text{ mg/ml} \quad S_{\text{app}} = 5,55$$

$$4,45 \text{ mg/ml} \quad S_{\text{app}} = 6,47$$

$$2,22 \text{ mg/ml} \quad S_{\text{app}} = 7,71$$

Dans les conditions standard , pour un volume spécifique partiel $\bar{V}$ de $0,59 \text{ cm}^3/\text{g}$ et en tenant compte de la viscosité du solvant, ces coefficients de sédimentation sont respectivement de 6,58, 7,67 et 9,14.

La valeur du coefficient de sédimentation à concentration nulle obtenue par extrapolation de la courbe $\frac{1}{S} = f(c)$ nous donne la valeur de la constante de sédimentation :

$$S_{20 W}^{\circ} = 10,8 \text{ S}$$

Une étude comparable réalisée sur la sialomucine purifiée nous donne une constante de sédimentation :

$$S_{20 W}^{\circ} = 11 \text{ S}$$

Dans ces deux études, la relation $\frac{1}{S} = f(c)$ est parfaitement linéaire.

b) Influence de la concentration saline du solvant sur la constante de sédimentation d'une sialomucine

L'étude comparative de la sialomucine réalisée dans une solution tamponnée de même pH (pH = 7,0) nous donne pour une concentration en NaCl dix fois plus faible que la précédente une constante de sédimentation $S_{20 W}^{\circ} = 11,6 \text{ S}$.

Il ne semble donc pas que la variation pourtant considérable de concentration saline ainsi réalisée, modifie d'une manière très importante la valeur de la constante de sédimentation obtenue.

5) Calcul de la masse moléculaire

La masse moléculaire est calculée à partir de l'équation de SVEDBERG :

$$M = \frac{S}{D} \times \frac{RT}{1 - \bar{V}_2 \rho_1}$$

S = constante de sédimentation

D = coefficient de diffusion

R = constante des gaz parfaits

T = température absolue

$\bar{V}_2$ = volume spécifique partiel du soluté

ρ_1 = masse volumique du solvant

Nous avons retenu pour ce calcul les valeurs de S et de D mesurées à 20°C, pour une concentration de 4,45 mg par ml.

Pour la préparation de fucomucine, la masse moléculaire est de 608.000 Daltons.

6) Discussion des résultats

GIBBONS, CREETH et DENBOROUGH (58) ont étudié sur des extraits phénoliques du contenu de kystes ovariens, le comportement de substance à activité de groupe sanguin en ultracentrifugation et en équilibre de sédimentation en gradient de densité.

CREETH, dès 1964 (59), montre que ces préparations possèdent un degré de polydispersion et que les substances de groupe sanguin présentent des variations importantes de leur constante de sédimentation en fonction de la concentration de la solution analysée et que cette variation est linéaire pour des concentrations ne dépassant pas 10 mg par ml.

sant pas 3 p.100 (poids, volume). Il attribue ce phénomène à l'importance des phénomènes d'interaction moléculaire.

En 1965, CREETH et KNIGHT (60) précisent en fonction de ces résultats que les substances de groupe sanguin possèdent une configuration symétrique et que ces glycoprotéines ne présentent pas de structure secondaire ou tertiaire, mais qu'elles possèderaient plutôt une structure "random-coil" non compatible avec la notion d'une configuration rigide anisométrique. BEYCHOK et KABAT (61) aboutissent aux mêmes conclusions par étude des substances de groupe en dispersion optique rotatoire.

La composition même des glycoprotéines, leur richesse en acide sialique peut également influencer leur comportement en ultracentrifugation. De plus, GIBBONS (62) suggère que les solutions de mucines, d'une manière générale, possèdent des qualités rhéologiques dues à leur organisation en réseau, les points de branchement du réseau tridimensionnel étant de nature protéique. Pour DUNSTONE et MORGAN (63), ces "liaisons" intermucines sont dues à la présence de protéines riches en ponts disulfure. Ces observations sont à rapprocher de nos résultats concernant la notion de réseau fibrillaire, de ponts d'union intermucines représentés par des protéines riches en cystine (IgA, transferrine, sérumalbumine) (HAVEZ et al.)(64)(65). Nous avons pu dans ce travail montrer l'affinité des mucines qui représentent des polyanions sur lesquels peuvent venir se fixer des peptides basiques ou des protéines de sécrétion (voir plus loin). GIBBONS (66) signale d'ailleurs que la polydispersion des composants obtenus par extraction phénolique, pourrait en partie être rapprochée de cette notion et pourrait donc être le reflet de la présence de protéines contaminantes.

CREETH en 1967 (67) démontre que le volume spécifique partiel des particules en solution est constant pour une préparation donnée. Une deuxième cause de dispersion pourrait être représentée par la variation importante du volume spécifique partiel en rapport avec la composition glucidique des glycanes et en particulier de leur richesse en fucose ou en acide sialique (GIBBONS)(68).

$\bar{V} = 0,678$: préparation riche en fucose

$\bar{V} = 0,587$: préparation plus riche en acide sialique

CREETH et PAIN en 1967 (69) envisagent que la microhétérogénéité des glycanes peut également représenter un des facteurs de polydispersion.

PIGMAN (70) a pu observer des différences très importantes dans les valeurs de masse moléculaire obtenues en fonction de la composition des mucines, selon que l'on utilise l'ultracentrifugation ou la dispersion optique rotatoire.

Il signale que les masses moléculaires sont toujours plus faibles lorsqu'elles sont déterminées à partir des constantes de sédimentation. Il a pu remarquer que les résultats devenaient tout à fait comparables, en travaillant en solution de concentration saline élevée. Ces conditions peuvent minimiser les interactions moléculaires.

Notre étude, bien que limitée, nous a permis d'enregistrer une valeur de 600.000 pour la masse moléculaire d'une préparation de fucomucine .

Dans les mêmes conditions expérimentales et en concentration saline élevée, nous n'avons pas noté de différence significative entre fuco et sialomucine. L'étude de la sédimentation de la sialomucine en 0,1 M NaCl et 1 M NaCl n'apporte pas non plus d'él-

ments permettant de saisir une différence de comportement en fonction de la force ionique du solvant.

Dans toutes les études présentées (sédimentation, diffusion), les préparations apparaissent homogènes et ces éléments s'ajoutent aux critères de pureté déjà présentés.

CHAPITRE IV

CLASSIFICATION DES MUCINES BRONCHIQUES

Toutes les méthodes de fractionnement et de purification des mucines bronchiques relèvent obligatoirement d'un temps de fractionnement fondé sur les différences de valeurs des points isoélectriques de ces molécules. Ces différences de point isoélectrique s'opposent à la grande analogie de composition en acides aminés que nous avons constatée. Elles nous conduisent à envisager que la structure particulière des glycanes peut expliquer ce gradient de caractère polyanionique que démontre la chromatographie sur colonne d'Ecteolacellulose.

Pour préciser la classification biochimique des mucines bronchiques et éliminer les modifications possibles que peuvent introduire les agressions enzymatiques d'origine bactérienne, nous nous sommes tout d'abord adressé à l'étude des sécrétions de kystes bronchogéniques. Ces formations tumorales sécrètent un mucus visco-élastique, à l'abri des contaminations bactériennes et se développent aux dépens d'un étage précis de l'arbre trachéo-bronchique.

L'étude des hypersécrétions chroniques visant à préciser l'hétérogénéité de structure des glycanes sécrétés a été entreprise

par un fractionnement des glycopeptides libérés par hydrolyse enzymatique (papaïne et pronase) du mucus fibrillaire de l'expectoration.

Une étude biochimique et histochimique des glycopeptides séparés nous a conduit à rechercher leur origine tissulaire et à préciser ainsi la localisation cellulaire de l'enzyme de transfert des groupes sulfate.

A) CLASSIFICATION BIOCHIMIQUE DES MUCINES DE KYSTES BRONCHO GENIQUES

Deux formations kystiques différentes ont pu être prélevées chirurgicalement et leurs sécrétions stériles soumises à un fractionnement visant à purifier les mucines.

1) Sécrétion de sulfomucines et de fucomucines

Le protocole de fractionnement illustré figure 5 consiste en un couplage d'une chromatographie sur colonne de Sepharose 2B et d'une électrophorèse préparative en film liquide. Le bilan des compositions glucidiques obtenues nous amène à proposer la terminologie de fucomucine et de sulfomucine pour ces deux préparations (tableau XV).

Tableau XV

Composition de deux mucines isolées d'un kyste bronchogénique
(Résultats exprimés en g p. 100 g de poids sec de la préparation)

	FUCOMUCINE	SULFOMUCINE
Galactose	13,7	20,4
Hexosamines	18,7	17,3
Acide sialique (en NANA)	1,1	1,2
Fucose	10,7	7,1
Sulfate	0	<u>7,2</u>

2) Sécrétion d'une sialomucine

Dans une seconde formation kystique, le produit de sécrétion est représenté par une seule catégorie de mucine, riche en acide sialique, dont la purification a été obtenue de manière satisfaisante par l'utilisation de l'Ecteola-cellulose et de la Sepharose 2B.

Tableau XVI

Composition glucidique d'une mucine de kyste bronchogénique

	SIALOMUCINE
Galactose	25
Hexosamines	25,9
Acide sialique (en NANA)	21,1
Fucose	6,2
Sulfate	3,3

(Résultats exprimés en g p. 100 g de poids sec)

3) Résultats

En fonction de ces résultats, nous pouvons concevoir une classification des mucines basée sur l'importance relative du fucose, de l'acide sialique et du sulfate.

En ce qui concerne les deux mucines de caractère acide, la présence d'un taux élevé d'acide sialique (21 p.100) ou de sulfate (7,2 p.100) conditionne leur mobilité électrophorétique ou leur élution tardive dans le gradient en NaCl sur l'échangeur d'anion.

Ces mucines ont fait l'objet d'une étude électrophorétique en agarose à pH 8,2. Leur affinité tinctoriale représente également un critère de classification (tableau XVII) (figure 10).

Tableau XVII

Caractérisation histochimique des diverses classes de mucines

	Amidoschwarz	PAS	Bleu de Toluidine
Fucomucine	+	++	-
Sialomucine	+	++++	++
Sulfomucine	-	+	++++

Un deuxième élément de distinction entre sialomucine et sulfomucine est représenté par l'étude de leur sensibilité à l'action de neuraminidases bactériennes.

La libération d'acide sialique par voie enzymatique va modifier à la fois la mobilité électrophorétique de la mucine et d'autre part son affinité tinctoriale pour le Bleu de Toluidine.

a) Action de la neuraminidase sur la sialomucine

La comparaison des diagrammes électrophorétiques (réalisés dans la même cuve d'électrophorèse) correspondant à la mucine avant et après traitement par la neuraminidase nous permet de constater (figure 10) :

1°) La disparition de l'affinité tinctoriale pour le Bleu de Toluidine.

2°) Le recul de la fraction qui migre immédiatement en avant du godet de dépôt et possède un comportement voisin de celui d'une fucomucine.

Ces deux critères sont le reflet de la perte du caractère acide de la molécule lié à la présence de l'acide sialique.

b) Action de la neuraminidase sur la sulfomucine

L'incubation de la sulfomucine avec la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae n'amène cette fois aucune modification dans le comportement électrophorétique et dans l'intensité de la coloration par le Bleu de Toluidine.

4) Conclusions

Pour les mucines isolées de kyste bronchogénique, la notion d'une classification en fonction de leur richesse en fucose, en acide sialique et en sulfate peut être retenue.

Il apparaît également que les mucines purifiées sont homogènes. La sialomucine recule en bloc après désialidation enzymatique. La sulfomucine n'est en rien modifiée par l'action de la neuraminidase.

Toutefois, la sialomucine possède 3 p. 100 de sulfate, ce qui nous laisse entrevoir la notion d'hybride, c'est-à-dire la possibi-

lité de mucines comportant à la fois la présence d'acide sialique et de sulfate.

Le caractère hybride peut s'attacher à la mucine dans sa totalité (toutes les chaînes glycaniques possèdent l'acide sialique et le sulfate) ou peut être le reflet dans la molécule de glycannes différents, les uns sialidés, les autres sulfatés.

C'est cette hétérogénéité des glycannes des mucines que nous avons particulièrement étudiée sur les sécrétions bronchiques pour tenter de préciser cette notion de sulfo-sialoglycoprotéine.

B) ETUDE DES GLYCOPEPTIDES DU MUCUS FIBRILLAIRE D'HYPERSÉCRÉTIONS BRONCHIQUES

Nous avons pu constater que les mucines bronchiques isolées des produits de réduction douce du mucus fibrillaire se répartissent en deux groupes majeurs. Le premier groupe correspond aux mucines faiblement acides riches en fucose qui possèdent une activité de substance de groupe sanguin. Le second groupe représente l'ensemble des mucines acides, colorées par le Bleu de Toluidine. La caractérisation essentielle de ces glycoprotéines est représentée par la nature de la composition de leur copule polysaccharidique.

Il est possible dans certaines sécrétions individuelles de retrouver une activité de groupe sanguin dans les mucines acides, activité généralement faible comparée à celles des mucines riches en fucose (ROUSSEL)⁽⁷¹⁾. Toutefois, cette activité reflète très certainement des rapports structuraux très étroits entre les glycoprotéines acides et les substances de groupe sanguin. L'élément caractéristique

de leur structure, déterminant sur le plan de leur activité fonctionnelle est représenté par des groupements sulfate ou par des résidus d'acide sialique. Le degré de sulfatation ou de sialidation conditionne leur affinité pour les colorants basiques, en particulier par le Bleu de Toluidine et leur révélation par le réactif de Schiff après oxydation periodique.

Les difficultés rencontrées pour fractionner et purifier les mucines acides en fonction de leur richesse en groupements acides nous ont conduit dans un premier temps à étudier l'hétérogénéité des glycanes des mucines bronchiques à travers la répartition et la composition chimique des glycopeptides obtenus par protéolyse du mucus fibrillaire.

1) Préparation des glycopeptides du mucus bronchique fibrillaire

Après lavage de l'expectoration par trois volumes d'eau distillée, les sécrétions sont centrifugées à 3.000 tours/minute pendant 10 minutes. Le mucus fibrillaire ainsi isolé est soumis à une protéolyse par la papaïne et par la pronase.

Le choix de ces deux enzymes protéolytiques est le résultat d'une étude de la sensibilité du mucus bronchique à différents agents de protéolyse. L'enregistrement de la chute de viscosité du mucus fibrillaire (GERNEZ-RIEUX et al.)(72) en fonction de l'action des enzymes nous a amené à retenir une protéolyse par la mercuripapaïne en milieu réducteur suivie de l'action de la pronase.

D'autres enzymes comme la trypsine, l' α -chymotrypsine, la collagénase amènent une chute très limitée de la viscosité. Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés par LIEBERMAN (73)(74). Bien que

très active, la pepsine n'a pas été retenue. Il nous semble indispensable en effet de ne pas recourir à une protéolyse prolongée (24 à 48 heures) en milieu acide qui pourrait entraîner une libération du fucose ou de l'acide sialique périphérique des glycanes.

L'hydrolyse papaïnique (mercuripapaïne : Worthington Biochemical Corporation) est réalisée en tampon phosphate de sodium 0,01 M de pH 6,5 en présence de British Anti-Lewisite (ou BAL) avec un rapport enzyme/substrat de 1/100. Ce rapport enzyme/substrat est établi en fonction du poids sec du mucus fibrillaire dialysé et lyophilisé. 1 ml de mucus frais correspond à 10 à 12 mg de poudre lyophilisée. Cette première étape de protéolyse par la papaïne est poursuivie pendant 48 heures à 37°C. L'hydrolyse pronasique (Pronase B Grade Calbiochem) qui lui fait suite est effectuée en tampon acétate de calcium 0,01 M de pH 7,3 avec un rapport enzyme/substrat de 1/40. L'hydrolyse est conduite à 37°C pendant 24 heures.

L'hydrolysate obtenu est ensuite dialysé contre eau distillée et lyophilisé.

a) Fractionnement de l'hydrolysate papaïne-pronase par le Rivanol à pH 1,5 - Chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A-25

Le fractionnement de l'hydrolysate de mucus fibrillaire est réalisé selon la méthode préconisée par WHITEHOUSE et BOSTRÖM (75) pour l'isolement des mucopolysaccharides sulfatés. Dans un premier temps, on abaisse le pH de l'hydrolysate, repris dans un tampon phosphate de sodium 0,01 M, pH 6,5 (concentration de 10 mg/ml) à la valeur de 1,5, à l'aide de HCl 1 N. Un faible précipité apparaît ; il est séparé par centrifugation (6.000 tours/minute pendant 10 minutes) et correspond essentiellement à des acides nucléiques dépolymé-

risés. On ajoute ensuite au surnageant pH 1,5, goutte à goutte, sous agitation continue, une solution de Rivanol (lactate de 6,9-diamino-2-éthoxy-acridine) à 10 p. 100 jusqu'à une concentration finale de 3 p. 100 en Rivanol. On laisse en contact pendant 2 heures à + 4°C. Après centrifugation, le précipité obtenu est repris dans l'eau distillée. Le complexe Rivanol - glycopeptides est ensuite dissocié par addition de chlorure de sodium à la concentration finale de 5 p. 100. Le Rivanol ainsi libéré du complexe formé est éliminé par précipitation des glycopeptides par 4 volumes d'éthanol absolu. Cette précipitation en milieu alcoolique est répétée 2 à 3 fois. Les glycopeptides sont finalement repris dans l'eau distillée et lyophilisés.

Les glycopeptides solubles dans le Rivanol à pH 1,5 sont également précipités par 4 volumes d'alcool absolu. Nous avons pu vérifier l'absence de glycopeptides dans les surnageants alcooliques de précipitation.

L'ensemble des glycopeptides solubles ou précipités par le Rivanol à pH 1,5 sont déposés sur une colonne de DEAE-Sephadex A-25 préparée selon la méthode de SCHMIDT (76). Les conditions de régénération de l'échangeur d'anion sont exposées dans l'Appendice Technique. L'élution est conduite selon un gradient discontinu de molarité croissante en NaCl. Les solutions de chlorure de sodium utilisées successivement sont les suivantes :

0,1 M NaCl

0,1 M NaCl HCl 0,01 N

0,3 M NaCl HCl 0,01 N

0,5 M NaCl HCl 0,01 N

0,7 M NaCl HCl 0,01 N

b) Electrophorèse préparative en film liquide

Les produits libérés du mucus fibrillaire par protéolyse papaïne-pronase peuvent également être soumis directement à une électrophorèse préparative en film liquide à haut voltage. Une différence de potentiel de 1.750 volts sous 160 mA nous permet d'aboutir à un fractionnement satisfaisant. La densité optique des 48 tubes correspondant au fractionnement est lue à 260 nm pour localiser les acides nucléiques. Les oses combinés sont dosés par la méthode à l'orcinol sulfurique. Le dosage du fucose, de l'acide sialique et du sulfate permet de localiser les différents groupes de glycopeptides.

2) Résultats

Nous avons appliqué ce protocole à l'étude du mucus fibrillaire de sécrétions bronchiques recueillies chez des malades présentant un état de bronchite chronique ou une mucoviscidose.

a) Fractionnement par le Rivanol et chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A-25

L'hydrolysat total étudié en électrophorèse n'est pas révélé par l'Amidoschwarz ; il correspond à un ensemble de glycopeptides qui sont colorés à la fois par le Réactif de Schiff après oxydation periodique et par le Bleu de Toluidine.

Le surnageant Rivanol correspond à des glycopeptides de mobilité anodique faible, mais possédant une grande affinité tinctoriale pour le réactif de Schiff après oxydation periodique. Ils ne sont que faiblement colorés par le Bleu de Toluidine (figure 11).

Au contraire, le précipité Rivanol est intensément révélé par le Bleu de Toluidine et faiblement coloré par le réactif de Schiff

après oxydation periodique.

Cette simple étude électrophorétique nous permet donc déjà de noter l'hétérogénéité des deux fractions obtenues par le Rivanol à pH 1,5.

Les glycopeptides précipités par le Rivanol à partir de 2 g d'hydrolysate représentent 25 p. 100 de l'ensemble. La chromatographie sur DEAE-Sephadex A-25 permet un sous-fractionnement. Trois fractions sont ainsi obtenues (figure 11). Elles sont éluées respectivement avec les solutions HCl 0,01 N de molarité NaCl 0,3, 0,5 et 0,7 M. Après précipitation par 4 volumes d'éthanol absolu, les trois fractions de glycopeptides sont lyophilisées et étudiées en électrophorèse en agarose à pH 8,2.

Ces trois fractions sont caractérisées par leur affinité tinctoriale très intense pour le Bleu de Toluidine et l'absence de coloration par le Réactif de Schiff après oxydation periodique. Ces glycopeptides de caractère très acide peuvent devenir métachromatiques, tout au moins pour la fraction 0,7 M NaCl qui donne une coloration rouge et non plus Bleu de Magenta avec le Bleu de Toluidine.

Les glycopeptides solubles dans le Rivanol représentent 75 p. 100 de l'ensemble de l'hydrolysate. Ces glycopeptides sont chromatographiés sur colonne de DEAE-Sephadex A-25. La fraction la plus importante (57,5 p. 100) est éluee en NaCl 0,1 M. Il s'agit de glycopeptides neutres colorés uniquement par le Réactif de Schiff après oxydation periodique. Ils possèdent une faible migration anodique immédiatement en avant du godet de dépôt. Les glycopeptides élués en 0,3 M NaCl ne représentent que 14,2 p. 100 de l'ensemble de l'hydrolysate. Ils correspondent essentiellement à des glycopeptides riches en acide sialique. Une fraction mineure (3,3 p. 100) est éluee plus tardivement en 0,5 M NaCl. Elle représente les glycopeptides

faiblement sulfatés qui ont échappé à la précipitation par le Rivanol.

Toutes les fractions obtenues par fractionnement au Rivanol suivi de chromatographie sur DEAE-Sephadex ont été soumises à une chromatographie de gel-filtration sur Sephadex G-100. Ce temps chromatographique nous permet d'éliminer toute contamination des préparations par des peptides de faible taille moléculaire. Il nous renseigne sur la taille moléculaire de ces glycopeptides qui présentent tous le même comportement et sont pratiquement exclus de la colonne.

b) Fractionnement de l'hydrolysate de mucus fibrillaire par électrophorèse préparative à haut voltage sur appareil Elphor-Vap

L'hydrolysate papaïne-pronase de mucus fibrillaire peut faire directement l'objet d'un fractionnement en électrophorèse préparative à haut voltage. La lecture à 260 nm et le dosage à l'orcinol permettent d'individualiser trois fractions dont la nature est précisée par le repérage tube par tube des groupements sulfate et par le dosage du fucose et de l'acide sialique.

- La lecture à 260 nm nous renseigne sur l'importance des acides nucléiques présents dans l'hydrolysate. Ils peuvent d'ailleurs être éliminés en grande partie par passage de l'hydrolysate à pH 1,5 et élimination du précipité obtenu.

- De migration anodique et de mobilité très rapide, le groupe des sulfo-fucosido-glycopeptides est intensément révélé par le Bleu de Toluidine après migration électrophorétique en agarose.

- Immédiatement en avant du point d'injection (38ème tube), un ensemble de glycopeptides moins acides, mais quantitativement le

plus important s'inscrit sur la courbe de dosage à l'orcinol. Il faut noter le parallélisme des courbes de dosage du fucose et celle des hexoses par l'orcinol sulfurique.

- Enfin, de migration intermédiaire aux deux fractions précédentes, les sialo-fucosido-glycopeptides apparaissent moins homogènes. Dans l'observation présentée, la courbe du dosage de l'acide sialique individualise au moins deux types de sialoglycopeptides dont le rapport fucose/acide sialique augmente de l'anode vers la cathode.

c) Etude critique des deux méthodes de fractionnement

Les deux méthodes de fractionnement utilisées sont parfaitement reproductibles. Elles représentent des techniques de choix pour la surveillance de l'équilibre de sécrétion des malades et en particulier ceux soumis à une thérapeutique (HAVEZ et al.)(77).

C'est finalement en fonction de cet équilibre de sécrétion que l'on choisira le protocole retenu. La prépondérance des glycopeptides riches en fucose nous oriente vers la précipitation Rivanol.

Il est cependant possible d'effectuer la chromatographie sur DEAE-Sephadex sans avoir recours à l'étape initiale du fractionnement Rivanol. C'est le cas en particulier pour la préparation des glycopeptides de mucines des sécrétions d'enfants présentant une mucoviscidose (HAVEZ)(78) (LAMBLIN)(79).

3) Composition glucidique des glycopeptides du mucus fibrillaire

Les différentes fractions obtenues après chromatographie sur DEAE-Sephadex A-25 des glycopeptides solubles et précipités par le Rivanol à pH 1,5 ont fait l'objet d'une étude de la composition cen-

tésimale en glucides combinés.

Nous avons rassemblé nos résultats dans le tableau XVIII, en y faisant également figurer la richesse des glycopeptides en groupes sulfate.

Tableau XVIII
Composition centésimale en oses
des glycopeptides solubles et précipités par le Rivanol à pH 1,5

	Glycopeptides solubles dans le Rivanol		Glycopeptides précipités par le Rivanol		
	F ₁	F ₂	F ₂	F ₃	F ₄
SO ₃ H	0	2,4	4,8	8	7,9
Acide sialique	4,0	5,5	3,2	2,2	1,8
Fucose	11,1	12,5	14,8	13,8	11,4
Galactose	29,6	31,0	27,7	27,2	27,2
Hexosamines	31,3	29,8	28,8	29,0	29,0
Total	76,0	82,3	79,3	80,2	77,3

L'identification des oses et plus particulièrement des hexoses a été réalisée par étude chromatographique sur papier. Les hexoses présents dans la copule polysaccharidique ne sont représentés que par le galactose. Il n'y a pas de mannose.

En dehors du galactose, la présence de fucose, de glucosamine, de galactosamine et d'acide N-acétyl-neuraminique a pu être démontrée.

L'absence d'acide glycuronique a été vérifiée à plusieurs reprises sur des hydrolysats de mucus fibrillaire différents obtenus au cours de diverses bronchopathies.

