50376
1975
121

N° d'ordre : 520

50376
1975
121

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MÉMOIRE

présenté à l'Université de Lille I

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3e CYCLE EN BIOCHIMIE

par

Anne LAINE - BASSEZ

ETUDE DES PROTEIDES DE LA SECRETION BRONCHIQUE HUMAINE

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

Membres du Jury : M. J. MONTREUIL, Président
M. G. BISERTE, Rapporteur
Mlle G. SPIK,
M. P. DEGAND,
Mme A. HAYEM

Présenté le 15 Mars 1975

UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE

DOYENS HONORAIRES DE L'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES Des Anciennes Facultés de Droit Et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENT HONORAIRE DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

R. DEFRETIN

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. PARREAU.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BLAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORSIN Pierre	Paléontologie
M. DECUYPER Marcel	Géométrie
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Michel	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie

.../...

M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VAILLANT Jean	Analyse
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique Atomique et Moléculaire
Melle MARQUET Simone	Probabilités
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. PANET Marius	Electrotechnique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés d'Enseignement)

M. ADAM Michel	Sciences Economiques
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BOSCQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire

.../...

M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M. COULON Jean	Electrotechnique
Mlle DACCHARI Monique	Géographie
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DRIEUX Baudouin	Informatique
M. DUEE Gérard	Géologie Appliquée
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. FROELICH Daniel	Chimie Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
M. GUIGOU Jean-Louis	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mlle KOSMANN Yvette	Géométrie
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. THERY Pierre	Electronique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TREANTON Jean-René	Sociologie

.../...

M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VILLETTE Michel	Mécanique
M. WERNIER Georges	Informatique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. YVON Jean-Pierre	Analyse Numérique
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Algèbre

A la mémoire de Monsieur le Professeur HAVEZ qui nous accueillit dans son équipe de recherches et nous confia le sujet de ce travail. Nous gardons le souvenir de sa compétence, de son enthousiaste ténacité en recherche et de sa présence toujours aimable.

Ce travail a été réalisé à l'Unité de recherches n°16 sur la Biochimie des Protéines de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Directeur : Professeur Paul BOULANGER) dans l'équipe de Madame HAYEM , sous la direction de Monsieur le Professeur G. BISERTE et de Madame HAYEM , avec l'aide financière de l'I.N.S.E.R.M. (Action thématique n°8) et de la Haute Autorité de la Communauté Européenne du Charbon et de l'Acier (contrat 6244.00.3064)

Que tous ceux qui m'ont accordé leur aide et leur amitié trouvent dans ce travail l'expression de ma reconnaissance .

Ce travail fait l'objet de la publication :

Détermination quantitative des IgA du mucus bronchique humain.
HAYEM A., LAINE A., BAILLEUL V. et LEBAS J.
Clin. Chim. Acta (accepté pour la publication).

Il a déjà fait l'objet de la présentation :

Etude qualitative des protéines du mucus bronchique humain.
LAINE A. et BAILLEUL V.
Forum des Jeunes. Société de Chimie Biologique, Septembre 1974, Montpellier.

et des publications suivantes :

Définition des protéines dans l'expectoration.
HAVEZ R., LAINE A., HAYEM A. et LEBAS J. (1973)
Bull. Phys.-Path. Resp., 9, 219-235.

Techniques de dosage des IgA (Etude critique).
HAVEZ R., HAYEM A., LAINE A., LEBAS J., SERVAIS V. et BONTE M. (1973)
Rev. Franc. Mal. Resp., 1, 877-892.

Il fera l'objet de la présentation :

Proteinase inhibitors in bronchial secretions from patients with alpha-1-antitrypsin deficiency.
LAINE A., LEBAS J. et HAYEM A.
XXIIIrd Colloquium Protides of the Biological Fluids, Brugge.

ABREVIATIONS UTILISEES

Abréviations selon SCHULTZE et HEREMANS (1966)

Alb	:	Sérumalbumine
TrPA	:	Préalbumine
α_1-AGp	:	α_1-glycoprotéine acide
α_1-ATr	:	α_1-antitrypsine
GC	:	α_2-GC-globuline
Hp	:	Haptoglobine
Cer	:	Céruléoplasmine
α_2M	:	α_2-macroglobuline
Tr	:	Transferrine
β_1C	:	β_{1c}-euglobuline
Hpx	:	Hémopexine
pI	:	Point isoélectrique

Autres abréviations

IgA	:	Immunoglobulines A
IgG	:	Immunoglobulines G
IgM	:	Immunoglobulines M
SC	:	Composant sécrétoire des IgA
BrTr	:	Brochotransferrine
α_1AC	:	α_1-antichymotrypsine
Amyl	:	Amylase
US	:	Ultra-sons
IDR	:	Immunodiffusion radiale
EID	:	Electro-immunodiffusion

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION

I . ETUDE QUALITATIVE DES PROTEIDES DU MUCUS BRONCHIQUE HUMAIN

I.A. Matériel d'étude 1

I.A. 1. Variations individuelles de la sécrétion bronchique 1

I.A. 2. Hétérogénéité macroscopique de l'expectoration 1

I.A. 3. Propriétés rhéologiques 1

I.A. 4. Organisation fibrillaire du mucus bronchique 2

I.A. 5. Interactions mucines-protéides 2

I.B. Séparation mucines-protéides 4

I.B. 1. Choix de la méthode: Echange ionique - Ecteola-cellulose 4

I.B. 2. Protocole adopté pour l'élimination des mucines acides et l'extraction des protéides 5