Les résultats de cette étude de la composition de la copule polysaccharidique des glycopeptides de mucine bronchique permettent plusieurs remarques :

a) Le rapport hexose/hexosamine est pratiquement constant, que l'on s'adresse aux glycopeptides solubles dans le Rivanol ou aux glycopeptides précipités. L'ensemble hexoses-hexosamines représente de 55 à 60 p. 100 de la copule glucidique.

b) Les critères de précipitation par le Rivanol, le comportement au cours de la chromatographie sur DEAE-Sephadex sont à rechercher dans la composition de l'extrémité non réductrice des chaînes glycaniques.

- La présence d'ester-sulfate nous semble conditionner à elle-seule la précipitation par le Rivanol.

- Le sous-fractionnement sur échangeur d'ion repose essentiellement sur le rapport acide sialique/fucose/sulfate. L'élution des glycopeptides précipités par le Rivanol (F_1 , F_2 , F_3) correspond à :

. un enrichissement en groupement sulfate (4,8 p. 100 pour la fraction F_2 ; 8 p. 100 pour la fraction F_3).

. un appauvrissement en acide sialique (3,2, 2,2 et 1,8 p. 100).

. une diminution du fucose (14,8, 13,8 et 11,4 p. 100).

L'élution de F_4 repose d'ailleurs beaucoup plus sur la diminution du fucose que sur l'apparition d'un caractère d'acidité plus marqué.

De la même manière, les glycopeptides solubles dans le Rivanol se répartissent en deux fractions : la fraction F_1 ne contient pas de sulfate et présente un rapport fucose/acide sialique de 2,8. La fraction F_2 s'enrichit en fucose et en acide sialique. Le rapport fucose/acide sialique est égal à 2,4. Elle contient également 1,7 p. 100 de sulfate.

c) Parmi les techniques actuellement utilisées pour démontrer l'existence de groupements sulfate dans la structure d'un glycopeptide, la spectrophotométrie en infra-rouge offre à la fois l'avantage de sa haute spécificité et de sa sensibilité. Cette méthode permet en outre l'analyse de quantités très faibles de produit. Nous l'avons retenue pour la recherche et l'identification des groupements sulfate sur les préparations de glycopeptides précipités par le Rivanol.

L'analyse est pratiquée sur un mélange de bromure de potassium (300 mg) et de 2 mg d'une préparation de glycopeptides précipités par le Rivanol. Ce mélange soigneusement réduit en poudre, soumis à une vibration mécanique prolongée est utilisé sous forme d'un disque obtenu sous une pression de 10^4 kg/cm^2 . L'appareil utilisé pour l'analyse est un spectrophotomètre PERKIN-ELMER, modèle 21.

L'analyse de ce spectre permet de caractériser un pic bien individualisé à 1.240 cm^{-1} qui traduit la vibration de la liaison $S = O$. Le second élément à retenir à l'examen du diagramme est une vibration des liaisons $C - O - S$ qui se traduit par l'apparition d'un pic à 820 cm^{-1} . Ces résultats confirment donc le caractère sulfaté des glycopeptides précipités par le Rivanol et nous permet d'avancer la notion d'une structure hybride de ces glycopeptides qui apparaissent être à la fois sialidés et sulfatés.

4) Conclusions

L'étude de la copule glucidique des glycopeptides obtenus par protéolyse du mucus fibrillaire nous permet donc d'affirmer la notion d'un caractère hybride des glycopeptides qui, pour les plus acides, sont à la fois carboxyliques et sulfatés. Nous pouvons également retenir que les sécrétions bronchiques sont représentées par des mucines dont la composition de l'extrémité non réductrice des glycanes varie en fonction de leur richesse en fucose et en acide sialique. Il apparaît également qu'à la différence des mucines purifiées à partir de kyste bronchogénique, la terminologie de fuco, sialo ou sulfomucine doit être nuancée en fonction du caractère sialidé de fuco-glycopeptides, ou de la fréquence de sulfate dans les glycopeptides les plus sialidés.

Ces différentes remarques nous amènent donc à considérer les kystes bronchogéniques comme ayant une possibilité de biosynthèse très orientée. Nous avons en effet obtenu à partir d'un kyste bronchogénique une seule mucine : sialomucine, et à partir d'une autre observation, une fucomucine et une sulfomucine non sialidée. Il apparaît ainsi qu'au niveau de ces dysenbryoplasies, les cellules possèdent une spécificité de biosynthèse liée à la présence ou à l'absence des transférases nécessaires au branchement de l'acide sialique ou du sulfate.

Nous avons ainsi orienté notre travail vers l'examen des possibilités métaboliques des glandes bronchiques par l'étude de l'incorporation in vitro de précurseurs radioactifs par des fragments de biopsie bronchique.

C) CLASSIFICATION DES MUCINES D'HYPERSECRETIONS BRONCHIQUES

L'hétérogénéité de caractère polyanionique des glycannes démontrée par l'étude des glycopeptides libérés par protéolyse enzymatique du mucus fibrillaire de l'expectoration apparaît dans les diverses préparations de mucines bronchiques isolées de sécrétions individuelles.

Ces résultats nous amènent à proposer une classification des mucines sécrétées dans la totalité de l'arbre trachéo-bronchique qui reflète d'ailleurs en partie la systématisation déjà rencontrée dans les sécrétions de kystes bronchogéniques.

1) Composition glucidique de mucines purifiées à partir d'expectorations individuelles

Les conditions d'hydrolyse, les méthodes utilisées dans la caractérisation et l'identification des oses, osamines et acide sialique sont décrites dans l'Appendice Technique.

L'hydrolyse chlorhydrique des préparations de mucines qui ont fait l'objet de ce travail ne libère que du galactose, de la glucosamine, de la galactosamine et de l'acide N-acétyl-neuraminique.

Nous rapportons dans les tableaux XIX à XXIII les compositions des divers types de mucines séparées par chromatographie sur colonne d'Ecteola-cellulose. Ces diverses préparations sont obtenues à partir de sécrétions de bronchites chroniques chez des sujets de groupes sanguins O, A et B. Nous y avons fait figurer également à titre comparatif un fractionnement analogue réalisé à partir d'une expectoration d'enfant atteint de mucoviscidose (tableau XXIII).

Tableau XIX

Composition glucidique de mucines de bronchite chronique

(CHA... groupe sanguin O)

Conditions d'élution	0,1 M NaCl	0,3 M NaCl $\overline{b}$	0,3 M NaCl $\overline{b}$	0,5 M NaCl	0,7 M NaCl
		0,01 N HCl	0,01 N HCl	0,01 N HCl	0,01 N HCl
Galactose	26,9	22,3	23,2	23,3	25,8
Hexosamines	26,5	24,0	23,2	25,5	23,6
Fucose	18,7	15,6	13,6	14,3	12,3
Ac.sialique	4,7	9,0	9,1	4,8	3,1
Sulfate	0,9	2,0	2,5	2,7	4,9
Total (*)	77,8 %	72,9 %	71,6 %	70,6 %	69,7 %
$\frac{\text{Galactose}}{\text{Hexosamines}}$	1,01	0,93	1,00	0,93	1,09
$\frac{\text{Glc NH}_2}{\text{Gal NH}_2}$	2,54	1,59	1,38	2,39	2,85

(*) Pourcentage des glucides combinés et du sulfate par rapport au poids sec de la préparation.



Tableau XX
Composition glucidique des mucines de bronchite chronique
(WAS... groupe sanguin A)

Conditions d'élution	0,1 <u>M</u> NaCl	0,15M NaCl 0,01 <u>N</u> HCl	0,35M NaCl 0,01 <u>N</u> HCl
Galactose	24,0	20,5	24,6
Hexosamines	30,8	28,1	32,7
Fucose	19,2	14,6	17,1
Acide sialique	1,7	2,2	5,3
Sulfate	0	0	1,4
Total (*)	75,7 %	65,4 %	81,1 %
<u>Galactose</u>	0,77	0,73	0,75
<u>Hexosamines</u>			
<u>Glc NH₂</u>	0,97	1,01	1,33
<u>Gal NH₂</u>			

Tableau XXI
Composition glucidique des mucines de bronchite chronique
(VER... groupe sanguin A)

Conditions d'élution	0,1 <u>M</u> NaCl	0,3M NaCl 0,01 <u>N</u> HCl	0,5M NaCl 0,01 <u>N</u> HCl
Galactose	22,2	20,3	22,4
Hexosamines	30,0	24,2	29,6
Fucose	17,8	12,6	11,9
Ac. sialique	5,3	14,7	8,6
Sulfate	1,2	N.D.	4,1
Total (*)	76,5 %	71,8 %	76,6 %
<u>Galactose</u>	0,74	0,83	0,76
<u>Hexosamines</u>			
<u>Glc NH₂</u>	1,16	0,76	1,77
<u>Gal NH₂</u>			

(*) Pourcentage des glucides combinés et du sulfate par rapport au poids sec de la préparation.



Tableau XXII
Composition glucidique des mucines de bronchite chronique
(BIG... groupe sanguin B)

Conditions d'élution	0,1M NaCl	0,3M NaCl 0,01N HCl	0,5M NaCl 0,01N HCl
Galactose	34,0	23,8	22,8
Hexosamines	31,0	27,7	21,3
Fucose	12,1	9,3	11,2
Ac.sialique	1,2	5,2	3,1
Sulfate	0	2,9	N.D.
Total (*)	78,3 %	66,0 %	58,4 %
<u>Galactose</u>	1,09	0,86	1,07
<u>Hexosamines</u>			

Tableau XXIII
Composition glucidique des mucines de mucoviscidose de l'enfant
(ETI... groupe sanguin A)

Conditions d'élution	0,1M NaCl	0,1M NaCl 0,01N HCl	0,25M NaCl 0,01N HCl	0,35M NaCl 0,01N HCl
Hexoses	22,3	19,6	18,8	17,2
Hexosamines	28,2	23,1	19,6	17,8
Fucose	16,2	13,9	9,8	8,2
Ac.sialique	4,3	8,5	5,1	2,2
Sulfate	8,5	10,5	11,1	12,5
Total (*)	79,5 %	75,6 %	64,4 %	57,9 %
<u>Hexoses</u>	0,79	0,84	0,95	0,96
<u>Hexosamines</u>				
<u>Glc NH₂</u>	1,33	1,04	1,49	1,53
<u>Gal NH₂</u>				

(*) Pourcentage des glucides combinés et du sulfate par rapport au poids sec de la préparation.



Ces résultats nous permettent d'aboutir à une classification des mucines sécrétées par l'ensemble de l'arbre trachéo-bronchique qui s'adapte d'ailleurs à celle rencontrée dans les productions des différents kystes bronchogéniques étudiés.

Cette classification s'adapte étroitement aux conditions d'élution utilisées pour la chromatographie sur colonne d'Ecteola-cellulose et rejoint les caractères histochimiques retenus pour leur caractérisation.

2) Eléments de classification des fucomucines bronchiques

Les mucines faiblement retenues sur l'Ecteola-cellulose sont riches en fucose (18 à 20 p. 100 du poids sec). Elles ne renferment que 1 à 5 p. 100 d'acide N-acétyl-neuraminique. Le sulfate peut être caractérisé dans ces fucomucines, mais n'excède jamais 1,5 p. 100 de la préparation.

Dès le passage sur la colonne d'une solution d'HCl 0,01 N et sans augmentation de la force ionique de cette solution (0,1 M NaCl), on peut dans certains cas (Tableau XIV : WAS... groupe sanguin A) éluer une mucine moins riche en fucose (14,6 p. 100), mais qui ne possède aucun caractère notable d'acidité de type carboxylique (2,2 p. 100 de NANA) ou sulfaté. On peut envisager par la plus faible teneur en fucose de cette préparation qu'elle correspond sans doute à une sialomucine ayant perdu dans le milieu endobronchique une partie de son acide sialique constitutif par action d'une neuraminidase bactérienne.

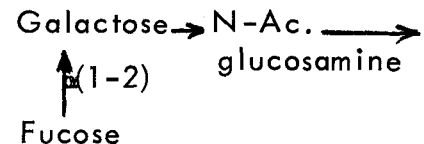
La comparaison des compositions glucidiques des fucomucines avec l'activité spécifique de groupe sanguin qu'elles présentent peut être discutée dans l'étude du rapport $\frac{\text{galactose}}{\text{hexosamines}}$. On constate en



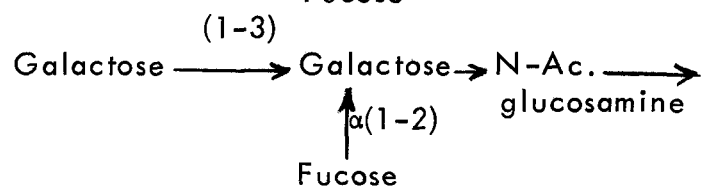
effet que ce rapport est de 1,0 dans les mucines d'activité H, de 0,8 dans les mucines d'activité A et de 1,1 dans les mucines d'activité B.

Ces rapports s'accordent avec la structure des oligosaccharides responsables de ces activités biologiques :

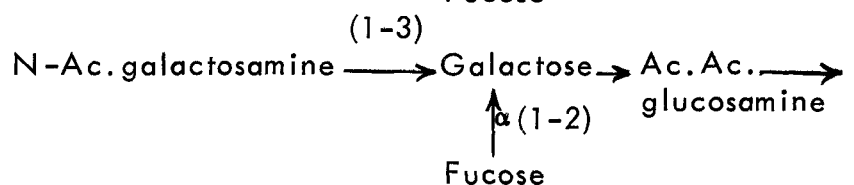
Activité H



Activité B



Activité A



Ces différences de rapport $\frac{\text{galactose}}{\text{hexosamines}}$ retrouvées dans les compositions des différentes fucomucines suggèrent :

- Une structure analogue pour toutes les mucines dans la partie profonde des glycanes supportant ces oligosaccharides spécifiques.

- Un nombre relativement limité de résidus osidiques dans la structure d'un glycanne supportant l'oligosaccharide spécifique de l'activité biologique. Cette condition est en effet nécessaire pour laisser apparaître des différences de composition portant sur un galactose ou une N-acétyl-galactosamine.

3) Éléments de classification des sialomucines

Les sialomucines sont éluées en solution HCl 0,01 N, NaCl

0,3 M. Elles sont moins riches en fucose que les précédentes et ne possèdent plus d'activité de substances de groupe sanguin. Leur composition fait toutefois apparaître un caractère hybride en rapport avec une teneur en sulfate de 1 à 3 p.100. Ce caractère hybride est beaucoup plus marqué dans les mucines de mucoviscidose de l'enfant.

La définition de cette classe de mucine repose néanmoins sur l'étroite dépendance du caractère polyanionique et de la présence d'acide N-acétyl-neuraminique aisément clivable par l'action de neuraminidase.

a) Action de la neuraminidase bactérienne

Nous avons comparé les cinétiques de libération d'acide N-acétyl-neuraminique par action de deux neuraminidases bactériennes :

- une neuraminidase de Clostridium perfringens d'activité spécifique égale à 1.280 U par mg ;
- une neuraminidase de Diplococcus pneumoniae titrant 1.200 U par mg ;

Les pourcentages d'acide N-acétyl-neuraminique libéré sont rapportés dans le tableau XXIV.

Tableau XXIV
Pourcentage d'acide sialique
libéré par l'action de neuraminidases bactériennes

	Neuraminidase de <i>Clostridium perfringens</i>	Neuraminidase de <i>Diplococcus pneumoniae</i>
en 60 mn	70,1 %	58,9 %
en 120 mn	75 %	67 %
en 24 heures	92 %	74,1 %

b) Etude électrophorétique de sialomucine avant et après action de la neuraminidase

L'étude électrophorétique réalisée en agarose à pH 8,2 démontre qu'après action d'une neuraminidase, les sialomucines ont un comportement électrophorétique et histochimique analogue à celui d'une fucomucine. Elles migrent moins rapidement en électrophorèse, se colorent par le réactif de Schiff après oxydation periodique, mais ne sont plus révélées par le Bleu de Toluidine.

Ces résultats démontrent que dans cette classe de mucines, le caractère polyanionique relève essentiellement de la présence d'acide sialique aisément clivable par l'action de neuraminidases bactériennes.

4) Eléments de classification des sulfomucines

Cette dernière classe de mucines est élue plus tardivement de la colonne d'Ecteola-cellulose. On note dans leur composition une baisse notable de la teneur en acide sialique et une augmentation importante du taux de sulfatation. La teneur en fucose est analogue à celle des sialomucines. Cette classe de mucines ne possède aucune activité de substances de groupes sanguins.

5) Conclusions

La systématisation définie pour les mucines sécrétées dans les kystes bronchogéniques est retrouvée pour les produits de sécrétion de l'arbre trachéo-bronchique. Il faut noter toutefois que dans la plupart des hypersécrétions, et plus encore dans la mucoviscidose de l'enfant, les mucines ont un caractère hybride carboxylique et sulfaté.

Cette distinction de trois classes fondamentales dans les

mucines bronchiques pose le problème de leur identification histochemique dans les biopsies tissulaires, ainsi que celui de leur origine cellulaire.

D) QUALITE D'ECHANGEUR D'IONS DES MUCINES BRONCHIQUES

La définition histochemique des mucines bronchiques purifiées repose essentiellement sur deux types de réactions :

- La coloration par le réactif de Schiff des polyaldéhydes formés par oxydation periodique des glycanes. Cette réaction est particulièrement nette pour les fucomucines et pour les sialomucines.

- La fixation d'un colorant basique comme le Bleu de Toluidine sur la structure polyanionique des mucines carboxyliques et sulfatées.

Connaissant les particularités de compositions chimiques des sialomucines et des sulfomucines purifiées ou de leurs glycopeptides, nous avons tenté de préciser plus exactement les conditions de fixation de colorants basiques sur ces molécules. La méthode spectrophotométrique décrite par OHKUMA (80) pour l'étude des modifications du spectre du Bleu de Toluidine fixé sur les substances M et N nous est apparue particulièrement intéressante pour l'étude des mécanismes d'échanges protéines-colorant ou peptides-colorant sur les diverses classes de mucines ou de glycopeptides bronchiques.

1) Colorations histochimiques des mucines de caractère polyanionique

Une sialomucine particulièrement riche en acide N-acétyl-neuraminique (21 p.100 du poids sec) telle que celle que nous avons pu isoler d'un kyste bronchogénique, se colore intensément par le Réactif de Schiff après oxydation periodique. Elle fixe le Bleu de Toluidine utilisé en solution de pH 2,45, le fixe plus faiblement à pH 1,0, et perd toute affinité pour ce colorant à pH 0,2.

Les sulfomucines (contenant 7 p.100 de sulfate) ne se révèlent pas par le Réactif de Schiff après oxydation periodique, mais fixent le Bleu de Toluidine (ou le Bleu Alcian) pour toutes les valeurs de pH de 0,2, 1,0 et 2,45.

2) Modifications du spectre d'une solution de Bleu de Toluidine par addition des divers types de glycopeptides de mucines bronchiques

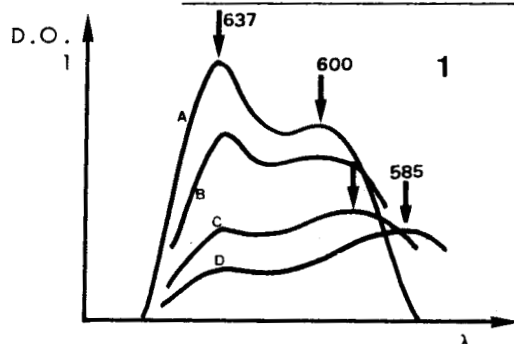
a) Protocole expérimental

2 mg de glycopeptides obtenus par protéolyse du mucus fibrillaire (papaine-pronase) et chromatographie sur DEAE-Sephadex A-25 sont dissous dans 2 ml de tampon phosphate 0,01 M de pH 6,5. Après agitation, sont ajoutés à la préparation de glycopeptides 2 ml d'une solution de Bleu de Toluidine (Bleu de Toluidine, O, E. Merck) à la concentration de 0,002 p.100 dans l'eau distillée.

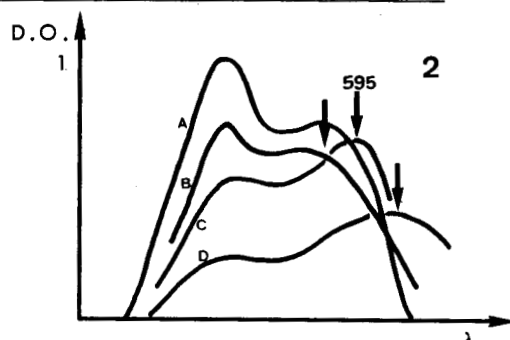
La concentration finale est donc respectivement de 0,05 p.100 en glycopeptide et de 0,001 p.100 en Bleu de Toluidine.

Le spectre d'absorption de ce mélange est établi en continu par balayage entre deux valeurs de longueur d'onde extrêmes de 530 et 700 nm.

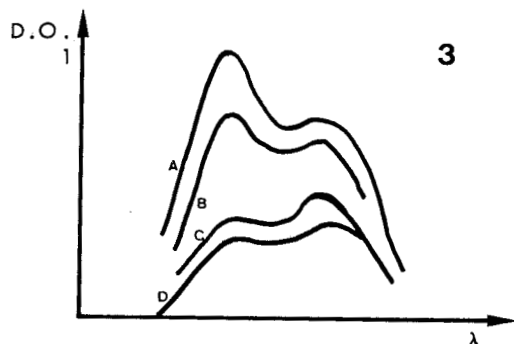
MODIFICATION DU SPECTRE D'ABSORPTION DU BLEU DE TOLUIDINE
EN PRESENCE DE GLYCOPEPTIDES OU DE MUCINES BRONCHIQUES



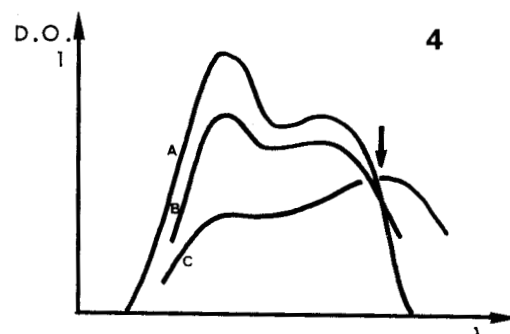
Glycopeptides de bronchite chronique (Sch...)



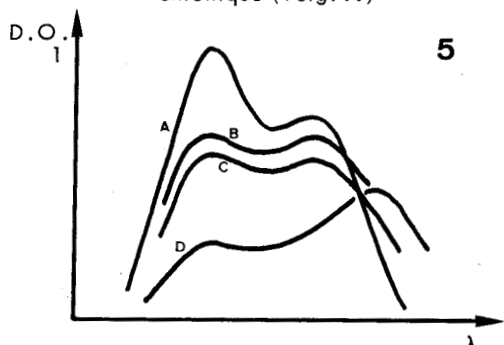
Glycopeptides de mucoviscidose (Dech...)



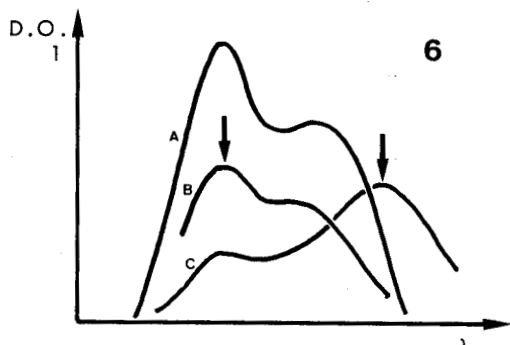
Mucines natives purifiées de bronchite chronique (Verg...)



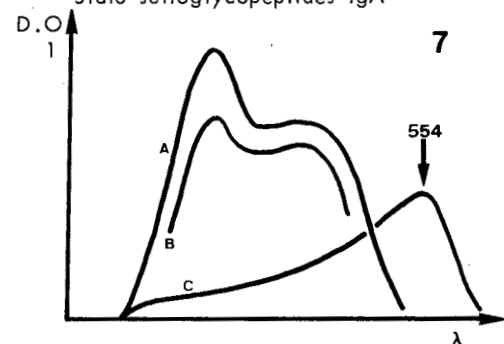
Glycopeptides de kyste bronchogénique (S.Mar...)



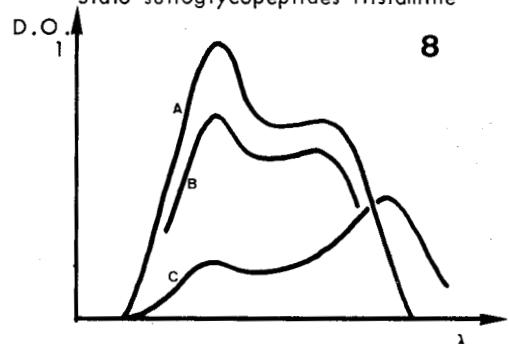
Sialo-sulfoglycopeptides-Transferrine
Sialo-sulfoglycopeptides-IgA



Sialo-sulfoglycopeptides-Bradykinine
Sialo-sulfoglycopeptides-Histamine



Chondroïtine-sulfate
Acide N-acétyl-neuraminique



Effet de la force ionique

Figure 12



Les spectres sont comparés à celui d'une solution de Bleu de Toluidine libre utilisée à la même concentration.

b) Résultats

Les diagrammes obtenus sont présentés figure 12 . Nous avons fait figurer les résultats de l'étude des glycopeptides élués en DEAE-Sephadex A-25 en :

NaCl 0,1 M

NaCl 0,3 M HCl 0,01 N

NaCl 0,5 M HCl 0,01 N

Ces trois éluats correspondent pour la solution NaCl 0,1 M aux glycopeptides riches en fucose, en 0,3 M NaCl HCl 0,01 N sont élués les sialoglycopeptides. Le caractère sulfaté apparaît en 0,5 M NaCl HCl 0,01 N.

Nous pouvons donc comparer l'interaction glycopeptide - Bleu de Toluidine en fonction de la richesse de nos préparations en fucose, en acide sialique et en sulfate.