I.B. 3. Elution des constituants fixés sur l'Ecteola-cellulose 5

I.C. Etudes électrophorétiques et immunoélectrophorétiques de l'extrait de mucus bronchique ... 7

I.C. 1. Electrophorèse et immunoélectrophorèse en lame d'agar à pH 8,2 7

I.C. 2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en disques 7

I.C. 3. Immunoélectrophorèse bidimensionnelle. 9

I.D. Identification des plages de précipitation obtenues en double dimension 9

I.D.1. Protéides révélés par l'immunsérum de Lapin anti-protéines sériques. 9

I.D.2. Protéides révélés par des immunsérums anti-sécrétions 14

I.E. Fractionnement de l'extrait de mucus en gel-filtration 21

I.E.1. Etude de la fraction 1 23

I.E.2. Etude de la fraction 2 26

I.E.3. Etude de la fraction 3 26

I.E.4. Etude de la fraction 4 29

I.E.5. Etude de la fraction 5 29

I.E.6. Etude de la fraction 6 29

I.F. Particularités de certains constituants du mucus bronchique 32

I.F.1. Les IgA-globulines des sécrétions bronchiques 32

I.F.2. L'α_1-antitrypsine du mucus 33

I.F.3. Glycoprotéines de point isoélectrique modifié 36

I.F.4. Protéides de masse molaire élevée 36

I.F.5. Bronchotransferrine 36

I.G. Application de la technique de double dimension à l'étude de la sécrétion bronchique de quelques cas particuliers 39

I.G.1. Sécrétion bronchique du fumeur 40

I.G.2. Sécrétion bronchique d'un malade atteint de cancer bronchiolo-alvéolaire 40

I.G.3. Sécrétion bronchique d'un malade présentant un déficit en IgA 40

I.G.4. Sécrétion bronchique d'un malade présentant un déficit partiel en α_1-antitrypsine 40

II . ESTIMATION QUANTITATIVE DES IgA ET DE LA SERUM-ALBUMINE DANS LE MUCUS BRONCHIQUE HUMAIN

II.A. Méthode de dosage 46

II.A.1. Préparation des gammes-étalons 46

II.A.2. Immunsérums utilisés 49

II.B. Homogénéisation du mucus 50

II.B.1. Procédés d'homogénéisation et de liquéfaction du mucus bronchique mis en oeuvre par d'autres auteurs ...50

II.B.2. Mise au point d'une technique d'homogénéisation 52

II.C. Caractéristiques du mucus homogénéisé 57

II.C.1. Etudes de la rhéologie du mucus ... 57

II.C.2. Cytologie 57

II.C.3. pH du mucus homogénéisé 59

II.C.4. Capacité d'échange ionique 59

II.C.5. Critères électrophorétiques 59

II.D. Etape d'échange ionique 59

II.D.1. Protocole 59

II.D.2. Etude de l'extrait de mucus homogénéisé 65

II.D.3. Elution des constituants fixés sur l'Ecteola-cellulose 67

II.E. Dosages des IgA-globulines et de la sérum-albumine du mucus bronchique humain 73

II.E.1. Reproductibilité de l'extraction par Ecteola-cellulose 73

II.E.2. Reproductibilité de l'homogénéisation 75

II.E.3. Expériences de surcharge en protéines d'un mucus 75

II.E.4. Valeurs obtenues pour les dosages des IgA globulines et la sérumalbumine ..80

II.F. Etude critique des dosages 84

II.F.1. Comparaison de nos résultats avec les travaux d'autres auteurs 84

II.F.2. Critiques de notre méthode 87

II.F.3. Choix d'autres paramètres 88

II.G. Premières corrélations entre méthodes rhéologiques et biochimiques et fonction d'épuration de la sécrétion bronchique 92

II.G.1. Relations des protéides et mucines bronchiques avec les propriétés rhéologiques 92

II.G.2. Etude rhéologique et biochimique de la sécrétion bronchique, lien avec l'état infectieux bronchique et la fonction respiratoire..... 93

CONCLUSION 96

BIBLIOGRAPHIE 100

INTRODUCTION

Parmi les moyens de défense de l'appareil respiratoire, l'épuration broncho-pulmonaire joue un rôle prépondérant. La sécrétion trachéobronchique est un véritable filtre mobile dont les caractères visco-élastiques sont essentiels à son entraînement par les cils vibratiles, sa qualité d'épurateur est donc étroitement liée à ses propriétés rhéologiques.

Depuis plusieurs années, les liens étroits entre le caractère visqueux de l'expectoration et la présence d'acide N-acétylneuraminique ont été mis en évidence par plusieurs auteurs (ATASSI et coll., 1959 ; MUNIES et coll., 1968 ; KEAL, 1970). Le rôle des sialomucines sur les propriétés élastiques de l'expectoration a été également souligné. Par ailleurs, le dosage des protéides de l'expectoration a été abordé pour rechercher des relations éventuelles avec l'état inflammatoire de la muqueuse bronchique des malades (MEDICI et coll., 1971) ou des relations avec la spécificité des anticorps du mucus bronchique (REYNOLDS et coll., 1973).

Les chercheurs de notre laboratoire en liaison avec l'équipe de Monsieur le Professeur SADOUL de Nancy et en particulier Madame PUCHELLE, tentent, d'une façon originale, de mettre en évidence des relations entre les caractères visco élastiques de l'expectoration, la teneur en protéides (d'origine plasmatique et locale) et l'importance des différentes classes de mucines.

Le but que Monsieur le Professeur HAVEZ avait fixé à notre travail était de mettre au point une technique de dosage des constituants protéiques du mucus bronchique, pour essayer ensuite d'établir des corrélations entre les teneurs en ces constituants et les qualités rhéologiques du mucus. Avant de choisir les paramètres qui pourraient faire l'objet des dosages, il était nécessaire d'établir le bilan des protéides présents dans le mucus. Notre étude s'est limitée aux constituants protéiques et glycoprotéiques de l'expectoration.

I. ETUDE QUALITATIVE DES PROTEIDES DU MUCUS BRONCHIQUE HUMAIN

I.A. Matériel d'étude

I.B. Séparation mucines protéides

I.C. Etudes électrophorétiques et immunoélectrophorétiques de l'extrait de mucus bronchique

I.D. Identification des plages de précipitation obtenues en double dimension

I.E. Fractionnement de l'extrait de mucus en gel-filtration

I.F. Particularités de certains constituants du mucus bronchique

I.G. Application de la technique de double dimension à l'étude de la sécrétion bronchique de quelques cas particuliers

I.A. Matériel d'étude

L'étude de la sécrétion bronchique normale qui tapisse la muqueuse bronchique chez le sujet sain est pratiquement impossible car cette sécrétion n'est pas expectorée. Elle ne peut être obtenue qu'en très faible quantité par broncho-aspiration mais la simple irritation dûe à l'introduction du bronchoscope peut déclencher une hypersécrétion réactionnelle (BISERTE et coll. , 1963).

Aussi les études portent-elles généralement sur les hypersécrétions.

I.A.1. Variations individuelles de la sécrétion bronchique

L'étude biochimique de la sécrétion bronchique se heurte donc dès l'abord à des problèmes qui tiennent à la variation de l'hypersécrétion d'un sujet à l'autre : en effet, les hypersécrétions varient de la sécrétion matinale du fumeur à l'expectoration épaisse de l'asthmatique en crise et à l'hydrorrhée fluide de certains bronchitiques chroniques.

I.A.2. Hétérogénéité macroscopique de l'expectoration

L'observation macroscopique d'une sécrétion bronchique permet de constater son caractère particulièrement hétérogène. L'élément visqueux, le mucus géliforme, est associé en proportion variable à des liquides transsudés des capillaires et à de la salive ; il peut être contaminé par du pus.

L'étude au microscope électronique effectuée par WHITE et coll. (1954) sur des expectorations d'asthmatiques, met en évidence la présence de filaments incorporés dans une phase aqueuse qui renferme les composants solubles de la sécrétion.

I.A.3. Propriétés rhéologiques

La caractéristique fondamentale de la sécrétion bronchique est d'être, selon une terminologie vague, visqueuse. En fait, cette sécrétion réunit à elle seule plusieurs modalités d'écoulement (PUCHELLE et coll., 1971). Ce milieu, rhéologiquement complexe, est un fluide inhomogène, non newtonien, visco-plastique, visco-élastique et très sensible au cisaillement. Il est caractérisé par des propriétés d'écoulement et de déformation hautement non linéaires et dépendantes du temps.

Ce caractère de visco-élasticité de la sécrétion bronchique est à l'origine de l'un des problèmes techniques majeurs auxquels nous avons été confrontée : en effet, toute étude directe par les méthodes électrophorétiques classiques ou tout fractionnement direct par la méthode de gel filtration s'avère impossible.

I.A.4. Organisation fibrillaire du mucus bronchique

Les propriétés du mucus bronchique dont le rôle principal est de collecter, transporter et éliminer hors des voies respiratoires, les particules étrangères inhalées, reposent sur son organisation fibrillaire.

Même débarassé de ses composants solubles par lavage à l'eau désionisée, le réseau fibrillaire conserve son organisation macromoléculaire (BISERTE et coll., 1963).

D'un point de vue biochimique, la sécrétion bronchique se caractérise par sa richesse en glycoprotéines de sécrétion ou mucines qui lui confèrent une aptitude remarquable de captation de l'eau. Les mucines représentent l'élément fondamental du réseau fibrillaire. Parmi les composants "mineurs" que l'on retrouve dans la phase géliforme après lavage figurent plusieurs protéines et glycoprotéines (HAVEZ et coll. 1967-b) : IgA-globulines, transferrine bronchique, sérumalbumine, kallicréine, lysozyme.

Le mécanisme qui préside à l'apparition de la structure fibrillaire n'est pas encore connu. La bronchotransferrine et les IgA sont certainement impliquées avec les mucines dans la formation du réseau fibrillaire; mais, à partir de ces éléments, la reconstitution "in vitro" d'un liquide possèdant des propriétés rhéologiques identiques à celles d'un mucus "natif" n'a pas encore été possible.

I.A.5. Interactions mucines-protéides

L'étude et le bilan des protéides du mucus (phase géliforme et phase aqueuse) nécessitent la suppression préalable des liaisons qui existent entre mucines et protéides.

Dès 1964, DEGAND a précisé les forces de cohésion et les liaisons chimiques pouvant intervenir dans l'organisation et la structure du mucus bronchique.

Il existe : - des forces de cohésion relativement faibles, sensibles à l'hydratation, au pH, à l'environnement ionique, aux sels minéraux

(liaisons hydrogène et saline)

- des valences homopolaires qui s'établissent entre deux fonctions thiols de la cystéine, par exemple, pour former un pont disulfure sensible à la réduction.