1°) Glycopeptides de bronchite chronique (figure 12)

Le spectre du Bleu de Toluidine nous permet de retenir deux maximum d'absorption respectivement à 637 et 600 nm.

Les résultats obtenus avec les glycopeptides peuvent être donnés de la manière suivante : glycopeptides 0,1 M NaCl ou fucoglycopeptide : peu de modifications du spectre ; tout se passe comme si le colorant était libre. Il n'y a donc pas d'interaction.

: glycopeptides 0,3 M NaCl HCl 0,01 N ou sialoglycopeptide. Le spectre est modifié : l'on notera une diminution très nette de l'absorbance à 637 nm. Le rapport des

densités optiques : 637nm/600nm est selon les glycopeptides étudiés inférieur ou égal à 1.

: glycopeptides 0,5 M NaCl HCl
0,01 N ou sialosulfoglycopeptides : les modifications déjà observées avec les sialoglycopeptides sont retrouvées : inversion du rapport des densités optiques : 637nm/600nm. De plus, le second maximum (600 nm pour le Bleu de Toluidine libre) se déplace vers des longueurs plus faibles. (spectre 1)

L'étude de ces spectres d'absorption met donc en évidence l'affinité tinctoriale des glycopeptides acides (carboxyliques ou sulfatés) pour le Bleu de Toluidine. Il est de plus possible de distinguer facilement les glycopeptides sulfatés en fonction du décalage du second maximum d'absorption vers les longueurs d'onde plus faibles ; ce qui correspond en fait à la métachromasie observée sur lame d'électrophorèse : teinte rouge violacée des sulfoglycopeptides.

Le spectre donné par les mucopolysaccharides sulfatés tels que le chondroïtine-sulfate (figure 12) confirme cette hypothèse. Le maximum d'absorption se situe à 554 nm. (spectre 2)

De plus, OHKUMA (80) avait pu vérifier l'absence d'interaction entre l'acide sialique libre et le Bleu de Toluidine. Quant à nous, nous avons comparé le spectre donné par un glycopeptide riche en acide sialique (figure 12) avant et après libération de l'acide sialique par hydrolyse en acide sulfurique 0,5 N, 30 minutes, à 80°C. La désialidation entraîne une modification du spectre. Nous retrouvons un diagramme comparable à celui donné par les fucoglycopeptides. L'affinité tinctoriale pour le colorant est donc bien dans le cas étudié en rapport avec le degré de sialidation des chaînes glycaniques. (spectre 4)

2°) Glycopeptides de mucus fibrillaire de mucoviscidose

Les mêmes observations peuvent être retrouvées. Le décalage du second maximum d'absorption est plus important. On passe en effet de 600 nm à la longueur d'onde de 565 nm. (spectre 2)

3°) Etude des mucines natives

Nous avons vérifié que des résultats comparables sont obtenus avec les mucines natives purifiées (figure 12). Dans le cas des bronchites chroniques, les spectres des mucines se modifient progressivement en fonction de leur degré d'acidité. Le rapport des densités optiques : 637nm/600nm peut nous apporter un élément supplémentaire de classification des mucines en fonction de leur richesse en fucose, en acide sialique ou en sulfate. (spectre 3)

3) Modification de la capacité de fixation du Bleu de Toluidine par les sialo-sulfoglycopeptides

a) Effet de la force ionique et du pH

La fixation du Bleu de Toluidine sur les glycopeptides peut être totalement inhibée en fonction de la concentration en NaCl du mélange réactionnel. OHKUMA dans son étude des glycopeptides à activité M N libérés par protéolyse des érythrocytes humains, montre que la fixation du colorant est inhibée avec une concentration finale en NaCl de 0,01 M. Nous avons pu observer les mêmes résultats. Le mécanisme d'inhibition serait en fait la fixation du Na^+ sur les groupements carboxyliques des sialoglycopeptides.

Une deuxième observation est celle de l'influence du pH. L'abaissement du pH de la solution à la valeur de 1,8 fait également

disparaître toute interaction glycopeptide - colorant. Le rôle d'échangeur de cations des mucines bronchiques n'apparaît donc que dans des conditions précises d'ionisation ou de force ionique de la solution.

b) Fixation des peptides basiques par les sialo-sulfo-
glycopeptides

L'addition de molécules basiques à faible concentration à la préparation de glycopeptides affecte la possibilité de fixation du colorant sur les glycopeptides. Nous avons étudié la modification du spectre en fonction de la présence d'histamine et de bradykinine. Le choix de ces deux molécules basiques relève de leurs propriétés biologiques au niveau de l'arbre bronchique.

L'histamine est ajoutée à forte concentration : 1 mg d'histamine par mg de glycopeptide. (spectre 6)

La bradykinine admise dans le mélange est de 33 γ de peptide par mg de sialoglycopeptide. (spectre 6)

Les spectres d'absorption obtenus (figure 12 : spectre n°5 pour l'histamine, spectre n°8 pour la bradykinine) dans ces conditions opératoires montrent que le colorant n'est pas fixé sur les glycopeptides. On peut donc considérer que pour la fixation des molécules basiques et en particulier de la bradykinine, l'acide sialique joue un rôle fondamental.

Ce protocole expérimental et les résultats qu'il apporte sont en accord avec ceux que nous avons obtenus lors de l'étude de l'action de la bradykinine sur la broncho-motricité bronchique (MUH)(81). COLLIER et coll. décrivent en 1959 les effets de ce peptide sur la motricité bronchique du Cobaye in vivo (82). Nous avons pu en 1966 (HAVEZ et al.)(60) caractériser et isoler au sein des protéines du mucus bronchique une estérase résistant à l'inhibi-

teur trypsique du soja, que nous avons identifiée à la kallicréine.

Il est donc possible d'envisager au niveau de la muqueuse bronchique une libération de kinine après activation de la kallicréine et coupure enzymatique au niveau du kallidinogène libérant le peptide.

Le bronchospasme peut être obtenu chez le Cobaye par injection de 3 microgrammes de bradykinine. Si l'on incube des sialoglycopeptides à la dose de 2 mg pour 5 μ g de bradykinine à 37°C, pendant 30 minutes, et que l'on injecte ce mélange par voie intraveineuse, l'effet bronchospasmodique n'est plus retrouvé. Les sialoglycopeptides jouent donc un rôle dans l'inhibition de la bradykinine par formation d'un complexe non réversible dans les conditions physiologiques.

Cette action inhibitrice n'apparaît qu'avec les sialoglycopeptides ; si l'on désialide les glycopeptides (par méthode chimique ou enzymatique), l'effet de protection disparaît.

Nous sommes donc conduits à admettre pour les mucines sialidées des propriétés d'échangeur capable de fixer les peptides basiques.

La démonstration d'un complexe bradykinine - sialoglycopeptide, l'action de la neuraminidase sur ces structures nous permettent de conclure que ces mucines bronchiques possèdent un rôle biologique local à travers leur possibilité d'échangeur de cations.

c) Fixation des protéines

Ces propriétés d'échangeurs de cations ont été également étudiées en fonction de la possibilité de fixation des protéines ou des glycoprotéines. OHKUMA (83) signale que l'addition de sérum-albumine à faible concentration affecte l'interaction des sialoglyco-

peptides avec le Bleu de Toluidine. Nous avons pu faire les mêmes constatations avec des préparations de transferrine ou d'IgA de sécrétion, isolées et purifiées de l'expectoration.

Les modifications du spectre sont présentées figure 12 : spectre n°5. Le diagramme obtenu ne permet pas dans les rapports pourtant élevés qui ont été retenus (0,1 mg de protéines par mg de glycopeptides) d'obtenir un spectre voisin de celui de fucoglycopeptides ou de sialoglycopeptides. L'augmentation de la concentration en protéine (0,2 mg de protéines par mg de glycopeptides) ne modifie plus le spectre. D'autre part, les résultats sont tout à fait superposables quel que soit le point isoélectrique de la glycoprotéine retenue.

Il n'est donc pas certain que la fixation de la transferrine ou des IgA soit en rapport direct avec la seule présence de l'acide sialique en position terminale des chaînes glycaniques des glycopeptides.

Toutefois, le complexe protéine-mucine peut être mis en évidence. Il nous permet de souligner la possibilité de l'interaction des protéines dans la réalisation de la structure fibrillaire du mucus bronchique. Cette hypothèse avait déjà été formulée en 1964 (DEGAND)(84).

Si à une solution de mucines acides isolées par précipitation à pH 2,3 et précipitant par le Cetavlon, nous ajoutons une solution d'IgA, nous pouvons enregistrer en viscosimétrie, une augmentation rapide de la viscosité apparente. Des forces de tension apparaissent et gênent la rotation du disque mobile du viscosimètre (mesure effectuée sur Micro-Cone Plate Viscosimeter Brookfield). Des propriétés rhéologiques analogues à celles observées sur le mucus fibrillaire de l'expectoration sont donc apparues et nous conduisent

à envisager que l'union de ces deux groupes de molécules conditionne la structure organisée du réseau fibrillaire. L'action sur les préparations visqueuses et géliformes obtenues in vitro, d'un agent réducteur (L.cystéine 0,075 M en concentration finale) est immédiate et réduit en quelques minutes la viscosité. L'absence d'effet sur les mucines en l'absence d'immunoglobulines a été vérifiée.

La démonstration de complexes protéine-mucine peut donc fournir une interprétation de l'action des agents réducteurs sur les sécrétions bronchiques. Nous pensons que la transferrine joue également ce rôle et peut concourir à la réalisation de ponts d'union interfibrillaire.

E) ORIGINE CELLULAIRE DES MUCINES SULFATEES DE L'EXPECTORATION

Les études histochimiques et l'analyse des produits synthétisés dans les fragments de biopsie bronchique maintenus en survie in vitro nous ont permis d'étudier l'incorporation de radiosulfate dans la structure des glycoprotéines sécrétées et d'identifier les éluats cellulaires responsables de ce transfert actif du sulfate.

1) Protocole expérimental

Des biopsies bronchiques prélevées au niveau de l'éperon de la bronche lobaire moyenne sont lavées dans une solution de chlorure de sodium à 0,8 p. 100 ml d'eau distillée, soigneusement découpées en très minces lambeaux de muqueuse que l'on place dans le milieu de Hanks, additionné de 150 μ C de sulfate marqué par le ³⁵S. Les biopsies sont maintenues 6 heures en survie à 37°C sous

agitation rotative douce, puis lavées abondamment par le sérum physiologique, afin d'éliminer au mieux le sulfate libre en excès.

a) Etude histologique (*)

Pour l'étude histologique, les fragments de muqueuse bronchique sont fixés par le formol Baker, puis déshydratés par l'éthanol absolu. On procède alors à l'inclusion dans la paraffine pour la préparation des coupes. Ces coupes sont montées sur des lames gélatinisées (gélatine à 1 p.100). Après élimination de la paraffine par le toluène, les lames sont recouvertes d'une émulsion photographique pelliculaire (AR 10 Kodak) et conservées à +4°C en boîtes hermétiques. On procède à la révélation de l'émulsion (révélateur D 19) après des temps d'exposition variables : de 7 jours à 1 mois.

Une identification des éléments morphologiques est effectuée soit par coloration au Bleu Alcian (pH 0,2) et au glychemalun de Mayer, soit par coloration au Bleu Alcian associée au réactif de Schiff après oxydation periodique.

La prise de clichés photographiques des autoradiographies avant coloration des lames, permet de confronter une étude histochimique des glandes bronchiques et l'incorporation du précurseur utilisé (figure 13).

b) Démonstration de l'incorporation du radiosulfate dans les glycopeptides

Afin de préciser la nature des produits de sécrétion qui incorporent le sulfate marqué, nous avons préparé à partir des fragments tissulaires maintenus en survie un hydrolysat papaïne-pronase dans les conditions précédemment décrites. La faible quantité d'hydrolysat

(*) Nous remercions le Professeur M. DEMINATTI qui a réalisé l'étude histo-autoradiographique.

de muqueuse interdit toute étude chimique directe. Nous avons donc ajouté à l'hydrolysât tissulaire une préparation de glycopeptides obtenus par hydrolyse dans les mêmes conditions du mucus fibrillaire de l'expectoration du même malade.

1°) Chromatographie de gel-filtration sur Biogel P 20

Cette chromatographie de gel-filtration est réalisée dans l'eau distillée. Les courbes obtenues par le dosage à l'orcinol sulfurique et l'enregistrement de la radioactivité (à l'aide d'un appareil Tri Carb Packard) permettent d'individualiser deux pics :

- Le premier pic qui s'inscrit à la fois sur la courbe de dosage à l'orcinol et sur la courbe d'enregistrement de la radioactivité correspond aux glycopeptides ayant incorporé le radiosulfate.

- Le second pic ne s'inscrit que sur la courbe de radioactivité. Il représente le radiosulfate libre en excès.

La fraction exclue de la colonne de Biogel P 20 est soumise à un fractionnement par le Rivanol à pH 1,5. Le surnageant et le précipité Rivanol sont soumis à une étude électrophorétique en agarose à pH 8,2 avec autoradiographie.

2°) Localisation cellulaire des sulfo-transférases

L'examen des coupes colorées par le Bleu Alcian (pH 0,2)-glychemalun, superposées à leurs autoradiographies (figure 13) montre qu'il existe une intense incorporation du précurseur radioactif. L'incorporation du radiosulfate est située au niveau de l'épithélium de surface et au niveau de certains des éléments des glandes mixtes situées dans la sous-muqueuse.

Dans certaines coupes, il est possible, au niveau du carti-

lage bronchique de mettre en évidence la fixation du radiosulfate par les chondrocytes. Toutefois, cette incorporation est toujours moins intense qu'au niveau des éléments sécréteurs.

Au faible grossissement (x 25), l'examen des coupes après 6 heures 30 mn d'incubation en présence de sulfate ^{35}S permet de noter une radioactivité très marquée au niveau de l'épithélium de surface. Il n'y a pas d'incorporation dans les cellules qui bordent le canal excréteur.

Pour préciser la nature des produits élaborés par les différents éléments des glandes mixtes, nous comparons l'étude de la coupe colorée par le réactif de Schiff après oxydation periodique (figure 13a) et l'autoradiographie correspondante (figure 13b).

Sur ce cliché, les éléments glandulaires correspondent à des acini muqueux ou à des acini séreux. On observe également des formations annulaires à la périphérie de certaines glandes muqueuses. Il s'agit d'éléments séreux décrits sous le nom de croissant de lune ou croissant de Gianuzzi.

Les cellules muqueuses donnent avec la réaction PAS (figure 13a) une coloration diffuse, rouge intense. Elles ne se colorent pas par le Bleu Alcian à pH 0,2 et ne fixent que très faiblement le sulfate. La double coloration Bleu Alcian - PAS fait apparaître toutefois dans quelques tubules muqueux au-dessus du noyau des traînées bleu-violacé qui correspondent parfois à une incorporation plus ou moins nette de radiosulfate.

Dans les cellules séreuses, on observe quelques granulations PAS positives et d'autres colorées en rouge-violacé par le Bleu Alcian - PAS : l'intensité de la fixation du radiosulfate au niveau des éléments séreux se traduit par l'abondance des grains dans l'émulsion photographique.

Ainsi, nous pouvons localiser l'incorporation de radio-sulfate au niveau des cellules caliciformes de l'épithélium de surface et au niveau des cellules séreuses des glandes mixtes.

2) Etude des glycopeptides isolés des fragments tissulaires et marqués par le $^{35}\text{SO}_4^{--}$

a) Isolément des glycopeptides

La fraction exclue de la colonne de Biogel P 20 a été étudiée en électrophorèse en agarose à pH 8,2. Les autoradiographies permettent de situer sur les diagrammes révélés par le Bleu de Toluidine ou par le PAS les composants marqués isolés des biopsies bronchiques.

Deux fractions mineures très anodiques, faiblement radioactives sont peu révélées par le Bleu de Toluidine. Une autre fraction colorée par le Bleu de Toluidine correspond par sa mobilité électrophorétique aux glycopeptides sulfatés du mucus bronchique. La fraction révélée par le PAS n'est pas radioactive.

Nous avons vérifié par les études électrophorétiques et les autoradiographies correspondantes pratiquées sur le précipité et le surnageant Rivanol que tous les glycopeptides marqués par le $^{35}\text{SO}_4$ étaient précipités par le Rivanol.

Il y a donc analogie étroite entre la taille moléculaire, le comportement électrophorétique, les critères de précipitation en présence de Rivanol (pH 1,5) des glycopeptides obtenus par protéolyse des fragments tissulaires et des sulfoglycopeptides isolés du mucus bronchique du même malade.

b) Localisation du sulfate au niveau des glycopeptides
du mucus fibrillaire

Les glycopeptides sulfatés précipités par le Rivanol et marqués par le radio-sulfate ^{35}S ont été soumis à une hydrolyse en milieu $\text{HCl } 0,2 \text{ N}$ à 100°C , pendant une heure en tube scellé sous vide. L'hydrolysate ainsi obtenu est déposé sur une colonne de Sephadex G-15 en eau distillée. L'élution est suivie par le dosage à l'orcinol sulfurique et par mesure de la radioactivité en flux continu. Le diagramme obtenu nous montre la libération à partir des glycopeptides de composants de faible taille moléculaire qui sont colorés par le réactif à l'orcinol. Toutefois, la radioactivité n'est retrouvée qu'au niveau de la fraction exclue du gel de Sephadex. Cette fraction, après lyophilisation, a été soumise à nouveau à une hydrolyse par $\text{HCl } 0,2 \text{ N}$ à 100°C , pendant une heure. Une nouvelle filtration sur la même colonne de Sephadex G-15 montre que cette deuxième hydrolyse acide douce permet de couper les chaînes glycaniques du glycopeptide sulfaté. La radioactivité est principalement retrouvée dans la zone d'exclusion, mais apparaît faiblement dans la zone d'élution des composants glucidiques de faible taille moléculaire.

La nécessité de recourir à deux étapes successives d'hydrolyse acide dans des conditions qui amènent la coupure des oses en position terminale non réductrice des chaînes glycaniques nous conduit à penser que les groupements sulfate sont situés en profondeur de la chaîne glycanique. Cette hypothèse a été formulée également par KENT (85) à propos des mucines intestinales du colon de Mouton.

Enfin, l'autoradiographie de la chromatographie sur papier des glucides libérés par hydrolyse chlorhydrique ($\text{HCl } 4 \text{ N}$, 4 heures,

100°C) nous permet de retrouver la radioactivité au niveau de la zone correspondant à la migration des oses-osamines, sans qu'il nous soit actuellement possible d'établir avec certitude l'ose substitué par le radio-sulfate. Il nous faut souligner également la stabilité de la liaison C - O - S dans les conditions d'hydrolyse utilisée.

3) Conclusion

Ces résultats nous indiquent une localisation privilégiée des sulfo-transférases dans les acini séreux des glandes mixtes de la muqueuse bronchique. Les tubules muqueux ramifiés semblent plus adaptés à la synthèse des substances de groupe sanguin et des sialomucines.

On peut concevoir que l'activité métabolique plus ou moins intense de ces deux types cellulaires aboutira à un équilibre des mucines qui influencera la qualité et les propriétés du produit déversé dans la lumière bronchique.

F) ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DES CELLULES SEREUSES ET DES CELLULES MUQUEUSES

En microscopie électronique, les cellules séreuses se caractérisent essentiellement par un ergastoplasme développé et la présence de granulations arrondies ou ovalaires, relativement denses aux électrons et limitées par une membrane.

Les cellules muqueuses, au contraire, contiennent un ergastoplasme peu important et un appareil de Golgi étalé formé par de nombreux dictyosomes.

Ces boules de mucigènes occupent la partie apicale de la

cellule ; elles sont volumineuses et entrent souvent en confluence. Par ailleurs, à l'inverse des granulations séreuses, elles ne sont pas circonscrites par une membrane. De plus, elles se caractérisent par des densités variables aux électrons.

THIERY (1967)(86) a modifié la technique de SELIGMAN pour la mise en évidence de polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique (*). Nous avons appliqué ce protocole à l'étude des glandes bronchiques d'une biopsie effectuée chez un sujet normal, au cours d'une bronchoscopie (**). Après une oxydation périodique de 15 mn, 15 heures d'action de la thiocarbohydrazide sont suffisantes pour mettre en évidence les groupements

α -glycol révélés par le protéinate d'argent. Dans ces conditions, les boules de mucigènes ainsi que la face mature de l'appareil de Golgi des cellules muqueuses présentent un marquage important (figure 14). Toutefois, il existe une grande variabilité dans l'intensité et la répartition du "marquage" des boules de mucigènes appartenant à une même cellule ou à des cellules différentes. Aucun marquage n'a pu être observé sur les granulations des cellules séreuses.

Après 70 heures de contact avec la thiocarbohydrazide, nous n'observons pas de modification de marquage des boules de mucigènes, par contre des grains de protéinate d'argent apparaissent sur les granulations des cellules séreuses. L'interprétation de ces résultats s'avère cependant délicate, étant donné le temps d'action prolongé de la thiocarbohydrazide qui provoque un "bruit de fond" au niveau du cytoplasme.

(*) Cette technique est la transposition de la mise en évidence des glycoprotéines par le réactif de Schiff après oxydation périodique sur lames d'électrophorèse.

(**) Nous remercions vivement le Professeur M. MAZZUCA qui a bien voulu réaliser l'étude en microscopie électronique que nous rapportons dans ce travail.

CHAPITRE V

ELEMENTS DE STRUCTURE DES MUCINES BRONCHIQUES

Les préparations de mucines soumises aux méthodes d'analyse structurale sont homogènes en ultracentrifugation, et possèdent en position N-terminale un seul résidu d'arginine. Ces résultats suggèrent l'existence d'un axe polypeptidique unique caractérisé par sa richesse en thréonine (27 à 29 résidus pour 100), en sérine (16 à 18 résidus pour 100), en proline (11 à 13 résidus pour 100), en glycocolle (7 à 8 résidus pour 100) et en alanine (9 à 10 résidus pour 100). Sa faible teneur en acides aminés basiques (7 à 8 résidus pour 100) jointe à l'importance des groupements glycaniques peut expliquer la grande résistance de ces molécules à l'action de la trypsine. Cet axe polypeptidique est dépourvu de pont disulfure intrapeptidique. Il apparaît ainsi comme une chaîne protéique constituée de 700 à 800 résidus d'acides-amino. L'abondance des résidus de proline intervient certainement pour donner une structure conformationnelle très particulière avec de brusques courbures en rapport avec la disposition spatiale du carboxyle et du groupement iminé de cet iminoacide.

L'approche de la structure des mucines bronchiques ainsi définie pose tout d'abord le problème de la répartition des groupements glycaniques sur leur axe polypeptidique. C'est à ce problème que nous nous sommes essentiellement attaché en abordant tout d'abord la détermination de la séquence peptidique de l'extrémité N-terminale. Cette étude nous montre la proximité du premier point d'attache glycanne-protéine qui n'est séparé de l'arginine en position N-terminale que par un seul résidu d'acide-amino.

L'étude du point d'attache glycanne-protéine pose deux problèmes : nature de la liaison et identification de l'ose et de l'acide aminé impliqués dans cette liaison. Ces déterminations réalisées successivement sur la mucine native et sur les glycopeptides libérés par protéolyse enzymatique suggèrent une distribution sensiblement homogène des glycanes sur l'ensemble de l'axe polypeptidique. Ces résultats sont vérifiés par l'étude de glycopeptides de plus petite taille où la séquence au voisinage du point d'attache du glycanne proche de l'extrémité N-terminale du peptide a été déterminée. La longueur moyenne du glycanne que suggèrent ces résultats est compatible avec les résultats fournis par l'oxydation périodique des glycopeptides.

A) ETUDE DE L'EXTREMITÉ N-TERMINALE DES MUCINES

Par méthode des Dansyl-amino-acides, il est possible d'identifier l'arginine en position N-terminale des mucines. Ce terminal est retrouvé quelle que soit la nature de la mucine étudiée et ne se modifie pas en fonction de sa composition glucidique. L'appli-

cation à la molécule native des techniques de dégradation récurrente d'Edman couplées avec la méthode des dansylations de GRAY et HARTLEY nous a permis d'identifier la séquence suivante :

ARG - PRO - X -(GLY , ALA)

Les amino-acides dansylés sont identifiés par chromatographie en couche mince sur gel de silice. La position des dansyl-amino-acides est repérée par leur fluorescence à 340 nm. Pour le premier cycle, l'identification de la proline n'offre pas de difficultés. Après le deuxième cycle de dégradation récurrente, nous ne pouvons identifier l'acide terminal. Aucun dansyl-amino-acide n'est fluorescent. Plusieurs hypothèses pouvaient être avancées et nous discuterons surtout les suivantes :

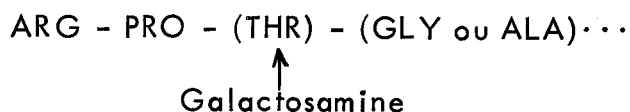
- blocage de la dégradation récurrente d'Edman
- impossibilité de dansyler l'acide en position terminale
- absence de fluorescence de l'acide N-terminal dansylé.

Le blocage de la dégradation récurrente peut être éliminé en fonction des résultats du cycle suivant. Il ne nous est pas possible de répondre actuellement et de trancher entre la seconde et la troisième hypothèse. Toutefois, des exemples de dansyl-amino-acides non fluorescents ont déjà été observés ; citons en particulier le cas de la S-carboxy-méthyl-méthioninyl-peptide où la DNS-carboxy-méthyl-méthionine libérée n'apparaît pas sous forme d'un dérivé (TANG) (87) fluorescent, bien que la réaction de la fonction aminée avec le chlorure de 1-diméthyl-amino-naphtalène-sulfonyl (DNSCL) soit conservée. Nous reverrons d'ailleurs ce problème lorsque nous exposerons les résultats obtenus sur des glycopeptides de faible taille moléculaire

et où nous pourrions lier l'absence de dansylation ou de fluorescence à la présence d'un point de branchement glycanne-protéine.