- des liaisons de covalence caractérisées par leur stabilité (liaisons glucide-protéide, glycosidique, peptidique) mais néanmoins sensibles à certains enzymes spécifiques (enzymes protéolytiques, neuraminidase, lysozyme).

I.A.5.a. Identification des constituants impliqués dans la formation des ponts disulfure

Préoccupés par des problèmes de médication à visée mucolytique, GERNEZ-RIEUX et coll. (1964) ont étudié l'activité "in vitro" de différents agents réduisant la viscosité de l'expectoration. Ils constatent que les agents réducteurs (L-cystéine, N-acétyl cystéine) diminuent de manière importante la viscosité apparente des sécrétions.

En 1970, HAVEZ et coll. précisent le mode d'action biochimique des dérivés de la cystéine sur le mucus bronchique. Leur étude porte sur la phase géliforme du mucus. Pour déterminer la nature des composants sensibles à l'action de l'agent réducteur, le mucus fibrillaire est réduit par la cystéine 0,075 M pendant 5 heures. Le blocage des groupes thiols libérés est ensuite effectué par addition d'iodoacétamide marqué au ^{14}C. Après séparation chromatographique des constituants du mucus, la plus grande partie de la radioactivité est localisée dans une fraction principalement constituée par les protéines du type bronchotransferrine, IgA et sérumalbumine. HAVEZ et coll. déduisent de ces résultats que l'action directe d'un agent réducteur porte sur les protéines du mucus fibrillaire et n'intéresse pas le groupe des mucines bronchiques. Certaines protéines riches en ponts disulfure (sérumalbumine : 35 ponts disulfure, lactotransferrine : 32 ponts, IgA_s : 78 ponts) sont donc indispensables à la formation des points d'union interfibrillaire. Elles constitueraient les éléments de cohésion captés par la matrice mucinique.

I.A.5.b. Mucines bronchiques : échangeurs d'ions

Les qualités d'échangeur d'ions des mucines bronchiques ont été étudiées par DEGAND (1972) · Reprenant la méthode spectrophoto-

métrique décrite par OHKUMA (1970) pour l'étude des modifications du spectre du bleu de toluidine fixé sur les substances M et N, DEGAND a précisé les mécanismes d'échanges protéines-colorant ou peptides-colorant sur les diverses classes de mucines ou de glycopeptides bronchiques. Les spectres d'absorption des mélanges glycopeptides-colorant mettent nettement en évidence l'affinité des glycopeptides carboxyliques et sulfatés pour le bleu de toluidine. Les propriétés d'échangeur de cations des mucines ont été étudiées en fonction de la possibilité de fixation des protéines ou des glycoprotéines. L'addition de lactotransferrine ou d'IgA bronchiques modifient les modalités de fixation du colorant sur les glycopeptides. De plus DEGAND a démontré que le rôle d'échangeur de cations des mucines poly anioniques bronchiques n'apparaît que dans des conditions précises d'ionisation ou de force ionique de la solution.

I. B. Séparation mucines-protéides

I.B.1. Choix de la méthode

Dans l'organisation de la structure fibrillaire interviennent des valences homopolaires qui s'établissent entre 2 fonctions thiols de la cystéine. Une dissociation de cette structure peut être obtenue par simple réduction du mucus (cystéine 0,075 M ou mercapto-éthanol à la concentration de 1 p. 100 v/v). Mais les résultats de HAVEZ et coll (1970), rappelés précédemment, nous ont fait éviter l'emploi de cette méthode : en effet, seuls les protéides semblent touchés par la réduction.

Bien que les propriétés d'échangeur d'ions des mucines polyanioniques ne furent démontrées que récemment par DEGAND (1972), l'utilisation de la DEAE-cellulose permettait, dès 1963, à CUVELIER d'obtenir un fractionnement des composants du mucus préalablement traité par l'urée 6 M. ROUSSEL (1965) établit que, même en l'absence d'urée, le simple pouvoir d'échange ionique de la DEAE-cellulose s'avère suffisant pour désorganiser l'architecture macromoléculaire du mucus bronchique natif.

L'échange ionique permet donc de séparer les différents constituants de la sécrétion. Toutefois les problèmes techniques dûs à l'utilisation de la DEAE-cellulose (tels que changement de volume de l'échangeur avec la force ionique du tampon d'élution, faible vitesse d'élution des colonnes) nous ont fait

préférer l'Ecteola-cellulose, qui est un échangeur faiblement basique, moins agressif que la DEAE-cellulose.

I.B.2. Protocole adopté pour l'élimination des mucines acides et l'extraction des protéides.

La mise en contact du mucus avec l'échangeur d'ion est effectuée par la technique de "batch-adsorption" . L'Ecteola-cellulose préalablement régénérée est équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 0,01 M de pH 7,5 contenant 0,15 M NaCl, identique à celui qui est utilisé par LIEBERMAN (1970) sur le mucus de la poche trachéale de Chien. Elle est soumise à une centrifugation de 15 minutes à 6500 tours/minute; le surnageant est éliminé.

Les proportions utilisées sont les suivantes : à 1 ml de mucus on ajoute 1 g d'Ecteola-cellulose humide (de capacité 0,33 mEq/g sec) , puis 2 ml de tampon phosphate de sodium 0,01 M , NaCl 0,15 M de pH 7,5 . Ce mélange est agité pendant une heure à 4 °C et la suspension est centrifugée à 6 500 tours/minute pendant 15 minutes.

Ce protocole a été appliqué à 280 ml d'expectoration d'un malade atteint de bronchite chronique. Nous obtenons un surnageant trouble qui ne présente plus les propriétés rhéologiques du mucus de départ . Nous appelons "extrait" de mucus cette solution surnageante qui est conservée à +4°C en vue de son étude.

I.B.3. Elution des constituants fixés sur l'Ecteola-cellulose

Il nous semblait intéressant de vérifier que l'Ecteola-cellulose élimine bien les mucines polyanioniques présentes dans le mucus bronchique. Nous avons donc choisi d'éluer l'Ecteola-cellulose par la solution H Cl 0,01 N, NaCl 0,7 M qui devrait permettre la récupération simultanée des sialomucines et des sulfomucines (DEGAND , 1972) .

Le culot d'Ecteola-cellulose obtenu après centrifugation à la fin du protocole d'extraction des protéides du mucus est remis en suspension dans le tampon phosphate de sodium 0,01 M , NaCl 0,15 M de pH 7,5 et

lavé abondamment sur verre fritté avec ce même tampon jusqu'à ce que l'effluent n'absorbe plus à 278 nm . Une élution en colonne est impossible, car il se produit un colmatage dès que débute le passage de la solution HCl 0,01 N, NaCl 0,7 M.

L' Ecteola-cellulose est donc agitée dans un erlen-meyer avec un volume d' HCl 0,01 N , NaCl 0,7 M égal au volume de mucus de départ. Après 15 minutes d'agitation à 4 °C , le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 6 500 tours / minute et le surnageant est recueilli. L'opération est renouvelée une fois . Les surnageants rassemblés sont dialysés quatre jours contre de l'eau désionisée, puis lyophilisés.

Les électrophorèses en lames d'agarose nous ont permis de constater la richesse en glycoprotéines de ce matériel élué de l'Ecteola-cellulose . Cependant il persiste une contamination protéique. Une étape supplémentaire de purification serait donc nécessaire. Mais la poudre obtenue est difficile à redissoudre et lors de la chromatographie de gel-filtration entreprise sur colonne de Sepharose 2 B , la colonne se colmate. Nous n'avons pas poursuivi ce protocole de purification des mucines polyanioniques dont la présence dans le matériel élué de l'Ecteola-cellulose par HCl 0,01 N, NaCl 0,7 M a néanmoins été observée .

I. C. Etudes électrophorétiques et immunoélectrophorétiques de l'extrait de mucus bronchique.

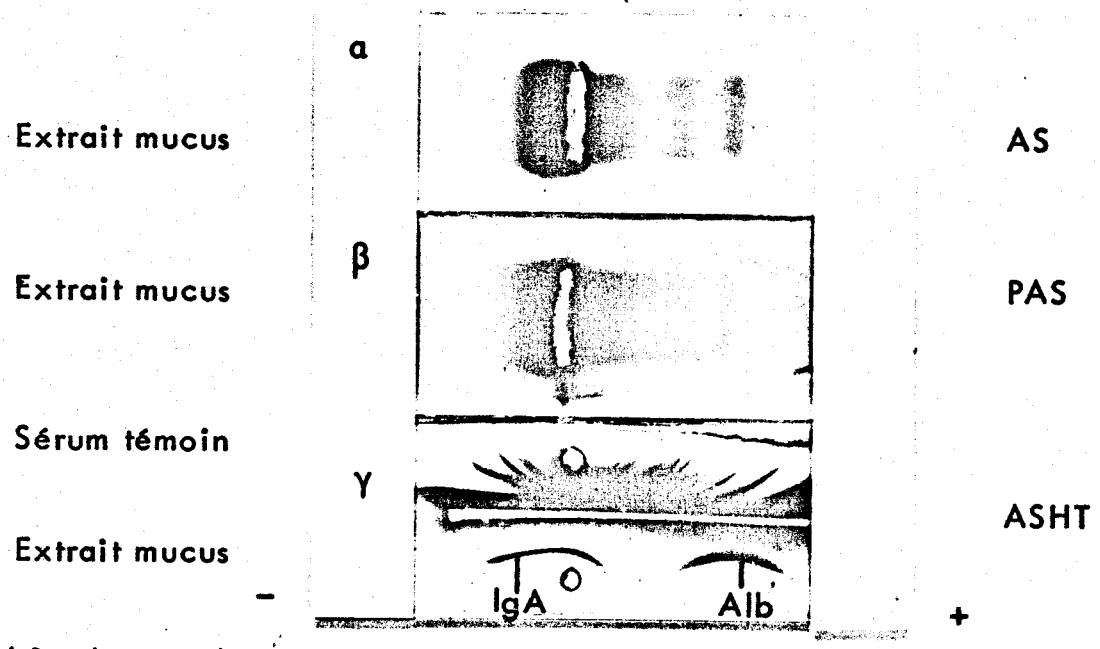
I.C.1. Electrophorèse et immunoélectrophorèse en lame d'agar à pH 8,2.

Ces techniques ne donnent pas de résultats satisfaisants car la concentration en protéides de l'extrait de mucus est trop faible. En électrophorèse une fraction de mobilité identique à celle de la sérumalbumine et deux autres fractions, l'une dans la zone des alpha-globulines et l'autre dans la zone des gamma-globulines y sont décelées (fig. I.C.1 - α et β). L'immunoélectrophorèse effectuée avec un immunsérum de Lapin anti-sérum humain total (Behring) permet seulement d'identifier la sérumalbumine et les IgA-globulines (fig. I.C.1 - γ). D'autre part, nous devons éviter la lyophilisation qui donne une poudre difficile à dissoudre. Nous avons donc recherché des techniques plus sensibles pour l'étude directe de l'extrait de mucus bronchique.