Le troisième cycle d'Edman nous permet d'identifier la glycine et l'alanine. Il est possible également de caractériser une dansyl-osamine, ainsi que la thréonine. Il apparaît donc qu'un cycle supplémentaire d'Edman dégraderait le glycanne-amino-acide et libèrerait l'OH-amino-acide engagé dans la liaison O-glycosidique permettant ainsi la fluorescence de la Dansyl-thréonine.

Cette étude de la séquence des acides aminés de la région N-terminale des mucines natives nous permet donc de retenir l'enchaînement :



B) ETUDE DU POINT D'ATTACHE GLYCANNE-PROTEINE DES MUCINES BRONCHIQUES

La présence de liaisons O-séryl et O-thréonyl-N-acétyl-galactosaminides a été démontrée dans les substances de groupe sanguin par de nombreux auteurs : KABAT et LLOYD (88), KOTCHETKOV (89), WINZLER (90), KNOX et MORGAN (91), REGE et MORGAN (92).

La sensibilité de ce type de liaison en milieu alcalin est maintenant bien établie. Elle a d'ailleurs été utilisée et mise à profit pour obtenir des oligosaccharides qui possèdent encore une activité de groupe sanguin (KNOX) (93) (REGE)(94) (SCHIFFMAN)(95).

De nombreuses techniques comportant toutes un passage en milieu alcalin ont été proposées pour caractériser les liaisons O-séryl et O-thréonyl-glycosidiques qui relient les glycanes au squelette polypeptidique de certaines glycoprotéines comme les mucines sous-maxillaires (PIGMAN)(96) (BHAVANANDAN)(97) (GOTTSCHALK)(98) (ADAMS)(99)(100)(BERTOLINI)(101) CASTELLANI(102), ou comme les mucopolysaccharides sulfatés (ANDERSON, HOFFMAN et MEYER)(103) (GREGORY, LAURENT et RODEN)(104). Ces liaisons glycanne-protide sont en effet très labiles en milieu alcalin et leur hydrolyse amène une modification structurale du β -hydroxy-amino-acide engagé dans la liaison par un mécanisme de β -élimination bien étudié par HARBON et al. (105)(106).

La richesse en OH-amino-acides de nos préparations de mucine bronchique (40 à 45 résidus pour 100 résidus) nous a conduit à envisager la possibilité de liaison glycanne-protéine de type séryl ou thréonyl-O-glycosidiques et à préciser l'importance du nombre de branchements dans la structure des mucines.

1) Modification de l'absorption spectrophotométrique à 241 nm

La formation des déhydro-amino-acides (acide 2-amino-2-propénoïque ou α -amino-acrylique ou déhydro-alanine à partir de la sérine ; acide 2-amino-2-buténoïque ou α -amino-crotonique à partir de la thréonine) au sein du squelette polypeptidique de la glycoprotéine s'accompagne d'une augmentation de la densité optique des solutions mesurée à la longueur d'onde de 241 nm.

Nous appliquons la méthode décrite par CARUBELLI,

BHAVANANDAN et GOTTSCHALK(107) sur des préparations purifiées de mucine. La densité optique de 2 mg de mucine dissous dans 3 ml de NaOH 0,5 N s'élève progressivement en 60 minutes, à la température du laboratoire. Les valeurs de la densité optique mesurée aux temps 0, 30 et 60 minutes sont rapportées dans le tableau XXV.

Tableau XXV
Variation de la densité optique des mucines à 241 nm
en présence de NaOH 0,5 N

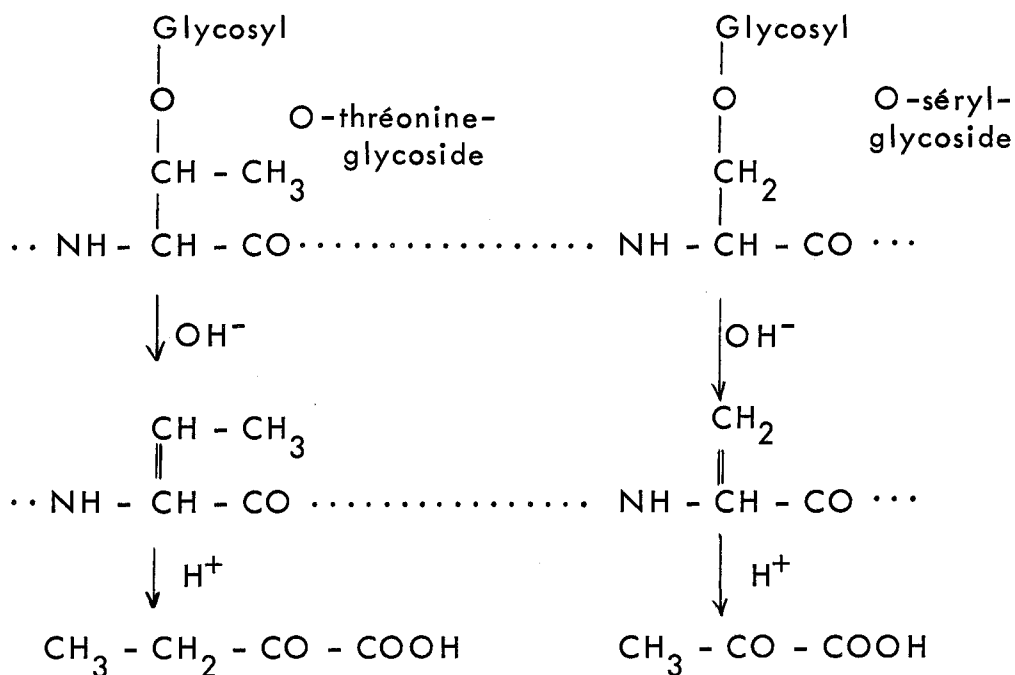
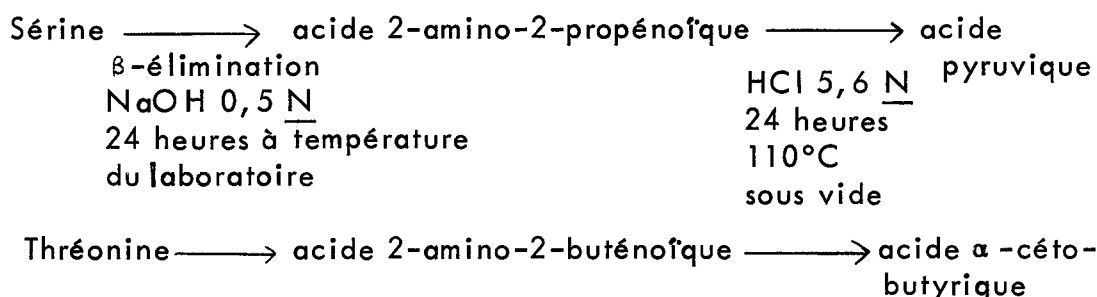
Temps en heure	Fucomucine 0,1 <u>M</u> NaCl	Sialomucine 0,3 <u>M</u> NaCl 0,01 <u>N</u> HCl	Sulfomucine 0,5 <u>M</u> NaCl 0,01 <u>N</u> HCl
0	0,160	0,200	0,165
1	0,250	0,350	0,300
2	0,410	0,540	0,500
4	0,640	0,850	0,805
5	0,730	0,980	0,940
6	0,795	1,100	1,050
7	0,840	1,160	1,130
8	0,920	1,260	1,210
24	1,120	1,520	1,480

Cette augmentation progressive de la densité optique est tout à fait comparable à celle observée par CARUBELLI et al.(107) avec un glycopeptide de mucine sous-maxillaire de Mouton. Elle nous apporte un élément en faveur de la présence de liaisons alcalilabiles sensibles au mécanisme de β -élimination.

2) Identification des acides α -cétoniques formés dans la lithine 0,09 N

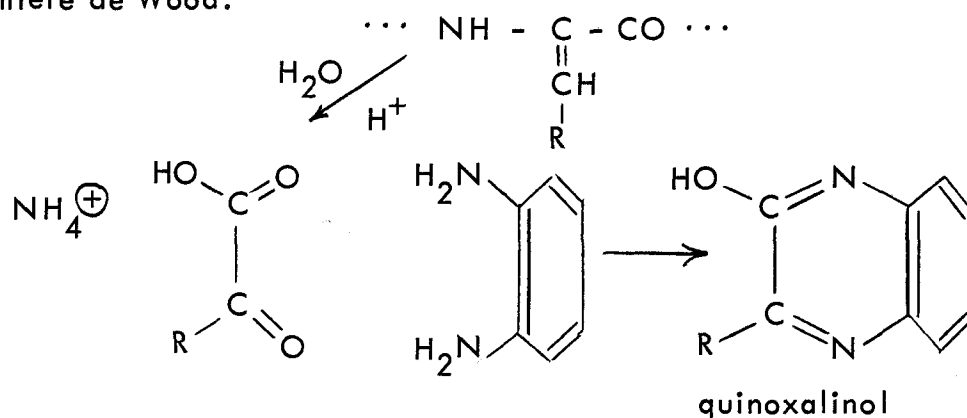
L'instabilité des acides α -cétoniques formés à partir de la sérine ou de la thréonine engagés dans les liaisons séryl ou thréonyl-

O-glycosidiques ne permet pas de les identifier dans les hydrolysats chlorhydriques des mucines traitées en milieu alcalin. Dans les conditions d'hydrolyse des protéines (HCl 5,6 N, 24 heures, 110°C, en tube scellé sous vide), ils subissent une désamination oxydative qui transforme l'acide 2-amino-2-propénoïque en acide pyruvique et l'acide 2-amino-2-buténoïque en acide α -céto-butérique.



Nous avons repris la technique préconisée par ADAMS (108): hydrolyse une heure à 100°C par la lithine 0,09 N. La solution est ensuite traitée par l'ortho-phénylène-diamine en milieu acide pen-

dans 16 heures à 110°C. Les quinoxalinols formés sont séparés par chromatographie en couche mince sur gel de silice, avec le système solvant chloroforme - éthanol (9/1) préconisé par ADAMS. Les quinoxalinols sont séparés et identifiés par leur fluorescence bleue en lumière de Wood.



Cette méthode a été appliquée à des mucines riches en fucose. Elle a mis en évidence l'existence dans les mucines bronchiques de liaisons O-séryl mais surtout de liaisons O-thréonyl-glycosidiques.

3) Composition en acides aminés après traitement par la soude

L'action de la soude 0,5 N pendant 24 heures, à température du laboratoire, provoque la formation par β -élimination de déhydro-amino-acides. Ces déhydro-amino-acides sont instables au cours de l'hydrolyse totale par l'acide chlorhydrique (HCl 5,6 N, 110°C, 24 heures, sous vide). En comparant la composition en acides aminés d'une mucine avant et après traitement alcalin, la diminution du nombre de résidus d'OH-amino-acides enregistrée représente le nombre de molécules de thréonine ou de sérine qui, engagées dans les liaisons glycanne-protide, ont été transformées en déhydroxy-amino-acides par mécanisme de β -élimination.

Cette estimation des résidus transformés est un argument non seulement qualitatif, mais aussi quantitatif des liaisons séryl ou thréonyl-O-glycosidiques. Toutefois, MONSIGNY (109) souligne dans sa Thèse la possibilité de destruction d'OH-amino-acides non substitués. BHAVANANDAN et al. (110) ont pu montrer que l'action de la soude 1 N, à 0°C, pendant 68 heures, amenait une destruction de 10 p.100 de la sérine sur la séryl-leucyl-leucine et sur la séryl-glycyl-glycinamide.

HARBON et coll. (111) aboutissent à la même constatation en soumettant le lysozyme à un contact, à pH 12,8, de 45 minutes à 70°C. Dans ces conditions, 15 p.100 de la sérine et de la thréonine sont détruites.

On peut également observer une diminution sensible du taux de l'osamine engagée dans la liaison ; ANDERSON-BRAY (112) LIEBERMAN et MEYER signalent cette possibilité.

a) Conditions de rupture des liaisons alcali-labiles :

Les conditions expérimentales préconisées sont différentes selon les auteurs. Pour ANDERSON (112), NaOH 0,5 N, 2°C, pendant 7 à 20 heures ; pour GOTTSCHALK (113), mêmes conditions mais avec 68 heures de contact ; ANDERSON (114) utilise également la potasse KOH 0,45 N, 20°C, pendant 20 heures. HARBON et CLAUSER (115) préconisent des solutions alcalines de pH 12,8 et de force ionique 1,6 à 70°C pendant 45 minutes.

TANAKA (116) enfin retient une normalité plus faible en soude : NaOH 0,1 N, à 20°C, pendant 1 à 6 jours, en présence de borohydrure de sodium 0,3 M qui assure la réduction des déhydroprotéines. TANAKA et PIGMAN (116) obtiennent ainsi une réduction de 80 p.100 de la déhydro-alanine et de l'acide 2-amino-2-

buténoïque. MONSIGNY (117) obtient une réduction satisfaisante avec le sodium-ammoniac préconisé par RESSLER et KARHELIKAR (118). L'alanine et l'acide α -amino-butérique sont ensuite dosés sur auto-analyseur Technicon. La présence de borohydrure dans la solution alcaline va également provoquer la réduction de l'hexosamine engagée dans la liaison et peut permettre son identification. Au cours de notre étude, nous avons adopté les conditions suivantes standardisées pour tous les échantillons étudiés : NaOH 0,5 N, 24 heures, à température du laboratoire.

b) Résultats obtenus

La composition en acides aminés avant et après traitement alcalin nous permet de déterminer le pourcentage de destruction des acides aminés hydroxylés.

Nous présentons dans le tableauXXVI quelques résultats de cette étude qui a porté sur les mucines préparées à partir de sécrétions individuelles.

L'étude de ces résultats nous permet de faire plusieurs remarques :

1°) Le pourcentage de destruction de la thréonine et de la sérine ne semble pas influencé par la qualité de la mucine étudiée et en particulier par la nature de la composition des chaînes de glycanne qui la caractérise.

2°) Le nombre de branchements pour 100 résidus d'acides aminés est sensiblement constant pour les différentes mucines entrant dans la structure d'une sécrétion individuelle.

3°) Le nombre de liaisons glycanne-protéine apparaît légèrement différent en fonction de l'activité de groupe sanguin du sujet.

Tableau XXVI

Action de la soude 0,5 N, 24 heures à température du laboratoire
sur des préparations de mucines bronchiques

Mucines de bronchite chronique

1) Sujet de groupe sanguin O : CHA...

MUCINES	THREONINE			SERINE		
	nb d'AA p. 100 AA	% de destruction	nb de résidus détruits	nb d'AA p. 100 AA	% de destruction	nb de résidus détruits
0,1M NaCl	31,26	34	11	14,76	52	8
0,3M NaCl	32,80	33	11	18,20	50	9
0,01N HCl						
0,5M NaCl	29,27	34	10	17,39	54	8
0,01N HCl						
0,7M NaCl	29,27	40	12	16,26	51	8
0,01 N HCl						
2) <u>Sujet de groupe sanguin A : WAS...</u>						
0,1M NaCl	27,01	58	16	16,62	40	7
0,1M NaCl	28,26	41	12	16,40	42	9
0,01N HCl						
0,35M NaCl	27,82	60	15	16,92	45	8
0,01N HCl						
3) <u>Sujet de groupe sanguin B : BIG...</u>						
0,1M NaCl	28,96	41	12	14,05	32	5

8/5
FILE

Tableau XXVI (suite)

Action de la soude 0,5 N, 24 heures à température du laboratoire
sur des préparations de mucines bronchiques

	THREONINE			SERINE		
	nb d'AA p. 100 AA	% de destruction	nb de résidus détruits	nb d'AA p. 100 AA	% de destruction	nb de résidus détruits
<u>Mucines de mucoviscidose de l'enfant : ETI...</u>						
0,1M NaCl	24,51	32	8	14,38	40	6
0,3M NaCl 0,01 N HCl	26,37	48	13	15,07	33	5
0,45 M NaCl 0,01 N HCl	26,30	49	12	16,98	30	5



Activité O	: 11 thréonine 8 sérine	19 branchements pour 100 résidus
Activité A	: 16 thréonine 7 sérine	23 branchements pour 100 résidus
Activité B	: 12 thréonine 5 sérine	17 branchements pour 100 résidus

Ces résultats seront toutefois nuancés en fonction du petit nombre de sécrétions complètement étudiées.

4°) Le nombre d'acides aminés entre deux branchements glycaniques dans l'hypothèse d'une répartition homogène des liaisons glycanne-protide dans la molécule peut être calculé en fonction de nos résultats :

pour les mucines d'activité de groupe sanguin O : 4 résidus inter-chaînes
d'activité de groupe sanguin A : 3 résidus inter-chaînes
d'activité de groupe sanguin B : 5 résidus inter-chaînes

C) DISTRIBUTION DES GLYCANNES SUR L'AXE POLYPEPTIDIQUE

1) Etude des glycopeptides du mucus fibrillaire

L'étude du comportement en solution alcaline des glycopeptides préparés par protéolyse directe du mucus fibrillaire et fractionnés par précipitation en présence de Rivanol et chromatographie sur DEAE-Sephadex, nous permet d'aborder le problème de branchements

Glycane-protide sur des éluats de plus faible taille moléculaire que les mucines.

a) Composition en acides aminés après traitement alcalin

La composition en acides aminés des glycopeptides solubles ou précipités par le Rivanol est donnée dans le tableau XXVII.

Tableau XXVII

Composition en acides aminés

des glycopeptides séparés par fractionnement au Rivanol

et chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A-25

Acides Aminés ^(a)	Glycopeptides solubles dans le Rivanol		Glycopeptides précipités par le Rivanol		
	0,1M NaCl	0,3M NaCl	0,3M NaCl	0,5M NaCl	0,7M NaCl
ASP	1,8	1,5	2,2	2,0	2,8
THR	33,3 (17) ^(c)	34,8 (17)	31,9 (14)	30,3 (14)	29,9 (13)
SER	17,0 (6)	18,6 (7)	18,8 (7)	17,7 (6)	16,4 (6)
GLU	3,5	2,6	3,0	3,3	3,8
PRO	11,4	13,0	11,7	11,3	11,1
GLY	7,0	6,4	8,4	8,5	8,6
ALA	10,7	9,4	10,2	10,9	10,7
VAL	4,1	3,5	3,9	4,3	4,0
LEU	4,1	3,4	3,9	4,8	4,5
PHE	traces	traces	traces	traces	1,5
LYS	2,2	2,1	1,9	1,9	2,1
HIS	2,2	2,0	2,2	2,5	2,1
ARG	2,8	2,6	2,0	2,6	2,3
A.A. totaux ^(b)	12,3	10,6	10,8	11,8	11,3

(a) Résultats exprimés en résidus d'acides aminés pour 100 résidus.

(b) Résultats exprimés en grammes d'acides aminés pour 100 g de glycopeptides (poids sec).

(c) Nombre de résidus détruits en milieu alcalin.

Les résultats obtenus sur les mucines natives sont confirmés en ce qui concerne l'absence d'influence de la composition glucidique sur le pourcentage de destruction en milieu alcalin.

Le nombre de branchements est de 23 à 24 pour 100 résidus d'acides aminés dans les glycopeptides solubles dans le Rivanol et de 19 à 21 pour les glycopeptides précipités au Rivanol.

Le calcul du nombre moyen d'acides aminés entre deux points d'attache confirme également les valeurs trouvées sur les mucines, soit : 3 résidus d'acides aminés pour les glycopeptides solubles et 4 résidus d'acides aminés pour les glycopeptides précipités par le Rivanol.

b) Etude chromatographique des glycopeptides après traitement par la soude 0,5 N

Avant traitement par la soude 0,5 N, 24 heures, à température du laboratoire, les préparations des différents glycopeptides obtenus sur colonne de DEAE-Sephadex A-25 sont soumises à une filtration sur colonne de Sephadex G-100. Le dosage des oses à l'orcinol nous permet de distinguer deux fractions, l'une exclue du gel de Sephadex, l'autre légèrement retardée.

BHARGAVA et GOTTSCHALK (119) ont signalé la possibilité d'un rendement faible des glycopeptides de faible taille dans l'estimation des liaisons alcali-labiles par traitement alcalin. Nous n'avons donc retenu dans ce protocole expérimental que la fraction exclue après action de la soude et déposée sur la même colonne de Sephadex G-100. Le diagramme obtenu s'avère très différent de celui du premier fractionnement. Il nous montre en effet deux fractions : l'une de faible taille, l'autre exclue du gel de Sephadex. (figure 15)

La fraction nettement retardée est riche en glucides (réaction à l'Orcinol). Elle possède un pouvoir réducteur et réagit également au dosage à la ninhydrine. L'application de la méthode de REISSIG et al. (120) préconisée par ANDERSON - BRAY (121) permet aussi d'y déceler la présence de chromogènes réagissant avec le réactif d'Ehrlich et formés sans chauffage préalable. Cette fraction correspond à un ensemble de composants de faible taille moléculaire : glycannes, peptides interglycannes. Nous avons tenté et obtenu la séparation de ces composants par chromatographie sur Biogel P 10. Il est alors possible par dosage à l'orcinol et dosage à la ninhydrine de séparer les glycannes de la fraction ninhydrine positive qui est retardée. La séparation peut être complétée par passage sur Biogel P4.

Il nous est donc possible d'envisager que le matériel orcinol positif correspond aux chaînes glycanniques libérées par traitement alcalin au moment de la rupture de la liaison et que les composants réagissant à la ninhydrine sont de nature polypeptidique. Devant les quantités faibles de produit dont nous disposions, nous n'avons pu doser de manière rigoureuse les acides aminés libérés par hydrolyse chlorhydrique des petits peptides. Nous avons toutefois pu identifier sur auto-analyseur Technicon la présence de proline en quantité importante, ainsi que celle de la sérine. A un moindre titre, la thréonine, le glyocolle et l'alanine ~~sont~~ retrouvés.

La fraction exclue du gel de Sephadex G-100 possède une composition tout à fait comparable à celle de l'ensemble des glycopeptides solubles dans le Rivanol.

Il nous est donc possible de penser que ces glycopeptides théoriquement sensibles au mécanisme de β -élimination n'ont pas été modifiés.

GLYCOPEPTIDES DU MUCUS FIBRILLAIRE SOLUBLES DANS LE RIVANOL

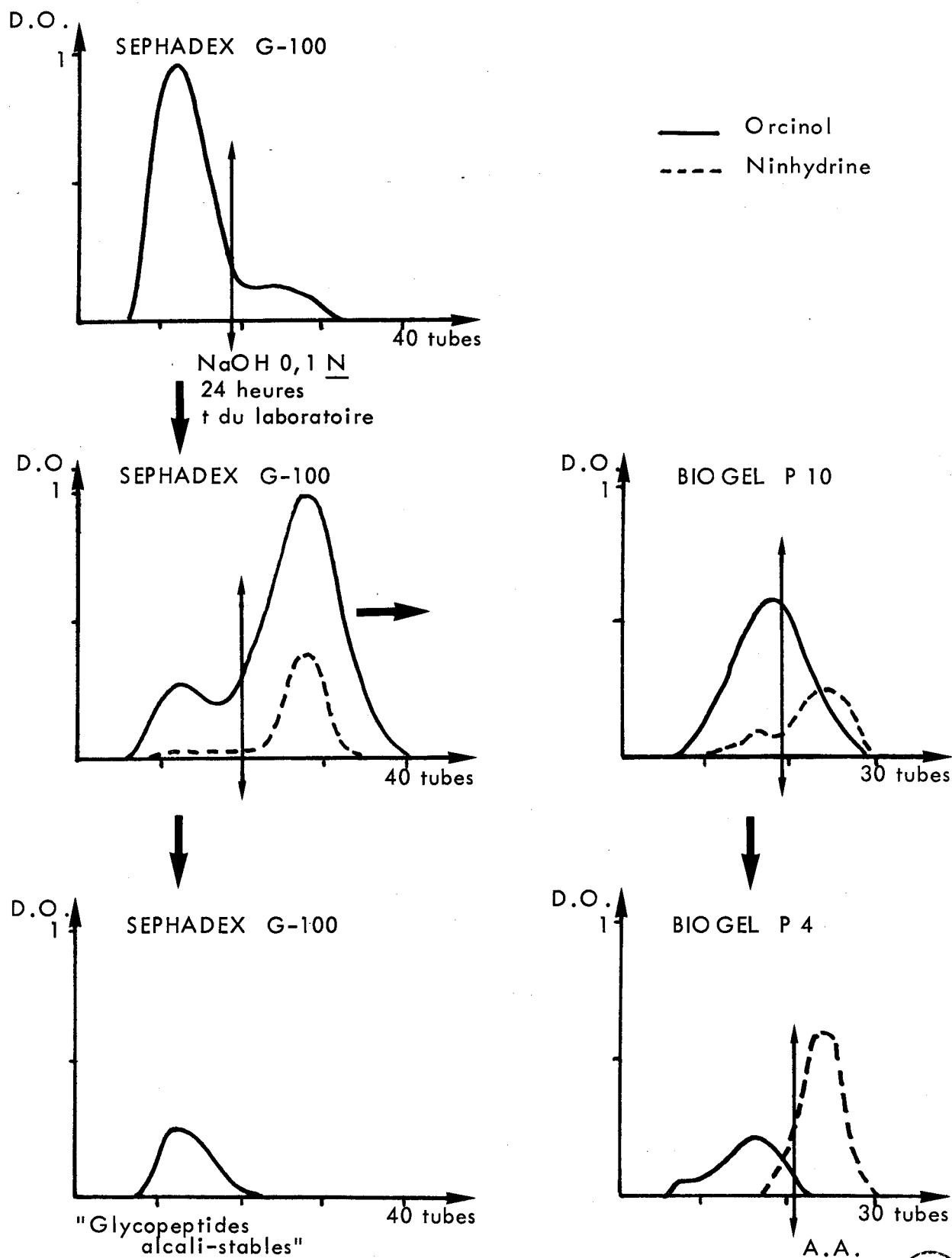


Figure 15

La même expérience a été réalisée sur une mucine native ; la fraction résistante isolée par chromatographie sur Biogel P 100 a fait l'objet d'une étude de sa composition en acides aminés. Sur la base du calcul de 100 résidus d'acides aminés, on dose 23 résidus de thréonine, 9,3 résidus de sérine et 17,2 résidus de proline. Les pourcentages des résidus d'acide glutamique et d'acide aspartique ne sont pas augmentés par rapport à ceux de la mucine native étudiée. Les glycanes du résidu alcali-stable ne semblent pas non plus différents si l'on considère le rapport glucosamine/galactosamine égal à 2,04 qui est voisin de celui de la préparation de départ : 2,27. Le seul élément à retenir qui aurait pu intervenir et limiter le rendement du traitement par la soude est la richesse en proline de cette fraction. Nous reverrons ce problème au cours de l'étude des glycopeptides préparés à partir des mucines purifiées.