I.C.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en disques.

Les dépôts sont de 75 µl pour les extraits de mucus et de 3 µl pour le sérum témoin. Le nombre de bandes est variable selon les mucus (fig. I.C.2). La sérumalbumine est repérée par comparaison avec la migration d'un sérum témoin (gel α). Une technique de révélation spécifique permet d'identifier les quatre isoamylases bien visibles dans le mucus du gel β. Les gels γ et δ illustrent la richesse en protéides que peuvent présenter certains mucus. Deux populations d'IgA de masses molaires différentes ont pu être identifiées dans les sécrétions bronchiques. Après la migration en gel de polyacrylamide, le gel est inclus dans de l'agarose contenant des anticorps anti-chaîne α : un arc de précipitation à double courbure est obtenu, correspondant aux deux bandes observées en électrophorèse en gel de polyacrylamide. Dans le gel ε ces deux bandes sont particulièrement nettes.

L'emploi de cette technique permet la mise en évidence des variations de composition d'un mucus à l'autre ; mais l'identification des protéides est limitée.

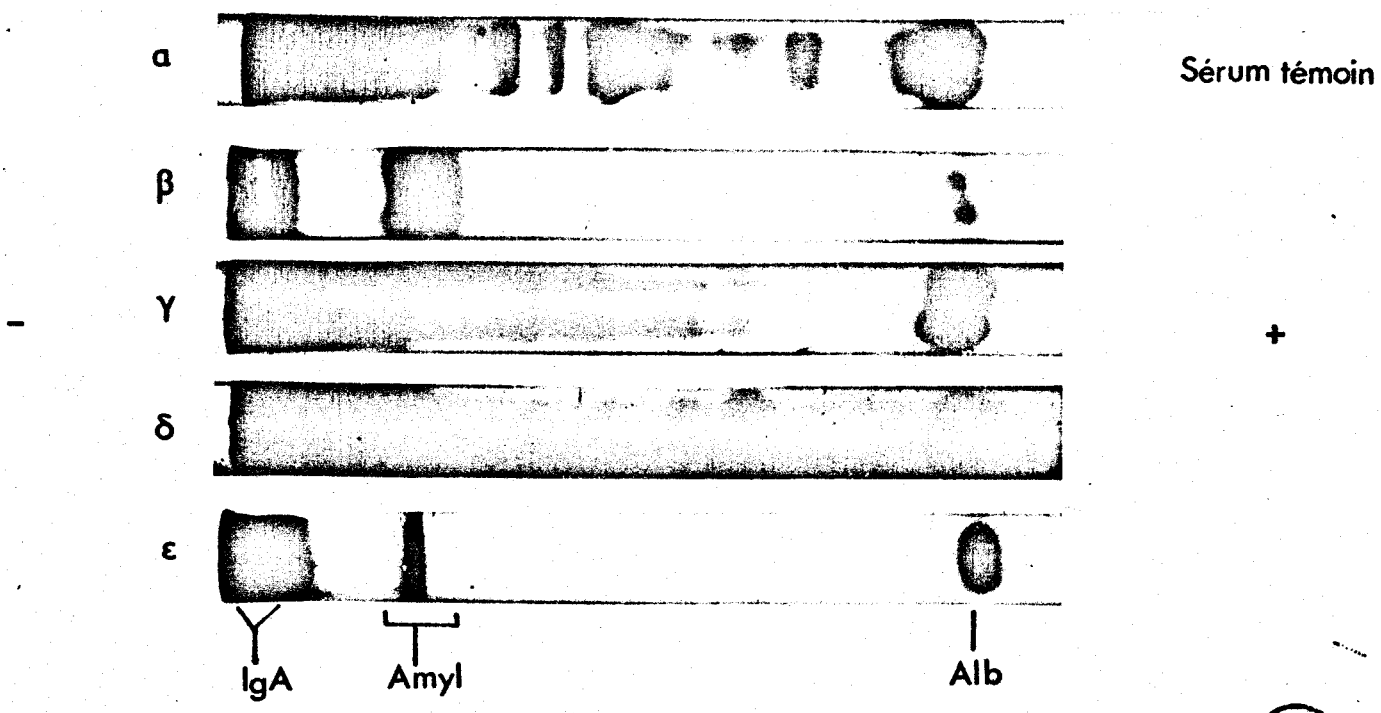


AS : Amidoschwarz

PAS : Coloration par le réactif de Schiff après oxydation periodique.

ASHT : Immunsérum de Lapin anti-sérum humain total.

Figure I.C.1 : ETUDE ELECTROPHORETIQUE ET IMMUNOELECTROPHORETIQUE DE L' EXTRAIT DE MUCUS .EN LAMES D'AGAR .



BUS LILLE

Figure I.C.2 : ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.

(voir texte p 7)

I.C.3. Immunoélectrophorèse bidimensionnelle.

Cette technique est fondée sur la migration électrophorétique des antigènes dans un gel contenant des anticorps et sur une immuno-précipitation spécifique de ces antigènes par l'emploi des anticorps précipitants correspondants. Ce principe fut introduit par BUSSARD (1959) et RESSLER (1960-a;1960-b). Reprise par LAURELL (1965-1966) et CLARKE et coll. (1967) cette technique est actuellement très utilisée. L'un des intérêts majeurs de cette méthode réside dans le fait qu'elle donne de bons résultats pour des concentrations très faibles en antigène et en anticorps. Toutefois, le rapport Ag/Ac doit être déterminé dans chaque cas. Nous avons choisi cette technique pour l'étude plus approfondie de la sécrétion bronchique.

I. D. Identification des plages de précipitation obtenues en double dimension.

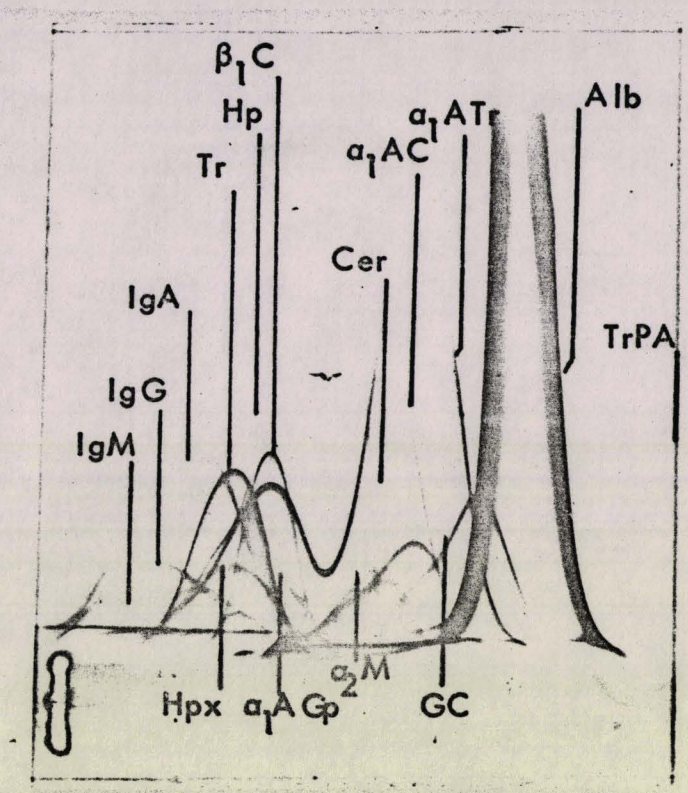
Lorsque l'on dispose d'immunsérums spécifiques et de protéines purifiées l'utilisation des différentes adaptations de l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle (partie technique p.T.8,9,10), permet l'identification de la plupart des plages de précipitation obtenues avec les immunsérums plurispécifiques.

Nous nous sommes tout d'abord attachée à identifier les plages de précipitation obtenues avec l'immunsérum anti-protéines sériques. Puis nous avons recherché ce que l'emploi d'immunsérums anti-sécrétions tel que anti-lait, anti-salive de parotide, anti-salive totale pouvait apporter comme caractérisation supplémentaire. Nous avons également préparé des immunsérums chez le Lapin, avec des fractions de mucus. Pour obtenir des diagrammes de double dimension dont les arcs sont bien marqués sans devoir effectuer des dépôts volumineux nous avons concentré six fois l'extrait de mucus à l'aide de l'appareil Diaflo, sous pression d'azote (membrane UM 2).

I.D.1. Protéides révélés par l'immunsérum de Lapin anti-protéines sériques

I.D.1.a Résultats expérimentaux.

La double dimension obtenue en déposant 30 µl de l'extrait de mucus bronchique concentré six fois et en incluant dans le gel de la deuxième dimension, 300 µl d'immunsérum de Lapin anti-sérum humain total est représentée sur la Fig. I.D.1.a; elle constitue la plaque témoin. La plupart



(L'extrait de mucus a été concentré 6 fois sur appareil Diaflo)

Figure I.D.1.a' : IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE D' UN EXTRAIT DE MUCUS AVEC L' IMMUNSERUM DE LAPIN ANTI-SERUM HUMAIN TOTAL (Technique de LAURELL)