A travers ces différents résultats, il est donc possible de considérer que le pourcentage d'hydroxy-amino-acides détruits dans les conditions expérimentales retenues, ne reflète pas la totalité des résidus de thréonine et de sérine engagés dans les liaisons glycanne-protéine.

2) Etude des glycopeptides préparés à partir des mucines purifiées

C'est dans le double but d'étudier d'une part la répartition des glycanes le long du squelette polypeptidique des mucines et d'autre part de préciser l'homogénéité de ces chaînes glycaniques que nous avons été conduits à préparer par protéolyse les glycopeptides des mucines purifiées.

a) Préparation des glycopeptides de mucines bronchiques

100 mg de mucine purifiée sont dissous à raison de 10mg/ml dans le tampon phosphate 0,01 M, pH 6,5. Une première étape de protéolyse est poursuivie pendant 24 heures à 37 °C. L'enzyme utilisé est la mercuripapaïne Worthington activée par addition d'une goutte de BAL (dimercapto-2,3-propanol-1) dans le milieu. Le rapport enzyme/substrat adopté est de 1 p. 100. Après recharge d'une quantité équivalente de papaïne, l'hydrolyse est prolongée pendant 24 heures.

Le pH de l'hydrolysate est amené à la valeur de 7,3 avec une solution de Tris (2-amino-2(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol) concentrée. La solution est enrichie en acétate de calcium, à la concentration finale de 0,01 M. La pronase est ensuite ajoutée avec un rapport enzyme/substrat de 1/40. L'hydrolyse dure 24 heures et après recharge d'une même quantité d'enzyme, elle est prolongée 24 à 48 heures à 37 °C.

Le protéolysate papaïne 48h - pronase 48 h est centrifugé à 3.000 tours/minute pendant 10 minutes. Le très faible précipité correspondant à un matériel résistant à la protéolyse est éliminé.

Le surnageant est précipité par quatre volumes d'éthanol absolu. Cette précipitation une nuit à +4 °C nous permet d'éliminer les acides aminés ou peptides libérés pendant la digestion enzymatique. Nous avons pu vérifier par chromatographie de gel-filtration sur Sephadex G-15 que le surnageant éthanolique correspondant à des éluats de faible taille moléculaire qui réagissent intensément à la réaction à la ninhydrine. Le précipité éthanolique après plusieurs lavages par l'alcool est centrifugé, repris dans l'eau distillée et lyophilisé.

Une deuxième étape dans l'obtention de glycopeptides de mucines peut suivre la protéolyse papaïne-pronase. Sur cet hydrolysat, nous avons fait agir successivement un mélange de carboxypeptidases A et B, puis l'aminopeptidase M;

1°) Hydrolyse par un mélange de carboxypeptidases A et B

40 mg de glycopeptides papaïne (48 h) - pronase (48 h) sont repris dans 1 ml d'acétate d'ammonium 0,1 M, de pH 7,5. A cette solution est ajoutée le mélange des carboxypeptidases A et B en solution dans le chlorure de lithium à 10 p.100.

Les carboxypeptidases sont ajoutées sous un volume de 80 μ l contenant :

- 20 μ l de solution de carboxypeptidase A, soit 1 mg
- 10 μ l de solution de carboxypeptidase B, soit 0,2 mg
- 50 μ l de chlorure de lithium à 10 p.100

(mélange préparé la veille et laissé à +4°C avant l'emploi).

L'hydrolyse enzymatique dure 24 heures à 38°C. On arrête l'hydrolyse par addition de quelques gouttes d'acide formique et on congèle immédiatement avant de lyophiliser.

2°) Hydrolyse par l'aminopeptidase M

Le lyophilisat "carboxypeptidase" est repris dans 1 ml de bicarbonate d'ammonium 0,1 M, pH 8,0 ajusté avec HCl. 600 γ d'aminopeptidase sont ajoutés directement et correspondent à un rapport enzyme/substrat de 1/60. On laisse le mélange incubé à 38°C pendant 24 heures.

b) Homogénéité des glycopeptides obtenus par protéolyse des mucines

Les glycopeptides préparés par action successive de la papaïne, de la pronase, des carboxypeptidases A et B et enfin de l'aminopeptidase M (glycopeptides PPCA) ont été étudiés sur le plan de leur taille moléculaire, et sur le plan de leur composition glucidique après fractionnement sur colonne d'échangeur ionique.

1°) Protocole expérimental

- Chromatographie de gel-filtration sur Sephadex G-15

Les glycopeptides PPCA repris dans l'eau distillée sont déposés sur une colonne de Sephadex G-15 (160x1,8 cm) équilibrée en eau distillée.

L'élution est suivie par dosage à l'orcinol des fractions recueillies sur collecteur. Nous pouvons distinguer deux groupes de composants. Le premier pic correspond à un matériel dont l'élution est à la limite de l'exclusion. La seconde fraction mal séparée de la première possède une taille moléculaire légèrement inférieure. Nous pouvons de cette étude retenir que le glycopeptide obtenu par protéolyse des mucines possède un poids moléculaire inférieur à la limite d'exclusion du gel de Sephadex G-15.

- Chromatographie d'échange ionique des glycopeptides de mucine

La chromatographie d'échange ionique est effectuée sur DEAE-Sephadex A 25 selon un gradient discontinu dont nous avons déjà décrit les conditions expérimentales.

Nous rapporterons successivement les résultats obtenus à partir de protéolysats d'une sialomucine de kyste bronchogénique et de mucines de sécrétions bronchiques.

2°) Résultats

- Glycopeptides d'une sialomucine de kyste bronchogénique
30 mg de protéolysat papafne (48h) - pronase (48h) sont déposés sur une colonne de DEAE-Sephadex A-25. La courbe du dosage à l'orcinol nous permet de suivre l'élution des glycopeptides. Chacun des éluats est précipité par l'éthanol, repris dans l'eau distillée et lyophilisé.

Les glycopeptides sont retrouvés pour :

- . 83 p. 100 du matériel déposé dans l'éluat 0,3 M NaCl HCl 0,01 N
- . 12 p. 100 dans l'éluat suivant : 0,5 M NaCl HCl 0,01 N
- . 4,8 p. 100 en 0,1 M NaCl

La composition des glycopeptides majeurs élués en 0,3 M NaCl est sensiblement la même que celle de la mucine native. Il faut toutefois noter une légère diminution du taux d'acide sialique, en rapport peut-être avec les passages successifs sur échangeur d'ions et aussi en relation avec la durée (2 jours) de la protéolyse.

Tableau XXVIII

Composition glucidique de la mucine native et des glycopeptides isolés

	Mucine native	Glycopeptides 0,3 <u>M</u> NaCl
Hexoses	25 (*)	24,9
Hexosamines	25,9	24,9
Fucose	6,2	7,3
Acide sialique	21,1	16,1
Sulfate	3,3	1

(*) Résultats exprimés en pourcentage du poids sec.

- Glycopeptides de mucines bronchiques

Trois mucines ont pu être étudiées selon le même protocole : il s'agissait des mucines de l'expectoration d'un malade de groupe sanguin O (CHA...)

- Glycopeptides de la mucine 0,1 M NaCl

La mucine 0,1 M NaCl correspond à une fucomucine en fonction du taux élevé de fucose (18,7 p.100) ; elle possède cependant un caractère sialidé : l'acide sialique représente 4,7 p.100 du poids sec.

Le diagramme obtenu par passage sur DEAE-Sephadex de l'hydrolysât papaïne-pronase permet de montrer le caractère homogène des glycopeptides. Il est possible toutefois de noter un faible pourcentage de glycopeptides élués en 0,3 M NaCl (5 p.100 de l'ensemble).

Tableau XXIX

Composition glucidique de la mucine native et des glycopeptides isolés

	Mucine native	Glycopeptide 0,1 <u>M</u> NaCl 95 % (*)	Glycopeptide 0,3 <u>M</u> NaCl 5 %
Fucose	18,7 % (**)	17,4	12,8
Acide sialique	4,7 %	3,4	5,1

(*) Pourcentage de chaque fraction

(**) Résultats exprimés en pourcentage du poids sec.

Il y a donc une population relativement faible de glycopeptides fortement sialidés et possédant un pourcentage de fucose nettement moindre et différent de celui trouvé pour la mucine native.

- Glycopeptides des mucines 0,3 M (a) et 0,3 M (b)

Dans les mucines de caractère sialidé, cette hétérogénéité apparaît plus nettement encore. Bien que le pic majeur obtenu corresponde aux glycopeptides ayant une composition glucidique proche de celle de la mucine native, il existe une répartition dans les tampons d'élution voisins : 0,1 M NaCl essentiellement et à un moindre titre 0,5 M NaCl HCl 0,01 N.

Tableau XXX

Composition des glycopeptides préparés à partir d'une mucine purifiée

	Mucine native 0,3M (a)	Glycopeptides élués de la colonne de DEAE-Sephadex		
		0,1M NaCl 80 % (*)	0,3M NaCl 18 %	0,5M NaCl 2 %
Fucose	15,6 (**)	15,1	13,3	N.D.
Ac.sialique	9,0	4,7	6,9	N.D.
	0,3M(b)	70 %	25 %	5 %
Fucose	13,6	15,8	12,8	N.D.
Ac.sialique	9,1	5,8	7,5	3,6

(*) Pourcentage de chaque fraction.

(**) Résultats exprimés en pourcentage du poids sec.

Il est certain que l'interprétation de ces résultats doit prendre en considération une désialidation partielle toujours possible lors du passage sur échangeurs d'ions. Toutefois, nous pouvons noter que la différence de composition ne touche pas uniquement le problème de l'acide sialique. Les mêmes constatations peuvent être faites sur la variation relative du taux de fucose.

En fonction de ces résultats, il est possible de concevoir que

la mucine native de haut poids moléculaire, correspond à l'association d'un certain nombre d'unités glycopeptidiques qui peuvent varier dans des limites d'ailleurs étroites sur le plan de leur composition en glucides combinés. Les valeurs trouvées concernant le taux de galactose ou d'hexosamine et concernant le rapport $\text{GlcNH}_2/\text{Gal NH}_2$ sont constantes d'un glycopeptide à l'autre. Seule donc la partie périphérique du glycanne est sujette à des variations pour lesquelles la possibilité d'une action enzymatique in vivo ne peut être éliminée. Notons cependant que la sialomucine de kyste bronchogénique qui provient donc d'un matériel stérile prélevé chirurgicalement, possède une certaine hétérogénéité.

Une seconde hypothèse pouvait être avancée, hypothèse selon laquelle la cellule sécrétrice produit une mucine dont la définition peut varier en fonction d'une régulation intra ou extracellulaire.

Cette hypothèse a soulevé le problème de la dynamique de la sécrétion des mucines. Nous avons pu aborder cet aspect par l'étude en microscopie électronique du matériel sécrété au niveau des éléments séreux et muqueux. Rappelons que cette étude nous a permis de saisir des différences nettes dans la densité des globules de mucus vis-à-vis des électrons. La caractérisation des glycanes en microscopie électronique accuse encore cette hétérogénéité intracellulaire et saisit des différences entre les cellules d'une même glande muqueuse. Il est donc possible d'envisager que ces grains de mucus sont légèrement différents les uns des autres et que la variation de l'intensité du marquage reflète leur composition glucidique et en particulier le taux de sialidation de l'extrémité périphérique des glycanes.

Nous pouvons donc admettre une microhétérogénéité du matériel synthétisé par les éléments glandulaires. Ces variations ne

semblent pas toucher la partie profonde du glycanne (rapport glucosamine/galactosamine, rapport oses/osamines). On ne peut toutefois ignorer le fait que les mucines isolées qu'elles soient sialidées, sulfatées ou riches en fucose représentent l'ensemble du matériel sécrété le long de l'arbre trachéo-bronchique. Il est possible de penser qu'il existe une certaine spécificité d'étage comme on la rencontre au niveau du tractus digestif. (absence de mucines sulfatées au niveau de la muqueuse gastrique, sialidation progressive des mucines le long de l'intestin grêle).

D) ETUDE DES GLYCANNES D'UN GLYCOPEPTIDE DE MUCINE
RICHE EN FUCOSE ET POSSEDANT UNE ACTIVITE DE
SUBSTANCE DE GROUPE SANGUIN H

Nous avons utilisé le glycopeptide obtenu par protéolyse couplée par la papaïne 48 heures et par la pronase 48 heures d'une fucomucine purifiée. La composition en acides aminés et en glucides combinés est présentée dans le Tableau XXXII . Les résultats sont exprimés en prenant l'acide glutamique comme base 1. Ce mode de présentation nous permet de suivre toutes modifications du glycopeptide au niveau de l'axe peptidique (traitement alcalin, dégradation d'Edman) ou au niveau des chaînes glycaniques (oxydation périodique).

1) Traitement alcalin

Ce glycopeptide de faible taille moléculaire a été soumis au traitement alcalin dans les conditions déjà utilisées pour les mucines : NaOH 0,5 N, 24 heures, à température du laboratoire.

Le pourcentage de destruction des acides aminés hydroxylés est de 38,06 pour 100 pour la thréonine et 54,78 pour 100 pour la sérine, ce qui représente une destruction de 4 à 5 résidus de thréonine sur 10 et 2 à 3 résidus de sérine sur 5. Le nombre d'acides aminés étant de 32 en prenant l'acide glutamique comme base 1, il existerait donc sur ce peptide 6 à 8 branchements glycanne-peptide.

Le calcul du pourcentage de destruction de la galactosamine : 47,91 p.100 est également intéressant. En effet, dans la composition du glycopeptide natif pour glutamine base 1, il y a 37 glucosamines, 14 galactosamines, le rapport glucosamine/galactosamine étant égal à 2,58. Sur ces 14 galactosamines, la moitié est détruite par la soude 0,5 N, soit 7 galactosamines. Cette valeur obtenue confirme les résultats déjà avancés concernant le nombre de branchements sur le squelette peptidique. Cette dégradation des galactosamines et l'apparition de chromogènes de Kuhn après traitement alcalin nous permettent de préciser que la fonction réductrice du résidu de galactosamine non substitué en 4 est engagé avec l'hydroxyle de la thréonine ou de la sérine.

Admettant cette notion de 7 branchements, il est alors possible de calculer le nombre de glucides combinés par chaînes à partir de la composition du glycopeptide natif.

Le glycopeptide comporterait donc 7 chaînes glycaniques : (tableau XXXI).

Cette hypothèse ne pourra être admise qu'après étude de l'enchaînement des glucides combinés. Elle est toutefois compatible avec la structure donnée par KABAT (122) pour les chaînes glycaniques d'activité H.

Tableau XXXI

	Valeurs théoriques		Valeurs trouvées	
7 galactoses par chaîne	49		49,73	
5 glucosamines par chaîne	35	49	37	50,83
2 galactosamines par chaîne	14		14	
5 chaînes ¹ acide sialique	5		4,91	
avec 5 fucoses	25	37	39,57	
2 chaînes	12			
avec 6 fucoses				

2) Oxydation periodique

C'est dans le but de comparer la structure glycannique de notre glycopeptide avec celle proposée par KABAT que nous avons entrepris cette étude.

a) Conditions opératoires

150 mg de glycopeptides sont dissous dans 75 ml d'eau distillée. A cette solution de glycopeptides sont ajoutés 75 ml de IO_4Na 0,02 M.

Le pH du mélange réactionnel est ajusté entre les valeurs de 4,0 et 4,5. La consommation de métaperiodate de sodium est suivie par lecture de la densité optique à 310 nm.

Variations de la densité optique du mélange glycopeptides -
métaperiodate en fonction du temps

Glycopeptides 0,050 (*)

Glycopeptide + métaperiodate :

Temps	0	0,800
	1 h	0,560
	2 h	0,540
	3 h	0,560
	5 h	0,560
	24 h	0,560

(*) Lecture contre un témoin eau distillée.

L'excès de métaperiodate non consommé est détruit par addition d'éthylène-glycol. La lecture au spectrophotomètre à 310 nm nous renseigne sur la quantité à ajouter. L'addition est faite goutte à goutte sous agitation, jusqu'au retour de la densité optique à la valeur de départ, soit 0,050.

La solution est ensuite laissée une nuit à +4°C, sous agitation, en présence de borohydrure 0,21 M, en concentration finale.

Le pH de la solution est amené à la valeur de 1 avec H_2SO_4 2 N. L'hydrolyse acide est poursuivie 20 heures à température du laboratoire. Après concentration sur évaporateur rotatif, les glycopeptides sont déposés sur une colonne de Sepharose G-15 (160x1,8cm) équilibrée en eau distillée. La fraction exclue repérée par dosage à l'orcinol sulfurique est lyophilisée. Le bilan des glucides combinés est effectué ainsi que la composition en acides aminés à partir de la poudre sèche.

A ce stade, nous pouvons commencer une deuxième étape

Tableau XXXII

Etude de l'oxydation periodique de glycopeptides (papaine 48 h -
pronase 48 h) d'une fucomucine d'activité H

Glycopeptide natif			Glycopeptide après 1 étape d'oxydation periodique	Glycopeptide après 2 étapes d'oxydation periodique
Résidus p. 100 résidus	GLU base 1		GLU base 1	GLU base 1
ASP	1,76	0,57	0,47	0,40
THR	30,30	9,91 (4 à 5)*	10,85	9,87
SER	15,84	5,18 (1 à 3)*	5,21	4,76
GLU	3,06	1	1	1
PRO	13,53	4,42	3,81	3,27
GLY	6,61	2,16	2,16	1,94
ALA	10,19	3,33	3,43	3,05
VAL	3,99	1,30	1,42	1,13
ILE	2,16	0,71	0,77	0,71
LEU	3,88	1,27	1,61	1,41
LYS	2,03	0,66	0,45	0,26
HIS	2,63	0,86	0,81	0,65
ARG	4,00	1,31	0,96	0,58
Glc NH ₂	2,58	4,43	2,58	1,88
Gal NH ₂				
Galactose		49,73	24,94	23,88
Glucosamine	50,83	37	48,22	25,52
Galactosamine		14 (7)*		
Fucose		39,57	2,28	0,71
Ac.sialique		4,91	0,91	0,63
Sulfate		0	0	0

(*) Nombre de résidus de thréonine, de sérine, de galactosamine
détruit par traitement alcalin.



d'oxydation periodique en reprenant le même protocole opératoire.

b) Résultats

Les résultats sont présentés dans le tableau XXXIII.

Nous pouvons noter que la quasi-totalité de l'acide sialique et du fucose a été éliminée, ainsi que la moitié du galactose.

La deuxième étape d'oxydation periodique ne montre pas de modifications concernant le galactose, mais nous pouvons constater sur le plan des hexosamines que la moitié des osamines a été éliminée et que le rapport glucosamine/galactosamine est passé de la valeur de 2,58 à 1,88.

c) Discussion des résultats

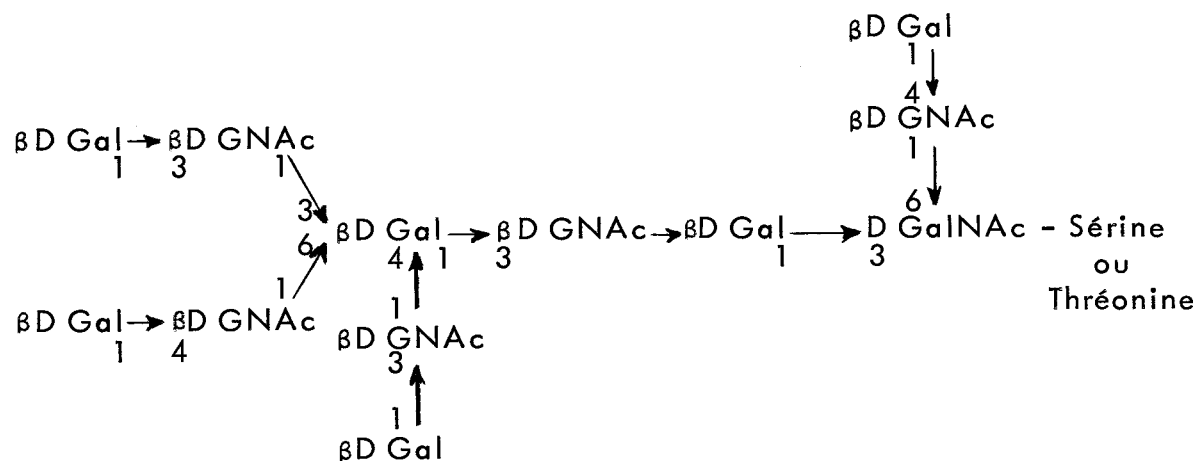
VICARI et KABAT (122) ont présenté la synthèse de nombreux travaux concernant les oligosaccharides et les glycoprotéines à activité de groupe sanguin sous forme d'un schéma structural d'ensemble du glycanne responsable de l'activité de groupe sanguin H. (figure 15)

En fonction de nos résultats et par analogie avec ces différents travaux, nous avons fait figurer une hypothèse concernant la structure éventuelle du glycanne des fucomucines isolées du mucus bronchique.

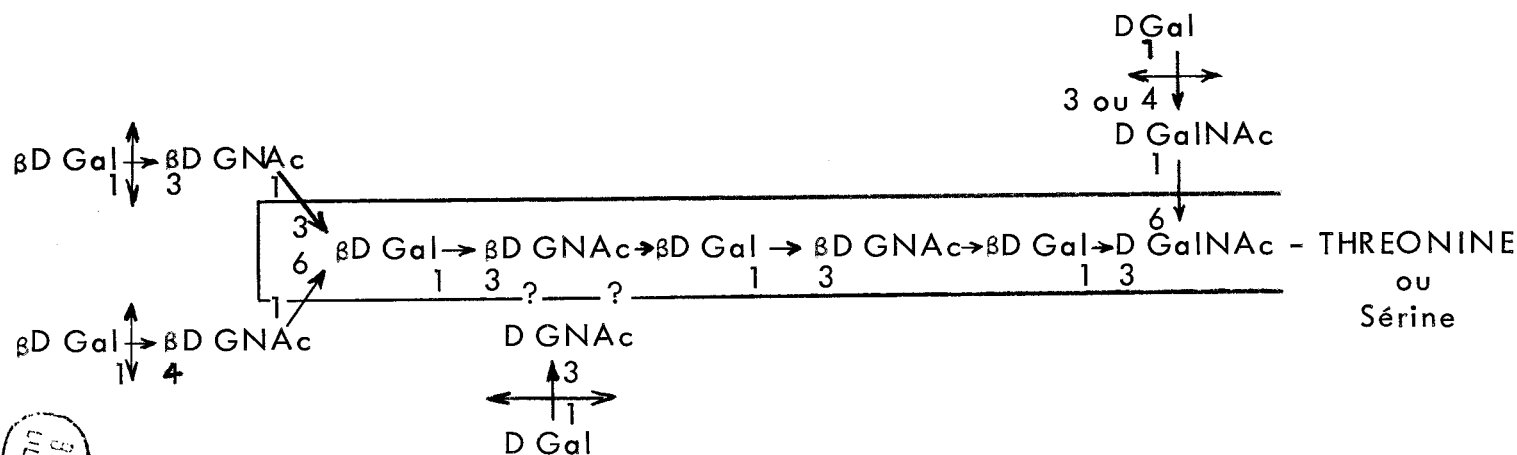
Nous y avons représenté les points de coupures de l'oxydation periodique. Il est certain que cette présentation n'a de valeur que celle d'une réflexion au cours d'un travail.

Tableau XXXIII

Structure proposée par VICARI et KABAT : Biochemistry, 9, 17, 3414 (1970)



Hypothèse concernant la structure du glycanne de fucomucine bronchique (CHA...)



E) ETUDE DE LA SEQUENCE AU VOISINAGE DU POINT D'ATTACHE GLYCANNE-PROTEINE

Cette partie de notre travail a été réalisée en deux étapes et sur deux glycopeptides provenant l'un de la sialomucine de kyste bronchogénique, l'autre de la fucomucine dont nous avons également étudié la partie glycanique.

1) Etude du sialoglycopeptide

a) Préparation et composition en acides aminés

Le glycopeptide (PPCA) a été préparé par protéolyse de la sialomucine en faisant intervenir successivement la papaïne, la pronase, l'aminopeptidase M et les carboxypeptidases A et B.

En comparant la composition en acides aminés de la mucine native et celle du glycopeptide (tableau XXXIV), nous sommes amenés à faire plusieurs remarques :

1°) Disparition des acides aminés basiques (LYS, HIS, ARG), de la phénylalanine, diminution de la leucine.

2°) Enrichissement très net de la composition en THREONINE et en PROLINE qui nous conduit à ce stade à envisager la proximité de ces deux amino-acides.

3°) Relation possible entre le nombre de résidus de proline et le nombre de résidus de thréonine engagés dans les liaisons glycanne - protide : 8 prolines pour 6 thréonines détruites en milieu alcalin dans les conditions expérimentales utilisées. La même remarque peut être faite en ce qui concerne le glycocolle et la sérine.

Tableau XXXIV

Dégradation enzymatique d'une sialomucine de kyste bronchogénique
(papaïne - pronase - aminopeptidase M - carboxypeptidases A et B)

	Mucine native (résidus p. 100AA)	Glycopeptides PPCA (résidus p. 100 AA)	ASP base 1
ASP	4,2	2,7	1
THR	31,9(11)(*)	<u>41,2</u>	<u>15,4(6)(*)</u>
SER	11,8(6)(*)	<u>10,1</u>	<u>3,8(2)(*)</u>
GLU	5,2	4,7	1,7
PRO	14,6	<u>21,4</u>	<u>8</u>
GLY	8,6	6,9	2,5
ALA	5,0	3,4	1,3
VAL	4,5	3,9	1,4
ILE	3,3	3,8	1,4
LEU	2,7	1,9	0,9
PHE	2,3	-	
LYS	1,2	-	<u>soit 37 résidus</u>
HIS	2,0	-	<u>d'acides aminés</u>
ARG	1,7	-	
A.A. totaux	21 g p. 100		
A.A. N-terminal	ARG	ASP	

(*) Nombre de résidus d'acides aminés hydroxylés détruits par traitement alcalin.



4°) Le nombre d'acides aminés interchaînes ne peut excéder la valeur de 3 si l'on considère une répartition moyenne sur les 37 résidus.

b) Séquence N-terminale déterminée par dégradation d'Edman et identification des acides aminés N-terminaux par méthode de dansylation

La séquence des acides aminés a été réalisée par dégradation récurrente d'Edman dont les conditions opératoires sont exposées dans l'Appendice Technique.

La séquence obtenue par quatre cycles d'Edman est la suivante :

N-terminal ASP - PRO - X - SER - PRO ·····

Après deux cycles d'Edman, il ne nous a pas été possible d'identifier l'acide aminé par méthode de dansylation.

Nous avons déjà rencontré les mêmes difficultés sur la mucine native dont la séquence N-terminale est :

ARG - PRO - X ·····

Toutefois, au cycle suivant, on voit apparaître le dérivé dansylé de la thréonine et aussi une dansyl-osamine.

Cette technique ne nous permettait donc pas d'identifier avec certitude l'acide aminé situé au voisinage immédiat de la proline et ceci nous a conduit à coupler la dégradation d'Edman à l'étude de la composition en acides aminés.

2) Etude du fucoglycopeptide

La séquence N-terminale du glycopeptide de fucomucine a

été déterminée par couplage Edman-chromatographie en acides aminés différentielle. Les résultats sont présentés en prenant l'acide glutamique comme base 1 : (tableau XXXV).

Tableau XXXV

	Glycopeptide de départ	Après 1 cycle d'Edman	Après 2 cycles d'Edman	Après 3 cycles d'Edman
ASP	0,57	1,05	0,78	0,71
THR	9,91	9,61	<u>8,51</u>	9,04
SER	5,18	4,60	5,40	5,36
GLU	1	1	1	1
PRO	4,42	<u>3,35</u>	3,55	3,14
GLY	2,16	2,07	2,64	2,54
ALA	3,33	3,12	3,09	3,16
VAL	1,30	1,21	1,11	1,25
ILE	0,71	0,70	0,68	0,69
LEU	1,27	1,43	1,20	1,37
LYS	0,66	0,64	0,55	0,46
HIS	0,86	0,83	0,82	0,90
ARG	1,31	0,90	1,31	<u>0,57</u>

La séquence obtenue a été complétée par dansylation du composant résiduel après trois cycles. L'acide aminé identifié était la proline.

La séquence ainsi établie pour ce glycopeptide correspond donc à l'enchaînement :

PRO - THR - ARG - PRO

3) Discussion des résultats obtenus

La dégradation récurrente d'Edman couplée à l'analyse différentielle des acides aminés permet d'identifier l'acide aminé engagé dans la liaison PRO-X à la thréonine. L'identification de l'arginine libérée au cours du cycle suivant confirme que la dégradation se poursuit. Il en est de même pour la première séquence où l'absence de dérivé fluorescent ne signifie pas un arrêt de la dégradation récurrente qui se poursuit là aussi au cycle suivant par une libération de dansyl-sérine.

Ces résultats suggèrent que la liaison glycanne-O-thréonine n'arrête pas la dégradation récurrente du peptide, mais que le produit libéré n'est pas fluorescent ou ne peut être caractérisé dans nos conditions opératoires. Il est possible que comme pour la DNS-carboxy-méthyl-méthionine, le dansyl-thréonine-O-glycanne perde ses caractères habituels de fluorescence jaune et demeure dans la fraction glycopeptidique résiduelle.

Nous avons tenté de démontrer la perte du glycanne à ce stade de la dégradation récurrente, mais la destruction importante d'osamines qui intervient au cours de chaque cycle de dégradation ne nous a pas permis d'obtenir un argument définitif traduisant l'élimination d'un dansyl-dérivé du glyco-amino-acide. L'apparition, au cycle qui suit l'élimination muette de thréonine, d'une faible trace de dansyl-thréonine et d'une dansyl-osamine accompagnant la caractérisation du dansyl-amino-acide suivant, nous oriente vers l'hypothèse d'une coupure partielle de la liaison O-glycosidique dans les conditions opératoires utilisées.

Ces résultats nous amènent à envisager que la dégradation d'Edman peut être aussi précieuse dans l'exploration des modalités

de la liaison O-glycosidique que dans celle des glycopeptides dans lesquels la liaison aspartyl-glycane se trouve en position N-terminale. Elle réalise en effet la dégradation récurrente de la fraction peptidique par l'extrémité N-terminale et peut libérer l'acide conjugué au glycane en respectant la liaison O-glycosidique. Il est probable que l'isolement du glyco-amino-acide libéré pourra être entrepris et qu'une hydrolyse acide ménagée (HCl N, 1 à 2 heures) permettra d'obtenir l'osamine conjuguée à la dansyl-thréonine.

Nous n'avons pu obtenir la séquence intéressant la liaison sérine-O-glycosidique dans les mucines bronchiques. Dans la mucine sous-maxillaire bovine, OZEKI et YOSIZAWA (123) ont rapporté les séquences suivantes :

séryl - sérine , glycyl - sérine et séryl - thréonyl - glycyl - sérine
 ↑ ↑ ↑ ↑
 galactosamine galactosamine galactosamine galactosamine

PIGMAN (124) et HASHIMOTO (125) pour un glycopeptide de mucine sous-maxillaire bovine représentant une séquence de 28 amino-acides, propose la séquence suivante pour l'extrémité N-terminale : GLY - SER - SER - (GLY , THR).

Ils ont pu également isoler un glycopeptide de faible taille moléculaire dont ils libèrent 0,58 mole de thréonine, 0,56 mole de sérine, 0,56 mole de glycine, 0,47 mole de proline et 0,131 mole d'alanine par mole d'acide sialique ou d'hexosamine.

F) CONCLUSIONS

L'étude de mucines bronchiques purifiées nous permet de proposer quelques éléments de structure de ces glycoprotéines de tailles moléculaires voisines de 600.000.

Un axe polypeptidique constitué de 700 à 800 résidus d'acides-amino supporte 150 à 180 glycannes représentés par des chaînes polysaccharidiques de poids moléculaire moyen voisin de 2.600 à 2.800.

Ces glycannes sont unis à l'axe polypeptidique par des liaisons O-thréonyl (60 p.100 environ) et O-séryl (40 p.100) de la galactosamine. Cette répartition peut varier légèrement selon les mucines individuelles étudiées, mais reste toujours nettement en faveur d'une prédominance des liaisons O-thréonyl-galactosaminides.

Cette structure de base reste sensiblement constante d'une classe de mucine à l'autre chez un même individu, les différences d'ordre génétique apparaissant plus importantes que celles en rapport avec le caractère polyanionique plus ou moins marqué des glycannes intéressés dans la structure des diverses classes d'une sécrétion individuelle. Il convient d'ailleurs de préciser que dans toutes les mucines natives actuellement étudiées, l'arginine est toujours identifiée en position N-terminale de l'axe polypeptidique quel que soit le type génétique ou le caractère d'acidité de la classe de mucine étudiée.

La protéolyse enzymatique reste toujours limitée à quelques coupures privilégiées qui apparaissent essentiellement dans des zones

de la chaîne protéique particulièrement riches en acides aminés basiques, en tyrosine et en phénylalanine. Les glycopeptides libérés conservent une distribution moyenne des glycanes sur l'axe peptidique sensiblement comparable à celle des mucines natives. La zone de coupure se situe au voisinage d'un point d'attache du glycanne voisin de l'extrémité N-terminale du peptide, mais laisse persister à l'extrémité C-terminale une séquence de 5 à 6 acides aminés éliminés par l'action des carboxypeptidases A et B et particulièrement riche en acides aminés basiques, en tyrosine et en phénylalanine.

A l'extrémité N-terminale de l'axe protéique d'une mucine native, la séquence suivante peut être proposée :

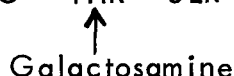
ARG - PRO - THR - (GLY , ALA)

↑
Galactosamine

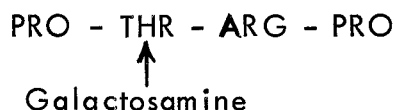
La distribution des glycanes sur l'axe polypeptidique apparaît alors sensiblement homogène. Deux points d'attache successifs ne sont en effet séparés dans l'hypothèse d'une distribution homogène que par une courte séquence de trois résidus d'acides aminés dans laquelle devraient apparaître en fonction des caractéristiques remarquables de composition en acides aminés un résidu de thréonine ou un résidu de sérine, un résidu de proline et l'un des résidus suivants : alanine, glycolle ou acide aminé basique.

Un glycopeptide de taille moléculaire voisine de 25.000 a pu être isolé après protéolyse enzymatique et possède l'acide aspartique en position N-terminale. Pour une séquence minimum de 37 résidus d'acides aminés, 7 à 8 liaisons glycanne-peptide sont caractérisées par traitement alcalin, ce qui reste compatible avec l'hypothèse envisagée d'une distribution d'une liaison glycanne-peptide par séquence de cinq acides aminés.

La séquence N-terminale établie sur ce petit glycopeptide est la suivante : ASP - PRO - THR - SER - PRO



Pour un second glycopeptide isolé de l'hydrolysate enzymatique d'une fucomucine, la séquence suivante est obtenue :



L'hypothèse d'un codage de la conjugaison de la N-acétylglucosamine par la séquence des amino-acides au voisinage du point d'attache a été émise pour la première fois par MONTREUIL en 1964 (126), dans l'étude de glycopeptides de diverses glycoprotéines (orosomucoïde, ovomucoïde, IgG). La séquence au voisinage du point de conjugaison glycane-asparagine est représentée par un tripeptide dans lequel un β -hydroxy-amino-acide se trouve en "position β " de l'asparagine, du côté C-terminal de la chaîne peptidique. Cette "phrase-code" est actuellement retrouvée dans de nombreuses glycoprotéines à liaisons glycane-protide glycosylaminiques.

Une séquence GLY - X - HYL^{*} - GLY - Y - ARG est également identifiée au voisinage du point d'attache du disaccharide glucosyl-galactosyl sur l'hydroxyllysine de glycoprotéines du collagène de la peau de poissons et de divers vertébrés (ISEMURA, IKENAKAT et MASUSHIMA)(127). Ces résultats démontrent qu'un codage particulier au niveau de la séquence peptidique peut intervenir et s'adapter à la nature de la liaison glycane-protéine.

(*) Branchement du polysaccharide.

Les deux séquences obtenues dans les mucines bronchiques suggèrent que pour les liaisons O-glycosidiques intéressant la thréonine la proline en "position β " du côté C-terminal de la chaîne pourrait également remplir ce rôle. La première étape de synthèse d'une chaîne glycanique serait ainsi marquée par la conjugaison d'une N-acétyl-galactosamine sur une thréonine codée par la séquence PRO - THR - X - PRO.

RESUME

La définition des mucines bronchiques peut être abordée par l'étude des hypersécrétions bronchiques en relation avec un état de bronchite chronique ou de sécrétions individuelles d'enfants atteints de mucoviscidose.

Pour éliminer l'influence de la dégradation bactérienne sur les produits de sécrétion stagnant dans l'arbre bronchique, notre étude des hypersécrétions pathologiques porte sur la structure fibrillaire organisée d'expectorations fraîchement émises et débarrassées par lavage à l'eau des produits de dégradation. Ces réseaux fibrillaires perdent leurs propriétés visco-élastiques et libèrent les mucines par une réduction intéressant les protéines du mucus riches en ponts disulfure.

Nous avons retenu également à titre comparatif, dans le cadre de cette étude, les productions épithéliales protégées de toute contamination bactérienne que représentent les sécrétions de kystes bronchogéniques.

Le protocole retenu repose sur une réduction douce du mucus lavé qui permet d'obtenir une solution de faible viscosité. Ce mucus traité par le mercapto-éthanol se prête aisément à l'application des techniques classiques de séparation des glycoprotéines. La comparaison de méthodes de fractionnement fondées sur les différences de point isoélectrique (électrophorèse préparative en film liquide, chromatographie sur colonne d'Ecteola-cellulose) ou de

poids moléculaires des mucines (chromatographie de gel-filtration) nous conduit à retenir un couplage de la chromatographie d'échange ionique sur colonne d'Ecteola-cellulose et d'une gel-filtration sur Sepharose 2B.

Après vérification de la pureté des préparations (électrophorèse, ultracentrifugation, détermination de l'acide aminé en position N-terminale), la composition de la copule glucidique et de la fraction peptidique peut être déterminée.

L'arginine est toujours identifiée en position N-terminale. Un poids moléculaire de 600.000 est obtenu pour une mucine riche en fucose d'activité H.

Les variations de composition des chaînes glycaniques nous amènent à retenir une classification en trois groupes par l'étude des trois variables que représentent le fucose, l'acide N-acétyl-neuraminique et les groupes sulfate. Le caractère "sialidé" ou "sulfaté" des mucines semble faire disparaître l'activité de substance de groupe sanguin de ces molécules. L'étude de l'incorporation du radio-sulfate permet de localiser la sulfotransférase dans les acini séreux des glandes mixtes.

En ce qui concerne la fraction peptidique, un certain nombre de caractères essentiels peuvent être dégagés de l'ensemble des résultats obtenus sur 18 préparations homogènes étudiées :

- Richesse en thréonine (27 à 29 résidus pour 100 acides aminés).
- Richesse en sérine (16 à 18 résidus pour 100 acides aminés).
- Richesse en proline (11 à 13 résidus pour 100 acides aminés).

Par ordre d'importance, on trouve ensuite l'alanine

(9 à 10 résidus) et la glycine (7 à 8 résidus).

La richesse de ces glycoprotéines en hydroxy-amino-acides nous a orienté vers la recherche de liaisons glycanne-protéine du type alcali-labile (séryl ou thréonyl-O-glycosidique). Le traitement alcalin de mucines purifiées ou des glycopeptides libérés par action de la papaïne et de la pronase démontre l'existence de 17 à 23 glycanes pour une séquence peptidique de 100 acides aminés. Ces liaisons alcali-labiles intéressent la moitié des résidus de thréonine et le tiers des résidus de sérine. Ce processus de β -élimination entraîne la destruction de la moitié des résidus de galactosamine.

L'étude des glycopeptides permet d'envisager une distribution sensiblement homogène des glycanes sur l'axe polypeptidique : l'espace entre les branchements correspond à 3 ou 4 acides aminés. On peut donc considérer que ces mucines ont une structure dans laquelle la chaîne peptidique est quasi-totalement dissimulée par les multiples chaînes glycaniques (10 à 12 résidus d'oses) fixées à l'axe central par l'intermédiaire de liaisons O-glycosidiques.

La séquence N-terminale d'une fucomucine pure correspond à l'enchaînement ARG - PRO - THR* - (GLY , ALA) ... De plus, des glycopeptides de tailles moléculaires d'environ 25.000 ont été préparés à partir d'une sialomucine et d'une fucomucine. Le glycopeptide préparé à partir de la fucomucine bronchique possède une activité de groupe sanguin O. La dégradation des glycanes réalisée par oxydation periodique démontre une grande analogie de résultats avec le schéma structural proposé par KABAT. Des séquences situées au voisinage de la première liaison glycanne-protéine proche de l'extrémité N-terminale du glycopeptide ont été déterminées :

(*) Point de branchement du polysaccharide.

ASP - PRO - THR^{*} - SER - PRO

PRO - THR^{*} - ARG - PRO

Ces résultats permettent de suggérer qu'il existe une "phrase code" indispensable au branchement des glycanes sur les chaînes peptidiques des mucines : elle serait du type PRO - THR^{*} - X - PRO, X étant un acide aminé "indifférent".

Des "phrases codes" particulières ont été caractérisées pour les liaisons glycosylaminiques. La séquence suivante est actuellement bien établie :

- ASN^{*} - X - THR (ou SER)

Pour une autre liaison O-glycosidique intéressant l'hydroxyllysine, la séquence suivante est proposée :

GLY - X - HYL^{*} - GLY - Y - ARG

Un codage particulier de la séquence peptidique peut donc intervenir et s'adapter à la nature du point d'attache glycanne-protéine.

L'étude d'un plus grand nombre de mucines d'origines différentes permettra sans doute de préciser le rôle de ces résidus de proline dans la première étape de synthèse d'une chaîne glycanne à partir d'un résidu de thréonine.

(*) Point de branchement du polysaccharide.

BIBLIOGRAPHIE

- ABRAMS M.E.
J. Appl. Physiol., 1966, 21, 718. (12)
- ABRAMS M.E. et TAYLOR F.B.
Physiologist, 1964, 7, 78. (13)
- ADAMS J.B.
Biochem. J., 1965, 94, 368. (99)
- ADAMS J.B.
Biochem. J., 1965, 97, 345. (100)(108)
- ANDERSON B., HOFFMAN P. et MEYER K.
Biochem. Biophys. Acta, 1963, 74, 309. (103)
- ANDERSON B., SENO N., SAMPSON P., RILEY J.G.,
HOFFMAN P. et MEYER K.
J. Biol. Chem., 1964, 239, 2716. (114)
- ANDERSON B., HOFFMAN P. et MEYER K.
J. Biol. Chem., 1965, 240, 156. (112)
- ANDERSON-BRAY B., LIEBERMAN R. et MEYER K.
J. Biol. Chem., 1967, 242, 3373. (121)
- ATASSI M.Z., BARKER S.A. et STACEY M.
Clin. Chim. Acta, 1959, 4, 823. (7)
- ATASSI M.Z., BARKER S.A. et STACEY M.
Clin. Chim. Acta, 1962, 7, 588. (8)
- BERTOLINI M. et PIGMAN W.
J. Biol. Chem., 1967, 242, 3776. (101)
- BEYCHOK S. et KABAT E.A.
Biochemistry, 1965, 4, 2565. (61)
- BHARGAVA A.S. et GOTTSCHALK A.
Biochem. Biophys. Acta, 1967, 143, 132. (119)

- BHAVANANDAN V.P., BUDDECKE E., CARUBELLI R. et
GOTTSCHALK A.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1964, 16, 353. (97)(110)(113)
- BISERTE G., HAVEZ R. et CUVELIER R.
Exp. Ann. Biochem. Med., 1963, 24, 85. (9)(11)(21)(35)
- BISERTE G., HAVEZ R., VOISIN C., DELAHOUSSE P.,
CUVELIER R. et GERNEZ-RIEUX Ch.
Lille Méd., 1961, 6, 51. (23)
- BONDURANT S.
J. Clin. Invest., 1960, 39, 973. (19)
- BROGAN T.D.
Biochem. J., 1959, 71, 125. (4)(51)
- BROGAN T.D.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1960, 41, 288. (5)
- BUKANTZ S.C. et BERNS A.W.
J. of Allergy, 1958, 29, 29. (3)(50)
- BURGI H.
Med. Thorac., 1964, 21, 156. (29)
- BURGI H.
Schweiz. Med. Wscht, 1965, 95, 274. (31)
- CARUBELLI R., BHAVANANDAN V.P. et GOTTSCHALK A.
Biochem. Biophys. Acta, 1965, 101, 67. (107)
- CASTELLANI A.A., ZONTA L., BALDUINI C. et LATERZA L.
Experientia, 1966, 22, 225. (102)
- COLLIER H.D.J., HOLGATE J.A., SCHACHTER M. et
SHORLEY P.G.
J. Physiol., 1959, 149, 54. (82)
- CREETH J.M.
Proc. Roy. Soc., 1964, A 282, 403. (59)

- CREETH J.M. et KNIGHT C.G.
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 102, 549. (60)
- CREETH J.M. et PAIN R.H.
Progr. Biophys. Mol. Biol., 1967, 17, 217. (67)(69)
- CURTAIN C.C., MARMION B.P. et PYE J.
Nature, 1953, 171, 33. (2)
- CUVELIER R.
Thèse de Médecine, Lille, 1963. (24)(33)
- DEGAND P.
Thèse de Médecine, Lille, 1964. (32)(39)(41)(84)
- DUCHATELLE P.
Thèse de Médecine, Lille, 1968. (54)
- DUNSTONE J.R. et MORGAN W.T.J.
Biochem. Biophys. Acta, 1965, 101, 300. (63)
- FINLEY T.N., CONLEY G.R., HUGER G.L. et LADMAN A.
Clin. Res., 1966, 14, 365. (14)
- FINLEY T.N., PRATT S.A., LADMAN A.J., BREWER L. et
Mc KAY M.B.
J. Lipid Res., 1968, 9, 357. (17)
- GERNEZ-RIEUX Ch., BISERTE G., HAVEZ R., VOISIN C.,
ROUSSEL P. et DEGAND P.
Acta Tuberc. Pneumol. Belg., 1964, 55, 138. (36)(72)
- GIBBONS R.A.
Biochem. J., 1963, 89, 380. (10)
- GIBBONS R.A.
Glycoproteins, A. GOTTSCHALK Ed. Elsevier, Amsterdam,
1966, 61. (66)
- GIBBONS R.A.
Protides of the Biological Fluids, H. Peeters Ed., 1969, 16, 299.
(62)
- GIBBONS R.A., CREETH J.M. et DENBOROUGH M.A.
Blood and Tissue Antigens, Academic Press, New-York, London,
1970, 307. (58)(68)

- GOTTSCHALK A.
Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1965, 43, 391. (98)
- GREGORY J.D., LAURENT T.C. et RODEN L.
J. Biol. Chem., 1964, 239, 3312. (104)
- HARBON S., HERMAN-BOUSSIER G. et CLAUSER H.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 1279. (105)
- HARBON S., HERMAN G., ROSSIGNOL B., JOLLES P.
et CLAUSER H.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1964, 17, 57. (111)(115)
- HARBON S., HERMAN-BOUSSIER G. et CLAUSER H.
European J. Biochem., 1968, 4, 265. (106)
- HARLAN N.R., MARGRAF J.H. et SAID S.I.
Am. J. Physiol., 1966, 211, 855. (16)
- HASHIMOTO Y., TSUIKI S., NISHIZAWA K. et PIGMAN W.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1963, 106, 233. (125)
- HAVEZ R., ROUSSEL P., DEGAND P. et BISERTE G.
Clin. Chim. Acta, 1967, 17, 281. (37)
- HAVEZ R., MUH J.P., ROUSSEL P., DEGAND P. et
CARLIER C.
C.R. Acad. Sc. Paris, 1966, 262, 1379. (42)
- HAVEZ R., DEGAND P., ROUSSEL P., VOISIN C.,
BISERTE G. et GERNEZ-RIEUX Ch.
C. R. Acad. Sc. Paris, 1966, 262, 1777. (43)(48)
- HAVEZ R., BONTE M. et MOSCHETTO Y.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 223. (45)
- HAVEZ R., ROUSSEL P., DEGAND P., RANDOUX A. et
BISERTE G.
Protides of Biological Fluids, H. Peeters Ed., 1969, 343. (64)
- HAVEZ R., DEGAND P., ROUSSEL P. et RANDOUX A.
Poumon et Coeur, 1970, 26, 81. (65)(77)

- HAVEZ R., ROUSSEL P., DEGAND P., LAMBLIN G.,
HERMIER H. et HARTEMANN E.
Poumon et Coeur, 1971, 26, 23. (78)
- ISEMURA M., IKENAKA T. et MASUSHIMA Y.
B.B.R.C., 1972, 46, 457. (127)
- KABAT E.A., BASSETT E.W., PRYZWANSKY K., LLOYD K.O.,
KAPLAN M.E. et LAYUG E.J.
Biochemistry, 1965, 4, 1632. (88)
- KENT P.W.
Exp. Ann. Bioch. Med., 1970, 30, 97. (85)
- KNOX K.W. et MORGAN W.T.J.
Biochem. J., 1954, 58, V. (91)(93)
- KOCHETKOV N.K., DEREVITSKAYA V.A. et KARAMURZA S.G.
Carbohydr. Res., 1967, 3, 403. (89)
- KOENIG V.L.
Arch. Biochem., 1950, 25, 241. (56)
- LAMBLIN G., DEGAND P., ROUSSEL P., HAVEZ R.,
HARTEMANN E. et FILLIAT M.
Clin. Chim. Acta, 1972, 36, 329. (79)
- LIEBERMAN J.
Amer. Rev. Resp. Dis., 1968, 97, 654. (73)
- LIEBERMAN J.
Amer. Rev. Resp. Dis., 1968, 97, 662. (74)
- LIEBERMAN J. et KURNICK M.B.
J. Clin. Invest., 1964, 43, 1892. (25)
- LIEBERMAN J., TRIMMER B.M. et KURNICK M.B.
Lab. Invest., 1965, 14, 249. (26)
- MASSON P.L., HEREMANS J.F. et PRIGNOT J.
Biochem. Biophys. Acta, 1965, 111, 466. (22)(49)

MONSIGNY M.

Thèse de Doctorat ès Sciences, Lille, 1968. (109)(117)

MONTREUIL J., TONNELAT J. et MULLET S.

Biochem. Biophys. Acta, 1960, 45, 413. (47)

MONTREUIL J.

Problèmes Actuels de Biochimie Générale, Masson et Cie Ed.,
1972. (126)

MORGAN T.E., FINLEY T.N. et FIALKOW H.

Biochem. Biophys. Acta, 1965, 106, 403. (15)

MUH J.P.

Thèse de Médecine, Lille, 1965. (46)

MUH J.P., LATREILLE J.P., GUERRIN F., ROUSSEL P.,
DEGAND P., RANDOUX A. et HAVEZ R.

"Hypersécrétion bronchique", R. Poinot Imp. Clichy, 1968,
193. (81)

OHKUMA S.

Blood and Tissue Antigens, Academic Press, N.Y. - London,
1970, 367. (80)(83)

OZEKI T. et YOSIZAWA Z.

Arch. of Biochem. and Biophys., 1971, 142, 177. (123)

PIGMAN W.

Blood and Tissue Antigens, Academic Press, N.Y.-London,
1970, 321. (57)(70)

PIGMAN W. et PAYZA N.

Protides of Biological Fluids. H. Peeters Ed., Pergamon Press,
1969, 241. (124)

RANDOUX A., BEERENS H., DUCHATELLE P. et HAVEZ R.

Hypersécrétion bronchique, R. Poinot Imp., Clichy, 1968,
239. (55)

REGE V.P., PAINTER T.J., WATKINS W.M. et MORGAN W.T.J.

Nature, 1964, 203, 360. (92)

- REGE V.P., PAINTER T.J., WATKINS W.M. et MORGAN W.T.J.
Nature, 1964, 204, 740. (94)
- REISSIG J.L., SROMINGER J.L. et LELOIR L.F.
J. Biol. Chem., 1965, 217, 959. (120)
- RESSLER C. et KASHELIKAR D.V.
J. Amer. Chem. Soc., 1966, 88, 2025. (118)
- ROUSSEL P.
Thèse de Médecine, Lille, 1965. (34)(42)(71)
- SCHIFFMAN G., KABAT E.A. et THOMPSON W.
Biochemistry, 1964, 3, 113. (95)
- SCHMIDT M.
Biochem. Biophys. Acta, 1962, 63, 346. (76)
- SCHULTZE H.E. et HEREMANS J.F.
Molecular Biology of Human Proteins. Elsevier Publ., 1966, 1,
816. (27)
- SCOTT J.E.
Methods in Carbohydrate Chemistry, WHISTLER Ed., Academic
Press, N.Y., 1965, 5, 38. (53)
- SHEFFNER A.L.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1963, 106, 298. (38)
- TANAKA K., BERTOLINI M. et PIGMAN W.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1964, 16, 404. (116)
- TANG J. et HARTLEY B.S.
Biochem. J., 1970, 118, 611. (87)
- THIERY J.P.
J. Microsc., 1967, 6, 987. (86)
- TOMASI T.B., TAN E.M., SALOMON A. et PRENDERGAST R.A.
J. Exp. Med., 1965, 121, 101. (44)
- TSUIKI S., HASHIMOTO Y. et PIGMAN W.
J. Biol. Chem., 1961, 236, 2172. (52)

VICARI G. et KABAT E.A.

Biochemistry, 1970, 9, 3414. (122)

WAREMBOURG H., HAVEZ R., SEZILLE G., SCHERPEREEL P.,
ROUSSEL P. et DEGAND P.

"Hypersécrétion Bronchique", R. Poinot Impr., Clichy, 1968,
181. (18)(40)

WATKINS J.C.

Biochem. Biophys. Acta, 1968, 152, 293. (20)

WERNER I.

Acta Soc. Met. Upsalien, 1953, 58, 1. (1)

WHITE J.C., ELMES P.C. et WHITLEY W.

Nature, 1959, 183, 1810. (6)

WHITE J.C., ELMES P.C. et WALSH A.

J. Pathol. Bacteriol., 1954, 67, 105. (28)

WHITEHOUSE H.W. et BOSTRÖM M.

Biochem. Pharmacol., 1961, 7, 135. (75)

WINZLER R.J., HARRIS E.D., PEKAS D.J., JOHNSON A.
et WEBER P.

Biochemistry, 1967, 6, 2195. (90)



APPENDICE TECHNIQUE

I - ETUDE ELECTROPHORETIQUE ET IMMUNOELECTROPHORETIQUE

A) ELECTROPHORESE EN AGAROSE

L'électrophorèse est pratiquée selon la microméthode sur lame décrite par SCHEIDEGGER (1)*. Le support retenu est un gel semi-solide d'agarose à 0,9 p. 100 en tampon véronal sodé de pH 8,2 et de force ionique 0,1. Les cuves d'électrophorèse sont des cuves à évaporation limitée permettant l'étude simultanée et comparative de 8 échantillons.

1) Gel d'agarose à 0,9 p. 100

1,8 g d'agarose sont dissous dans 200 ml de tampon véronal sodé de pH 8,2. La solution est portée à 100°C, au bain-marie pendant 20 minutes. Après refroidissement à température du laboratoire, le gel obtenu est conservé à la température de +4°C.

2) Tampon véronal sodé - HCl de pH 8,2

- Véronal sodé	79,3 g
- HCl <u>N</u>	115 ml
- Eau distillée q.s.p.	5.000 ml

3) Préparation des lames

3 ml d'agarose à 0,9 p. 100 sont coulés sur une lame de verre de 75 x 25 mm. Après refroidissement, une fente est pratiquée à 23 mm de l'extrémité de la lame (fente de 0,5 mm de largeur sur 20 mm de longueur). La migration électrophorétique s'effectue pendant une heure sous une différence de potentiel de 20 volts aux extrémités de la lame.

(*) Le numéro entre parenthèses correspond à l'ordre d'apparition des citations dans le texte.

4) Révélation des lames d'électrophorèse

Pour la révélation des électrophorégrammes, nous avons adopté plusieurs méthodes de coloration :

a) Coloration par l'Amidoschwarz

Après 12 heures de fixation dans un bain d'alcool à 60° contenant 2 p. 100 d'acide acétique, les lames sont séchées sous papier Whatman n°3.

Les protéines sont alors révélées par contact pendant 10 minutes avec une solution alcoolique d'Amidoschwarz :

- Amidoschwarz 1 g
- Méthanol 50 ml
- Eau distillée 50 ml
- Acide acétique glacial 10 ml

La décoloration dans un bain d'acide acétique, méthanol, eau distillée (1/5/5) est poursuivie jusqu'à l'obtention d'un fond de migration transparent.

b) Coloration par le Réactif de Schiff après oxydation periodique (PAS)

Nous avons utilisé la méthode préconisée par KOIW et GRONWALL (2) pour la titration du réactif de Schiff en SO_2 libre. Après séchage, les lames sont traitées dans les conditions préconisées par BISERTE (3),

fixées à l'éthanol absolu pendant 5 minutes,
séchées entre deux papiers filtres,
passées pendant 5 minutes dans le bain

d'acide periodique,

lavées dans l'éthanol à 70 p. 100,
séchées entre deux papiers filtres,
passées dans une solution réductrice,
lavées à nouveau dans l'éthanol à 70 p. 100,
séchées entre deux papiers filtres,
mises en contact du réactif de Schiff

pendant 10 minutes,

rincées à trois reprises 5 minutes dans

l'eau bisulfitée,

passées 2 à 3 minutes dans l'éthanol absolu,
et séchées à l'abri de la lumière.

c) Coloration par le Bleu de Toluidine (VANARKEL
et al.) (4)

Les lames sont fixées à la sortie de la cuve d'électrophorèse,
pendant une heure dans une solution à 0,1 p. 100 de Cetavlon (bromure
de cétyl-triméthyl-ammonium), puis séchées sous papier Whatman n°3.

Deux solutions de colorant sont utilisées :

- Bleu de Toluidine faible, en solution à 40 mg dans
100 ml d'un mélange acétone - eau distillée (4/1).

- Bleu de Toluidine fort, en solution à 400 mg dans
100 ml du même mélange acétone - eau distillée.

Après 15 minutes dans le bain de coloration, la décoloration
est assurée par l'eau non déminéralisée ou par une solution à 1 p. 100
d'acide acétique dans l'eau distillée.

Nous avons également retenu la coloration par le Bleu de

Toluidine fort à différentes valeurs de pH : 2,45, 1,0, 0,2.

d) Coloration par le Violet de Crésyl

Les lames sont fixées pendant une heure dans une solution à 0,1 p. 100 de Cetavlon, puis séchées sous papier Whatman n°3.

La coloration des lames d'électrophorèse est réalisée par un contact de 15 minutes dans une solution de Violet de Crésyl à 20 p. 100 dans l'acétique acétique à 1 p. 100. La décoloration est obtenue de manière satisfaisante par un lavage rapide à l'eau non déminéralisée.

e) Coloration par le Bleu Alcian

La révélation des lames d'électrophorèse est pratiquée par contact de 15 minutes avec le colorant. La fixation par le Cetavlon à 0,1 p. 100 précède cette révélation.

Trois formules de colorants sont retenues :

- Bleu Alcian pH 0,2 :

. Bleu Alcian	1 g
. H_2SO_4	10 ml
. Eau distillée	100 ml

- Bleu Alcian pH 1 :

. Bleu Alcian	1 g
. HCl 0,1 <u>N</u>	200 ml

- Bleu Alcian pH 2,45 :

. Bleu Alcian	1 g
. CH_3COOH	3 ml
. Eau distillée	100 ml

B) IMMUNOELECTROPHORESE

Cette technique associe une migration électrophorétique et une identification immunologique par réaction de précipitation antigène - anticorps dans un milieu gélosé.

Mode opératoire :

- L'étape électrophorétique est tout à fait semblable dans sa réalisation à celle que nous venons de décrire. Elle est réalisée selon la microméthode de SCHEIDEGGER (5). Le support retenu est cette fois un gel d'agar. La migration est poursuivie deux heures sous une différence de potentiel de 20 volts aux extrémités de la lame.

- On découpe ensuite dans le gel d'agar à l'aide d'un emporte-pièce une gouttière parallèle à l'axe de migration, dans laquelle est déposé l'immunsérum.

La diffusion des antigènes et de l'immunsérum dure de 24 à 48 heures en chambre humide à 20°C. Il est parfois nécessaire de laisser diffuser l'antigène avant de déposer l'immunsérum dans la gouttière. Ceci a été le cas lors de notre étude du pouvoir antigénique des fucomucines.

- Les lames sont ensuite lavées dans le sérum physiologique pendant 4 heures, séchées sous eau courante pour éliminer l'excès d'anticorps et de protéines non précipités . Après séchage sous papier filtre, les lames sont colorées par l'Amidoschwarz ou par le Réactif de Schiff après oxydation periodique.

II - TECHNIQUES DE PURIFICATION DES GLYCOPROTEINES

A) CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION

Au cours de notre travail, nous avons été amené à utiliser différents types de gel : Biogel, Sephadex, Sepharose. Le choix de ces supports était dicté par la taille moléculaire des protéines ou glycoprotéines dont nous devons effectuer l'isolement.

Les dimensions de la colonne varient également en fonction du but de l'étude et des quantités de préparation à chromatographier. Les chromatographies sont effectuées à la température du laboratoire. Les colonnes sont munies à leur extrémité inférieure d'un disque en verre fritté de porosité n°2.

1) Préparation du gel

Le gel est tout d'abord mis en solution dans l'eau distillée. Après agitation douce de quelques heures et décantation, nous éliminons l'eau de lavage. Cette opération est répétée à plusieurs reprises jusqu'à l'obtention d'un surnageant de décantation satisfaisant.

Dans un deuxième temps, le gel est lavé par le tampon d'équilibre dans lequel sera effectuée la chromatographie de gel-filtration.

2) Préparation de la colonne

La colonne est lavée à l'eau distillée, puis séchée à l'alcool et à l'éther. Elle est munie à sa partie supérieure d'un rodage sur lequel peut être adapté un entonnoir.

Après dégazage, sous vide, du gel en solution dans le tampon d'équilibre, celui-ci est versé avec précaution dans l'entonnoir. L'extrémité inférieure de la colonne est fermée. On laisse le gel décanter une nuit, puis on fait débiter la colonne jusqu'à ce que le gel soit tassé et que son niveau demeure constant.

Après mise en place de la tête d'adduction, la colonne est lavée pendant 12 heures avec le tampon d'élution.

3) Mode opératoire

Les protéines ou glycoprotéines soumises à la chromatographie de gel-filtration sont déposées sous un faible volume à la surface du gel. La préparation dissoute dans le tampon d'élution s'infiltré dans le gel ; on lave alors avec quelques centimètres cubes de tampon et l'on peut fixer la tête d'adduction du tampon.

Des fractions de 3,5 ou 15 ml, selon les cas, sont recueillies sur collecteur automatique de fractions.

Chacun des tubes correspondant au fractionnement est soumis à une lecture au spectrophotomètre à deux longueurs d'onde : 260 et 278 nm. Dans certains cas, la définition du diagramme chromatographique sera complétée par l'étude de la réactivité à la ninhydrine et par l'estimation de la richesse des fractions en oses combinés (méthodes de dosage adaptées sur autoanalyseur Technicon).

B) CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE IONIQUE

Nous avons essentiellement utilisé deux types d'échangeurs : la DEAE-Sephadex A 25 et l'Ecteola-cellulose.

- DEAE-Sephadex A 25 (Pharmacia) : dont la capacité d'échange est de $3,5 \pm 0,5$ mEq/ g et dont la taille des particules varie de 40 à 120 μ .

- Ecteola-cellulose ou Cellex E (Bio-Rad) dont la capacité d'échange est de 0,4 mEq par gramme sec d'Ecteola-cellulose.

1) Préparation de l'échangeur et montage de la colonne

Le protocole de régénération appliquée à l'Ecteola-cellulose comporte plusieurs étapes effectuées sur verre fritté. Un cycle de régénération comprend :

- un lavage à l'eau distillée,
- un contact de 30 minutes avec NaOH N,
- un lavage abondant à l'eau distillée,
- une demi-heure de contact avec HCl N,
- et enfin un lavage à l'eau distillée, jusqu'à l'obtention d'un pH voisin de la neutralité.

En ce qui concerne la DEAE-Sephadex A-25, le cycle de régénération est légèrement différent :

- lavage à l'eau distillée,
- contact 30 minutes avec HCl 0,5 N,
- lavage abondant,
- puis 30 minutes en présence de NaOH 0,5 N,
- et lavage à l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un éluat à pH neutre.

Quel que soit l'échangeur utilisé, après un ou deux cycles de régénération, celui-ci est équilibré dans le tampon d'élution choisi, puis monté sur colonne de 25 x 2,3 cm ou 35 x 4,3 cm.

2) Conditions d'élution

L'élution est menée selon un gradient continu ou discontinu avec des solutions en NaCl de molarité croissante.

a) Premier type de gradient : gradient discontinu
correspondant au passage successif des solutions NaCl 0,1 M,

NaCl 0,1 M HCl 0,01 N

NaCl 0,3 M HCl 0,01 N

NaCl 0,5 M HCl 0,01 N

NaCl 0,7 M HCl 0,01 N

NaCl 1 M HCl 0,01 N

b) Deuxième type de gradient : gradient continu ;
l'élution est conduite tout d'abord par du NaCl 0,1 M, puis par un gradient continu de NaCl de molarité croissante : de 0,1 à 0,7 M.
Ce gradient linéaire est réalisé à l'aide de deux récipients contenant chacun 800 ml d'une solution de NaCl 0,1 M HCl 0,01 N et NaCl 0,7 M HCl 0,01 N.

Les fractions recueillies sur collecteur automatique sont soumises à une analyse spectrophotométrique à 260 et 278 nm et à un dosage des oses combinés.

C) ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN FILM LIQUIDE A HAUT VOLTAGE

Elle est réalisée selon la technique préconisée par HANNIG
(6) dans les conditions décrites par MOSCHETTO (7).

1) Principe

Cette méthode est basée sur le fractionnement des protéines, selon leur point isoélectrique. Entre deux plaques de verre inclinées, on réalise un flux constant de tampon du haut vers le bas.

Le mélange à étudier, injecté à l'extrémité supérieure est entraîné par le flux liquidien, cependant qu'un champ électrique, établi perpendiculairement au sens d'écoulement, permet de séparer les différents constituants en fonction de leur mobilité électrophorétique. A un moment donné, la situation d'une protéine de charge électrique définie est donc la résultante de deux forces :

- différence de potentiel entre les électrodes
- vitesse de migration du tampon dans la chambre d'électrophorèse.

2) Protocole opératoire

L'appareil utilisé : Elphor VAP N°1 est construit par la Société Bender et Hobein. Le film liquide de 0,5 mm d'épaisseur est une solution tampon située entre deux plaques de verre de 50 x 50 cm. La plaque supérieure est percée d'un certain nombre d'orifices qui permettent l'injection du tampon et de la substance à étudier.

L'ensemble est situé dans une chambre dont la température est maintenue à 5°C pendant la durée du fractionnement. A la sortie de la chambre, le film liquide est compartimenté en 48 fractions qui s'accumulent dans des godets.

A intervalles de temps réguliers, le liquide accumulé dans chaque godet est pompé dans 48 tubes de collection.

Les électrodes sont séparées de la chambre d'électrophorèse

par des membranes semi-perméables. Les compartiments à électrodes sont constamment alimentés par un tampon.

Le film liquide dans la chambre d'électrophorèse est injecté à l'aide d'une pompe à débit constant réglable.

L'intensité du courant peut varier de 0 à 200 mA et la tension de 0 à 2.500 volts.

Nous avons utilisé les conditions suivantes :

- Tampon de la chambre d'électrophorèse : pH 8,6

Acide citrique 0,008 M

Tris 0,08 M

- Tampon des compartiments électrodes : pH 8,6

Acide citrique 0,0256 M

Tris 0,24 M

La concentration de l'échantillon est en général de l'ordre de 20 mg/ml de tampon pH 8,6. La vitesse d'injection du tampon dans la chambre peut varier de 10 à 120 ml/heure. La vitesse d'injection de la solution étudiée est de 2 ml/heure au niveau du tube 38.

Les 48 tubes correspondent à l'ensemble du diagramme d'électrophorèse. Sur chaque fraction recueillie, on mesure l'absorption spectrophotométrique à 260 et 278 nm, ainsi que la teneur en oses combinés.

III - METHODES D'ETUDE DES GLUCIDES

A) DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE DES OSES

La composition centésimale en oses "neutres", en osamines, en acide sialique a été déterminée à l'aide des méthodes suivantes :

1) Dosage du galactose

Le galactose, seul hexose présent dans la copule polysaccharidique des glycoprotéines entrant dans le cadre de notre étude, est dosé à l'aide d'une méthode à l'orcinol sulfurique adaptée à l'autoanalyseur Technicon.

Nous utilisons la technique à l'orcinol sulfurique décrite par TILLMANS (8), SØRENSEN (9) et LUSTIG et LANGER (10), modifiée par NOLAN et SMITH (11). Cette méthode a été adaptée à l'autoanalyseur Technicon par DEMAILLE, DAUTREVAUX, HAVEZ et BISERTE (12).

a) Réactifs

1°) Réactif à l'orcinol :

Orcinol 1,6 g

H_2SO_4 4N 100 ml

Compléter à 1.000 ml avec H_2SO_4 à 66 %. Conserver à +4°C à l'obscurité.

2°) Témoin :

Gamme de galactose à 12,5, 25, 50, 100 et 200 γ /ml d'eau distillée.

b) Mode opératoire

L'échantillon prélevé est mélangé dans une bobine de délai avec le réactif à l'orcinol sulfurique. Le flux liquidien segmenté à intervalles réguliers par des bulles d'air, passe dans un bain-marie à 95°C pendant 5 minutes. Après refroidissement, la densité optique est lue à la longueur d'onde de 520 nm.

Le montage permet l'analyse de 40 échantillons à l'heure sur un volume de prise d'essai de l'ordre de 0,4 ml.

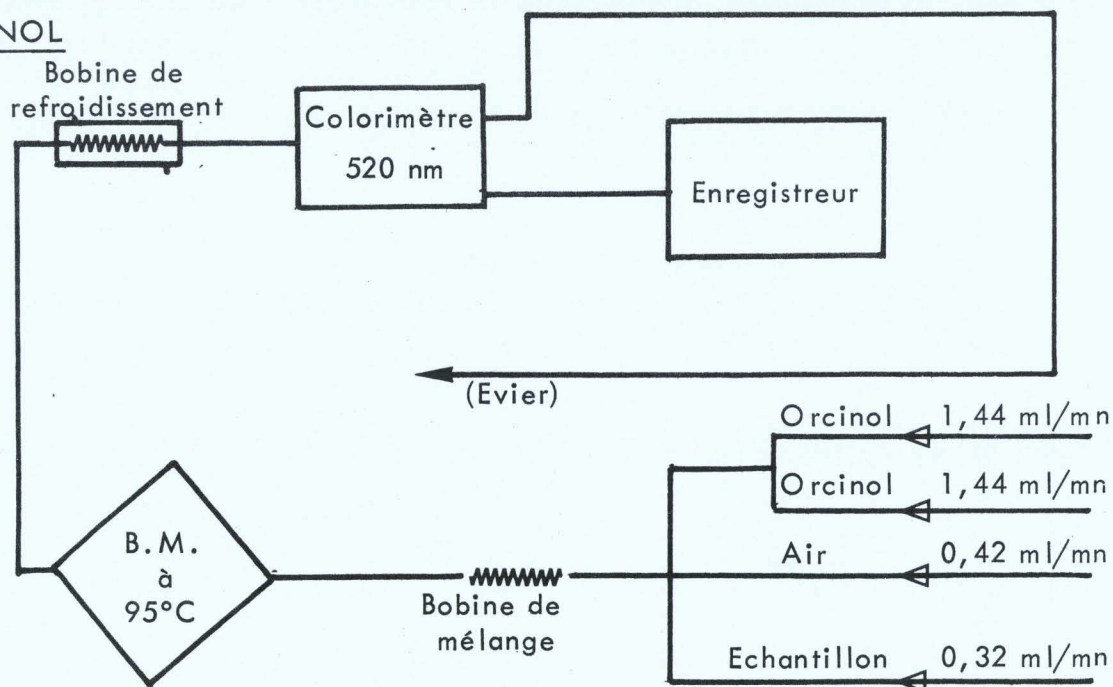
Ce manifold se prête à l'étude en série des tubes de collection des chromatographies de gel-filtration (figure 1).

Pour une estimation quantitative précise d'une préparation, il est nécessaire de passer trois fois de suite l'échantillon à doser. Seules les deux dernières valeurs sont retenues. La densité optique à 520 nm de l'échantillon est comparée à une gamme de galactose dosée dans les mêmes conditions. Les résultats sont corrigés en fonction du rapport poids humide/poids sec de la poudre lyophilisée de l'échantillon analysé.

L'interférence due au fucose peut être réduite en utilisant le protocole suivant : pour une solution étudiée, on calcule tout d'abord l'absorption spectrophotométrique que donnerait par la méthode à l'orcinol, une solution de fucose de concentration identique. En déduisant cette valeur calculée de la densité optique obtenue au cours du dosage, on peut déterminer l'absorption donnée par le galactose et obtenir ainsi la teneur en hexose. Ce protocole préconisé en 1950 par WHISTLER et DURSO (13) a été repris par différents auteurs : DISCHE (14), LLOYD et KABAT (15) et CARLSON (16).

DOSAGE SUR AUTO-ANALYSEUR TECHNICON

ORCINOL



NINHYDRINE

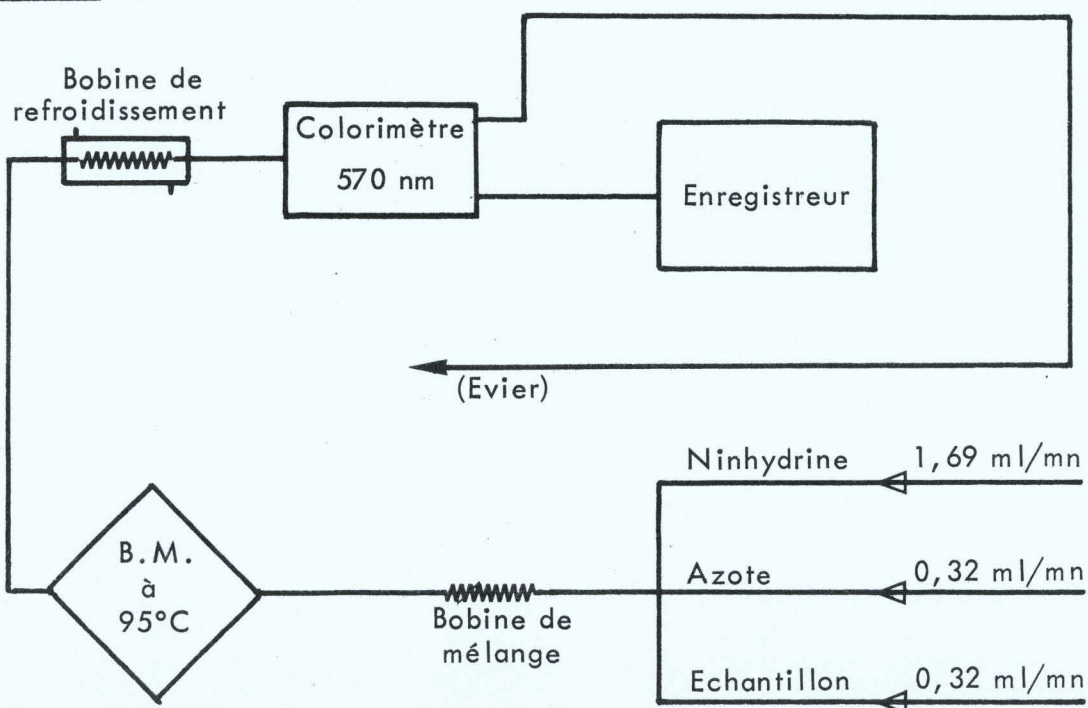


Figure 1

2) Dosage des hexosamines

Le dosage des hexosamines se fait selon la méthode de NEUHAUS et LETZRING (17) après une hydrolyse par l'acide chlorhydrique 4N pendant 4 heures à 100°C en tube scellé sous vide. Le choix de la durée et des conditions d'hydrolyse peut être considéré comme une "condition moyenne" si l'on se réfère à la bibliographie.

ANTONONOPOULOS et GARDEL (18) utilisent l'acide chlorhydrique 6N pendant 8 heures. PIGMAN, avec $\text{HCl } 6\text{N}$ laisse seulement une heure à 100°C . DORFMAN (19) dans l'étude de la composition de l'héparitine-sulfate, poursuit son hydrolyse pendant 14 heures avec $\text{HCl } 4\text{N}$, DAVIDSON (20), 12 heures.

Une cinétique réalisée sur nos préparations, en fonction de la normalité en HCl , montre que la libération des osamines est pratiquement totale dans les conditions suivantes : $\text{HCl } 0,5\text{ N}$, 1 heure, à 100°C . Ceci nous montre l'extrême sensibilité en milieu acide de nos préparations. Toutefois, nous avons conservé les conditions : $\text{HCl } 4\text{ N}$, 4 heures, 100°C , après avoir vérifié la stabilité des osamines libres en milieu acide. Le pourcentage de récupération est de 95 p. 100 après 4 heures dans $\text{HCl } 4\text{N}$.

Après hydrolyse, l'acide chlorhydrique est éliminé par lyophilisation selon la technique de MOSCHETTO et BISERTE (21).

L'hydrolysate est repris dans 16 ml d'eau distillée. On ajoute 1 ml de réactif à l'acétylacétone à 4 ml d'hydrolysate. Le mélange est porté 20 minutes à 100°C . Après refroidissement, on ajoute 5 ml d'alcool isoamylique. Après agitation énergique, une légère centrifugation sépare les deux phases. 4 ml d'extraire alcoolique sont repris et on leur ajoute 1 ml de réactif d'Ehrlich. Après agitation,

une coloration rose se développe à l'obscurité, en 15 minutes. La densité optique est lue au spectrophotomètre à 530 nm contre un blanc alcool isoamylique. La courbe obtenue à partir de dilutions d'une solution de glucosamine est linéaire entre 8 et 32 microgrammes, puis s'infléchit entre 32 et 40 microgrammes. Enfin, des solutions de glucosamine ou de galactosamine possèdent un coefficient d'extinction spécifique identique.

3) Dosage du fucose

Ce dosage est effectué par la méthode de DISCHE et SHETTLES (22) qui utilisent le chlorhydrate de cystéine.

A 1 ml d'échantillon à doser, on ajoute 5 ml de réactif sulfurique (6 volumes d' H_2SO_4 pur RP pour 1 volume d'eau distillée), en maintenant le tube dans un bain de glace. Les tubes sont ensuite portés à 100°C pendant 10 minutes et refroidis dans un bain de glace. On ajoute 100 μ l de réactif à la cystéine (3 g de chlorhydrate de cystéine pour 100 ml d'eau distillée). Après 4 heures à l'obscurité, la densité optique au spectrophotomètre à 396 et à 430 nm est lue. Le témoin de lecture est l'eau distillée.

La quantité de fucose est proportionnelle à la différence de densité optique entre 396 et 430 nm. En tenant compte des valeurs obtenues pour le témoin standard à 50 microgrammes et le témoin sans cystéine, la quantité de fucose exprimée en microgrammes est donnée par la formule

$$50 \times \frac{(d_{396} - d_{430})_{\text{échantillon}} - (d_{396} - d_{430})_{\text{témoin sans cystéine}}}{d_{396} - d_{430}_{\text{témoin standard}}}$$

Une courbe témoin est construite avec des dilutions croissantes de la solution standard de fucose à 50 microgrammes par ml.

4) Dosage de l'acide sialique

Le dosage de l'acide sialique est réalisé par la méthode de WARREN (23) modifiée par AMINOFF (24), après hydrolyse à l'échantillon à doser par l'acide sulfurique 0,1 N, pendant 30 minutes, à 80°C. 0,5 ml d'un échantillon hydrolysé contenant de 5 à 40 microgrammes d'acide sialique dans l'acide sulfurique 0,1 N est ajouté à 0,25 ml de solution d'acide periodique 0,025 M dans H_2SO_4 0,1 N. Après 30 minutes à 37°C, l'excès d'acide periodique est réduit par 0,3 ml d'une solution d'arsénite de sodium à 2 p. 100 dans l'acide chlorhydrique 0,5 N. On ajoute ensuite 2 ml de la solution d'acide 2-thiobarbiturique 0,1 M ajusté à pH 9 par la soude (3,6 g pour 250 ml). On porte les tubes à 100°C pendant 7 minutes 30. Après refroidissement 2 minutes dans la glace fondante, on ajoute 5 ml de n-butanol contenant 5 p. 100 (v/v) d'HCl 12N. Agitation. Centrifugation. On reprend alors la phase butanolique dans des tubes secs et on lit à 549 nm contre un blanc butanol au spectrophotomètre. Une courbe étalon est réalisée avec des dilutions croissantes d'une solution à 100 microgrammes d'acide N-acétyl-neuraminique. La courbe de dosage est linéaire entre 5 et 50 microgrammes.

5) Groupelements sulfate

a) Repérage semi-quantitatif

Le repérage semi-quantitatif des esters sulfuriques est

effectué selon la méthode à l'acriflavine décrite par WHITEHOUSE et BOSTROM (25) et modifiée par INOUE (26). Il s'agit d'une méthode turbidimétrique adaptée en semi-microméthode. A 0,5 ml de solution à doser, on ajoute 0,1 ml d'une solution d'acriflavine (acriflavine à 0,5 p.100 dans l'eau distillée). Après 15 minutes de contact à température du laboratoire et dilution par addition de 2,5 ml d'eau distillée, la densité optique est lue à 660 nm contre un blanc : 0,1 ml de solution d'acriflavine et 3 ml d'eau distillée.

La densité optique mesurée est corrigée par celle d'un témoin contenant 0,5 ml de la solution à doser et 2,6 ml d'eau distillée.

b) Dosage par la méthode de DOGSON et
et PRICE (27)

2 à 4 mg de la fraction à doser sont dissous dans 1 ml d'acide chlorhydrique N. L'hydrolyse réalisée en tube scellé sous vide est poursuivie pendant 5 heures à 105°C.

A 0,1 ml d'hydrolysate, on ajoute successivement 1,9 ml d'acide chloroacétique à 3 p.100 et 0,5 ml du réactif gélatine-barium (2 g de gélatine Difco dans 400 ml d'eau distillée à 60°C). Après une nuit à +4°C, addition de 2 g de Cl_2Ba ; attendre 2 à 3 heures avant l'emploi).

Le mélange réactionnel est laissé 10 à 20 minutes à température du laboratoire. On lit au spectrophotomètre à 360 nm contre un blanc. La valeur de la densité optique obtenue est comparée à une gamme étalon de SO_4K_2 dans l'eau distillée.

B) IDENTIFICATION DES GLUCIDES ET
COMPOSITION MOLAIRE DES OSES

1) Les oses neutres impliqués dans la copule polysaccharidique ont été identifiés par chromatographie sur papier. Les oses sont préalablement libérés par hydrolyse en tube scellé sous vide en présence d'acide chlorhydrique 2N pendant une durée de 4 heures à 100°C. La chromatographie est réalisée sur papier Schleicher et Schüll N° 2040b dans le système solvant décrit par BOURRILLON et MICHON (28) : n-butanol/pyridine/HCl 0,1 N dans le rapport 5/3/2. La révélation est obtenue par pulvérisation d'oxalate d'aniline (2 volumes d'oxalate d'aniline à 2 p. 100 dans l'éthanol à 95° ; 3 volumes d'acide oxalique à 2,5 p. 100 dans l'eau distillée).

2) Les osamines également libérées par hydrolyse acide dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites pour l'identification des oses, sont soumises à une chromatographie sur papier dans le système n-butanol/pyridine/HCl 0,1 N (5/3/2). La révélation est obtenue, soit par le réactif à l'oxalate d'aniline, soit par le réactif d'Erhlich (*).

(*) Réactif à l'oxalate d'aniline :

oxalate d'aniline à 20 p. 1.000 dans l'alcool à 95°	:	2 volumes
acide oxalique à 25 p. 1.000 dans l'eau distillée	:	3 volumes

Réactif d'Erhlich :

para-diméthyl-amino-benzaldéhyde	1 g
éthanol absolu	30 ml
HCl concentré	30 ml
butanol	100 ml

Le rapport molaire des hexosamines (glucosamine, galactosamine) a été déterminé sur résines échangeuses d'ions. L'élution des osamines est suivie sur autoanalyseur Technicon par la coloration à la ninhydrine.

a) Matériel

Colonne Technicon : longueur 500 mm, diamètre 6,35 mm; la colonne est nantie d'un manchon permettant de maintenir la température à 50°C pendant toute la durée de l'élution.

Résine type A4 (Bio-Rad).

Pompe Beckman assurant un débit de 31 ml à l'heure sous une pression de 130 à 150 P.S.I..

Tampons d'élution retenus :

1°) Tampon citrate de pH 3,80 (SPACKMAN, STEIN et MOORE)(29)

Citrate de sodium trisodique 5,5 H ₂ O	35,72g
NaOH <u>N</u>	100 ml
Thiodiglycol	10 ml
Brij 35	20 ml
Eau distillée bouillie q.s.p.	2.000 ml

Le pH est ajusté à la valeur de 3,80 avec HCl (Merck) à 16 p.100.

2°) Tampon citrate de pH 5,28 $\pm$ 0,02 (MOORE, SPACKMAN et STEIN)(30)

Acide citrique 1 H ₂ O	49,1g
NaOH <u>N</u>	700 ml
HCl concentré à 32 p.100 (Merck)	13,6ml
Brij 35	5,4ml

Eau distillée bouillie q.s.p. 2.000 ml
Concentration en Na 0,35 N.

b) Mode opératoire

La résine est équilibrée en tampon citrate de pH 3,8. Le dépôt des osamines libérées par hydrolyse (hydrolyse effectuée en tube scellé sous vide, HCl 4N, 4 heures, 100°C) est effectué sous un volume de 200 à 800 microlitres dans le tampon citrate pH 3,80 contenant 12,5 p.100 de saccharose et 0,167 micromole/ml de norleucine.

L'élution par le tampon citrate pH 3,80 est poursuivie jusqu'au moment du passage de la norleucine. Dès le passage du témoin interne, l'élution est effectuée en tampon pH 5,28. La réaction à la ninhydrine permet alors de repérer la glucosamine, puis la galactosamine.

Dans le cas où l'on ne désire pas effectuer le dosage simultané des osamines, on peut d'entrée éluer en tampon 6,28. Dans ce cas, la norleucine n'est pas séparée des aminoacides élués en tête.

Le rapport des osamines est obtenu après calcul des surfaces des pics. Dans le cas où il n'existe qu'une seule osamine, on peut vérifier son identité en effectuant une deuxième chromatographie et en ajoutant à l'hydrolysate un témoin glucosamine ou galactosamine (40 µg d'hexosamines). L'identification n'offre plus alors de difficulté. Après passage des osamines, on régénère la résine par dépôt de 3 ml de NaOH 0,2 N. Le passage pendant une heure du tampon citrate pH 3,80 nous livre une résine équilibrée et prête pour une nouvelle étude.

3) L'acide sialique libéré par hydrolyse acide douce : H_2SO_4 0,1 N, 80°C, pendant une heure, est identifié par chromatographie sur papier dans le système solvant préconisé par SVENNERHOLM E. et SVENNERHOLM L. (31) : n-butanol, n-propanol, HCl 0,1 N (1/2/1).

IV - METHODES D'ETUDES DES ACIDES AMINES

A) DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES

Nous utilisons une méthode de séparation des acides aminés, préconisée par SPACKMAN, STEIN et MOORE (32), adaptée à l'auto-analyseur Technicon, de manière à effectuer la chromatographie sur une seule colonne. Celle-ci est une colonne de 120 x 6,35 mm de Chromobeads A (Dowex 50 x 8). Cette résine sulfonée, soigneusement calibrée, présente une granulométrie moyenne de 24 microns.

L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient continu de concentration en Na^+ et en pH. Le gradient est obtenu à l'aide d'un Varigrad composé de neuf chambres de 75 ml. La composition des tampons de chacune des chambres, modifiée selon MOSCHETTO (33), permet d'avoir une séparation complète des osamines.

La composition des solutions admises dans les neuf chambres du Varigrad est présentée dans le tableau suivant :

Chambre	pH 3,175 *	pH 3,80 *	pH 5 **
1	70 ml + 6,5 ml de méthanol 25 % butanol 75 %	0	0
2	75 ml	0	0
3	75 ml	0	0
4	75 ml	0	0
5	0	70 ml	5 ml
Prélever 20 ml du mélange obtenu et le remplacer par 20 ml du même mélange contenant du NaCl 2,5 M, ce qui assure une concentration finale de 0,66 M en NaCl			
6	6 ml	9 ml	60 ml
7	0	0	75 ml
8	0	0	75 ml
9	0	0	75 ml

On ajoute à chaque cellule 0,8 ml de "Brij 35".

* Tampon pH 3,175 et pH 3,80 :

Citrate trisodique 5,5 H₂O 89,3 g
(normalité en Na⁺ 0,15 M)

NaOH N 300 ml

Amener à ébullition. Après refroidissement, ajouter :

Thiodiglycol 25 ml

Eau distillée q.s.p. 5 litres

Ajuster au pH désiré avec HCl 6 N.

**** Tampon pH 5,0 :**

Citrate trisodique 5,5 H ₂ O	89,3 g
NaOH <u>N</u>	300 ml
NaCl	185,35 g

Amener à ébullition. Après refroidissement, compléter avec de l'eau distillée q.s.p. 5 litres.

Ajuster le pH à 5,0 avec HCl 6 N.

Avant la chromatographie, la colonne est équilibrée avec un tampon analogue au tampon pH 3,175, mais dont le pH est abaissé à la valeur de 2,9 par HCl 6 N.

Les hydrolysats de protéines obtenues par HCl 6N (1 ml par mg de protéine), 24 heures, à 105-110°C, en tube scellé sous vide, sont repris dans un tampon de même composition que le tampon pH 3,175, mais enrichi en saccharose (12,5 p.100), contenant le témoin interne norleucine et de pH ajusté à la valeur de 2,2.

L'élution de la colonne est suivie par dosage à la ninhydrine sur auto-analyseur Technicon.

B) DOSAGE A LA NINHYDRINE SUR AUTO-ANALYSEUR TECHNICON

Cette méthode de dosage a été utilisée pour la détermination de la composition en acides aminés d'une préparation et aussi pour le repérage des amino-acides libres séparés par chromatographie de gel-filtration sur des échantillons, soumis à une protéolyse.

1) Réactif à la ninhydrine

a) Solution de méthylcellosolve diluée :

Préparer 24 heures avant les autres réactifs un mélange à parties égales de :

Méthylcellosolve	1.500 ml
Eau distillée	1.500 ml

Cette solution est dégazée et maintenue sous atmosphère d'azote.

b) Solution de ninhydrine "stock" :

Méthylcellosolve pur	500 ml
Ninhydrine	15 g
Hydrindantine	1,125 g
Tampon acétate de Na pH 5,5	262,5 ml

Cette solution est préparée et stockée sous atmosphère d'azote.

Le réactif utilisé pour le dosage est obtenu en mélangeant aux trois litres de solution de méthylcellosolve diluée, la préparation de solution "stock". L'ensemble est toujours maintenu sous atmosphère d'azote.

Le réactif peut être étalonné avant chaque dosage par rapport à une gamme de norleucine et de proline.

2) Mode opératoire

L'échantillon prélevé ou l'éluat de la résine (dans le cas de la composition en acides aminés d'une protéine) est mélangé au réactif à la ninhydrine dans une première bobine de délai. Le flux liquidien est fractionné par bulles d'azote. La progression du flux

est assurée par une pompe péristaltique (figure 1). Après passage au bain-marie à 95°C, et refroidissement, la densité optique est lue à 570 nm et à 440 nm pour la proline.

C) DETERMINATION DES AMINO-ACIDES EN POSITION N-TERMINALE : METHODE DES DANSYL-AMINO-ACIDES (GRAY et HARTLEY)(34). TECHNIQUE DE WOODS et WANG (35)

1) Dansylation du matériel étudié

100 à 200 γ de peptide ou de protéine sont dissous dans 20 μ l d'eau bidistillée. On ajoute alors 20 μ l d'une solution de bicarbonate de sodium 0,2 M et 40 μ l de solution acétonique de chlorure de l'acide 1-diméthyl-amino-naphtalène-5-sulfurique (chlorure de Dansyl Sigma : solution conservée à +4°C et à l'obscurité), à 2,5 mg par ml. Ce mélange réactionnel est laissé en contact à 45°C pendant une heure à l'obscurité.

Après évaporation en dessiccateur sous vide partiel, en présence d'acide sulfurique concentré, on pratique une hydrolyse en tube scellé pendant 5 heures à 110°C en présence d'HCl 5,6 N (HCl Merck 32 % dilué au 1/2).

L'hydrolysate est séché sous vide partiel dans un dessiccateur, en présence de pastilles de soude, puis repris dans un mélange acétone-acide acétique (3/2) (acétone redistillée, acide acétique RP Prolabo).

2) Chromatographie des Dansyl-amino-acides

Nous utilisons la chromatographie en couche mince sur gel

de silice G Merck. 28 g de gel de silice en suspension dans 50 ml d'eau distillée et 5 ml d'éthanol absolu sont étalés sur 6 plaques de verre (20 x 20 cm) en une couche de 300 μ d'épaisseur.

On laisse alors sécher les plaques à température ambiante.

Immédiatement avant le dépôt de l'hydrolysate, les plaques sont activées une heure à 100°C. L'hydrolysate en solution acétone/acide acétique est déposé à 3 cm des bords de la plaque.

Dans le premier système solvant, la migration est effectuée dans le sens perpendiculaire au sens de l'étalement du gel.

Après réactivation pendant 10 minutes à 100°C, la plaque est soumise à une deuxième migration (sens perpendiculaire à la première).

Avant toute migration, on laisse s'établir la saturation de la plaque pendant 30 minutes.

Nous avons utilisé les systèmes solvants préconisés par GROS et LABOUESSE (36).

Première dimension :

Benzène 80 (Merck)

Pyridine 20 (pyridine Billault distillée)

Acide acétique 5

Deuxième dimension :

Toluène 120 (Merck)

Monochloroéthanol 200 (Prolabo)

Ammoniaque concentrée 80 (Prolabo)

Les amino-acides dansylés sont identifiés sous lampe à ultra-violet (longueur d'onde : 340 nm).

D) DEGRADATION D'EDMAN

1) Matériel et réactifs

- tube cône à centrifuger bouché émeri ;
- pyridine Billaut : la pyridine est traitée à reflux pendant 12 heures par la ninhydrine (1 g/l) en présence de baryte anhydre (10 g/l), puis distillée (115°C);
- acide acétique (Prolabo) traité à reflux pendant 12 heures par l'anhydride chromique et distillé ;
- benzène (Merck) ;
- acide trifluoroacétique (Fluka purum) ;
- phényl-iso-thiocyanate (Fluka puriss p. a.) ;
- acétate de butyle (Merck).

2) Technique

La dégradation à l'aide de phényl-iso-thiocyanate est pratiquée dans des conditions voisines de celles préconisées par DOPHEIDE et al. (37).

La réaction est effectuée dans un tube à centrifuger cône rodé.

a) Premier protocole : EDMAN - Composition en amino-acides différentielle

20 mg de glycopeptides sont dissous dans 800 μ l d'eau bidistillée. On ajoute 800 μ l de pyridine et 40 μ l de phényl-iso-thiocyanate (PIT). On laisse réagir 1 h 30 à 45°C sous atmosphère d'azote.

Le PIT en excès est extrait par agitation avec du benzène (2 ml de benzène - élimination de la phase benzénique ; 5 fois).

La phase benzénique étant séparée par centrifugation, on congèle la phase aqueuse qui est lyophilisée.

La cyclisation est effectuée en 30 minutes, à 45°C, sous azote, par addition d'1 ml d'acide trifluoroacétique anhydre que l'on ajoute au lyophilisat.

Après séchage sous vide, en dessiccateur en présence de soude, le résidu est repris dans 1 ml d'acide acétique 0,4 N. La phényl-thio-hydantoïne est alors extraite à trois reprises par le benzène (2 ml).

Après la pesée pour la composition en acides aminés, le lyophilisat est repris dans l'eau distillée et un nouveau cycle de dégradation peut commencer.

Ce protocole est justifié par la parfaite élimination des éléments contaminants qui viennent interférer dans le dosage des acides aminés.

b) Deuxième protocole : EDMAN -Dansyl-amino- acides

Nous avons utilisé une modification de la méthode précédente proposée par HAN (38) qui vise à simplifier la technique. Nous n'obtenons pas cette fois une élimination totale des contaminants, mais ces derniers ne perturbent pas l'identification de l'acide N-terminal par méthode de dansylation.

L'excès de phényl-isothiocyanate n'est pas éliminé par extraction benzénique, avant l'addition d'acide trifluoroacétique. Après cyclisation, deux extractions par l'acétate de butyle sont réalisées. Après séchage sous vide de la phase aqueuse résiduelle en présence de NaOH, le résidu est lyophilisé.

Après prélèvement pour la détermination de l'acide-amino N-terminal par la méthode de Dansyl-acide-amino, un nouveau cycle de dégradation peut être entrepris.

E) IDENTIFICATION DE L'AMINO-ACIDE EN POSITION C-TERMINALE

1) Matériel et réactif

a) Carboxypeptidase A (Worthington) : suspension à 92,2 mg/ml. Activité : 50 Unités par mg.

b) Carboxypeptidase B (Worthington) : suspension à 16 mg/ml. Activité : 177 Unités par mg.

2) Préparation des enzymes

5 microlitres de la suspension de carboxypeptidase A ou B sont dilués dans 50 microlitres d'une solution de chlorure de lithium à 10 p.100 dans l'eau distillée. On laisse une nuit à +4°C. Le lendemain, la solution enzymatique diluée est limpide et propre à l'emploi.

3) Hydrolyse enzymatique

2 mg de glycopeptide sont dissous dans 180 µl de tampon Tris 0,01 M de pH 8,0. On ajoute 10 µl de solution de carboxypeptidase A et/ou 10 µl de carboxypeptidase B et on laisse 24 heures à 37°C.

L'arrêt de l'hydrolyse enzymatique est obtenu par addition de 1 ml de tampon citrate de Na, pH 2,2 contenant 15 p.100 de saccharose et le témoin interne norleucine.

L'ensemble est déposé directement sur la résine d'échange d'ions et la composition en acides aminés est déterminée. Seuls, les amino-acides libérés par hydrolyse enzymatique, donc en position C-terminale, sont présents et identifiés.

Une étude des acides aminés libérés au bout de 1, 2, 3, 5 et 24 heures nous permet d'étudier la séquence des acides aminés situés dans la région C-terminale de l'axe polypeptidique.

BIBLIOGRAPHIE
de l'APPENDICE TECHNIQUE

AMINOFF D.,

Biochem. J., 1962, 81, 384. (24)

ANTONOPOULOS C.A., FRANSSON L.Å., HEINEGARD D.
et GARDELL S.,

Biochem. Biophys. Acta, 1967, 148, 161. (18)

BISERTE G.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, 39, Suupl. n°3. (3)

BOURRILLON R. et MICHON J.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 267. (28)

BRENDEL K., STEELE R.S., WHEAT R.W. et DAVIDSON E.A.

Anal. Biochem., 1967, 18, 161. (20)

CARLSON D.M.

J. Biol. Chem., 1962, 243, 616. (16)

DEMAILLE J., DAUTREVAUX M., HAVEZ R. et BISERTE G.

Bull. Soc. Chim. France, 1965, 12, 3506. (12)

DISCHE Z.

Methods of Biochemical Analysis, 1955, 2, 313. (14)

DISCHE Z. et SHETTLES L.B.

J. Biol. Chem., 1948, 175, 595. (22)

DODGSON K.S. et PRICE R.G.

Biochem. J., 1962, 84, 106. (27)

DOPHEIDE T.A.A., MOORE S. et STEIN W.H.

J. Biol. Chem., 1967, 242, 1833. (37)

GRAY W.R. et HARTLEY B.S.

Biochem. J., 1963, 89, 59. (34)

GROS G. et LABOUESSE B.

Europ. J. Biochem., 1969, 7, 463. (36)

HAN K.

Thèse de Biologie Humaine (Lille) 1970. (38)

HANNIG K.

J. Physiol. Chem., 1964, 338, 218. (6)

INOUE S.

Biochem. Biophys. Acta, 1965, 101, 16. (26)

KNECHT J., CIFONELLI J.A. et DORFMAN A.

J. Biol. Chem., 1967, 242, 4652. (19)

KOIW E. et GRONWALL A.

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1956, 8, 21. (2)

LLOYD K. et KABAT E.A.

Biochem. Biophys. Res. Comm., 1964, 385, 16. (15)

LUSTIG B. et LANGER A.

Biochem. Z., 1931, 231, 472.

Biochem. Z., 1931, 242, 320. (10)

MOORE S., SPACKMAN D.H. et STEIN W.H.

Anal. Chem., 1958, 30, 1183. (30)

MOSCHETTO Y.

2ème Thèse de Sciences, Lille, 1966. (7)

MOSCHETTO Y.

Communication personnelle. (33)

MOSCHETTO Y. et BISERTE G.

Communication personnelle. (21)

NEUHAUS O.W. et LETZRING M.

Anal. Chem., 1957, 29, 1230. (17)

NOLAN C. et SMITH E.

J. Biol. Chem., 1962, 237, 453. (11)

SCHEIDEGGER J.J.

Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1955, 7, 103. (1) (5)

SØRENSEN M. et HAUGAARD G.

Biochem. Z., 1933, 260, 247. (9)

SPACKMAN D.H., STEIN W.H. et MOORE S.

Anal. Chem., 1958, 30, 1190. (29)(32)

SVENNERHOLM E. et SVENNERHOLM L.

Nature, 1958, 181, 1154. (31)

TILLMANS J. et PHILIPPI K.

Biochem. J., 1929, 215, 36. (8)

VANARKEL E., BALLIEUX R.E. et JORDAN F.L.J.

J. Chromatog., 1963, 11, 421. (4)

WARREN L.

J. Biol. Chem., 1959, 234, 1971. (23)

WHISTLER R.L. et DURSO D.F.

J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 677. (13)

WHITEHOUSE M.W. et BOSTRÖM M.

Biochem. Pharmacol., 1961, 7, 135. (25)

WOODS K.R. et WANG K.T.

Biochem. Biophys. Acta, 1967, 133, 369. (35)