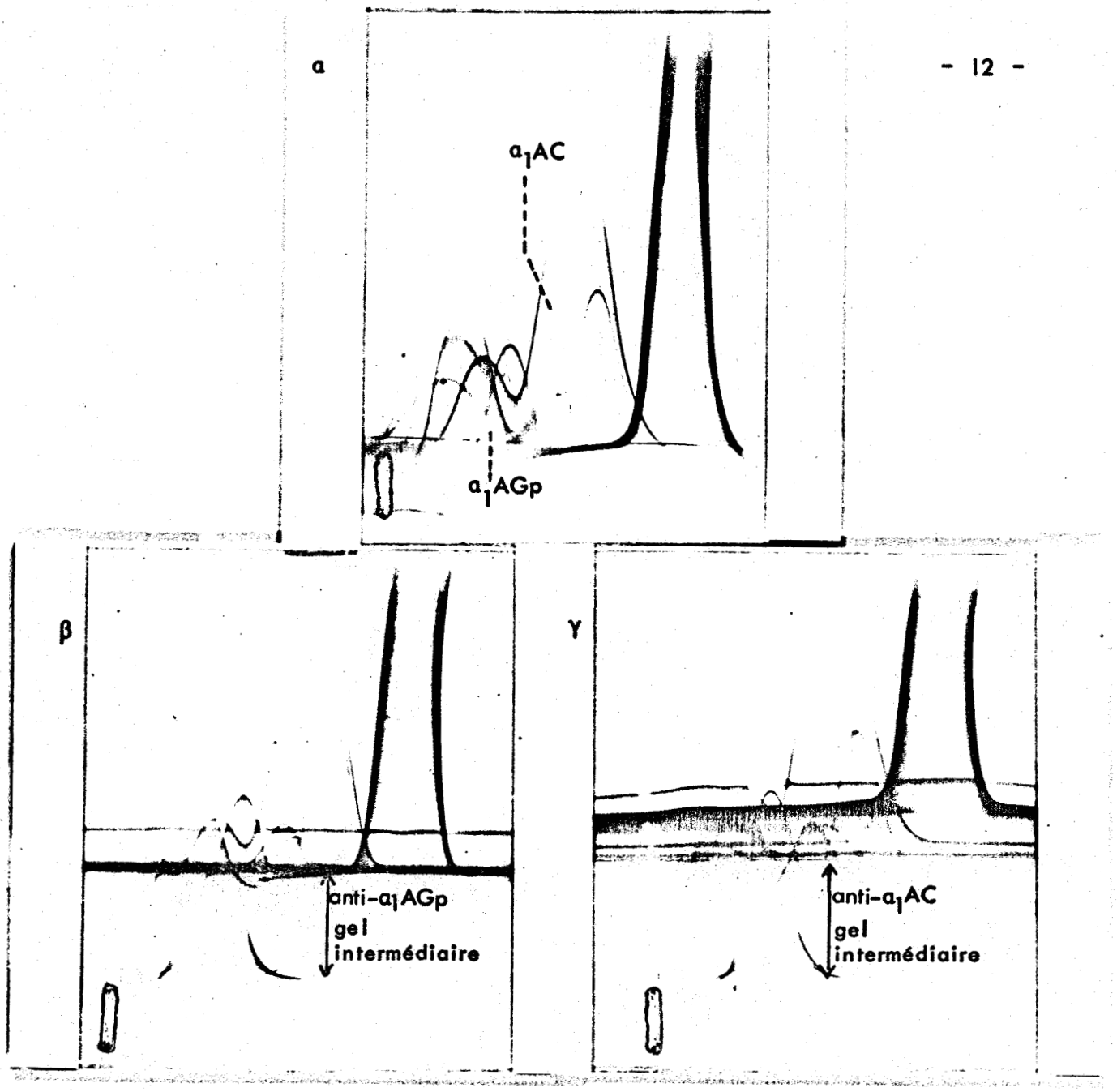
BUS LILLE

des arcs ont été identifiés en utilisant les immunsérums spécifiques et en comparant la plaque ainsi obtenue avec la plaque témoin. 15 protéides sont identifiés dans ce diagramme : les IgA-globulines, les IgG-globulines, les IgM-globulines, la transferrine, l'hémopexine, l'haptoglobine, la β_{1c}-euglobuline, la céruléoplasmine, l'α_2-macroglobuline, l'α_2-GC-globuline, l'α_1-antitrypsine, l'α_1-glycoprotéine acide, l'α_1-antichymotrypsine, l'albumine et la préalbumine. Il faut signaler que l'α_1-antitrypsine apparaît sous la forme d'un arc à double courbure.
Pour l'α_1-antichymotrypsine et l'α_1-glycoprotéine acide, nous avons utilisé la technique du gel intermédiaire de AXELSEN et coll. (1972) (voir partie technique p.T.10). En effet, ces deux glycoprotéines se trouvent très proches l'une de l'autre dans le diagramme et l'identification par superposition de plaques est délicate. (voir Figure I.D.1.a"). L'existence dans le diagramme témoin d'arcs à double courbure rend délicate l'utilisation de la technique du "tandem" de KROLL (1968-1969)(voir partie technique p.T.8) qui constitue généralement un bon moyen d'identification. Nous l'avons utilisée au paragraphe I.D.2.a, p.14.

I.D.1.b Bilan.

La présence de protéines sériques dans la sécrétion bronchique avait été signalée dès 1960 par BROGAN qui avait mis en évidence la sérumalbumine dans la phase géliforme du mucus. En 1963, BISERTE et coll. identifient dans la phase soluble outre la sérumalbumine, les IgG, les IgA, la transferrine, la β_{1c}-euglobuline, l'α_1-antitrypsine, l'haptoglobine, l'α_2-macroglobuline, l'α_1-glycoprotéine acide. Les auteurs indiquaient déjà des variations notables d'un sujet à l'autre. Travaillant sur le surnageant obtenu après ultra-centrifugation du mucus (118000 g pendant 4 heures) RYLEY (1970), BROGAN et coll. (1971) identifient par immunoélectrophorèse de l'hémopexine, de l'α_2HS- glycoprotéine et de la préalbumine (la présence de ces deux derniers constituants n'est pas constante). En 1973, RYLEY et coll. signalent la présence d'α_1-antichymotrypsine. Nous mettons également cette glycoprotéine en évidence dans l'extrait de mucus.

En 1973 (HAVEZ et coll.) , nous avons pu identifier les IgM, la céruléoplasmine et l'α_2-GC-globuline en plus des autres composants déjà cités. La plupart des plages obtenues avec l'immunsérum de Lapin anti-sérum humain total peuvent être identifiées. Le fibrinogène n'a été caractèrisé que par l'emploi de l'immunsérum de Lapin spécifique .



α : plaque témoin effectuée avec l'immunsérum de Lapin anti-sérum humain total.
β:: la bande de gel intermédiaire contient l'immunsérum de Lapin anti-α_1-glycoprotéine acide. Le reste de la plaque est recouvert avec de l'agarose contenant l'immunsérum de Lapin anti-sérum humain total (ASHT).
γ : la bande de gel intermédiaire contient l'immunsérum de Lapin anti-α_1-antichymotrypsine. Le reste de la plaque est recouvert avec de l'agarose contenant ASHT.

Figure I.D.1d" IDENTIFICATION DE L' α_1-GLYCOPROTEINE ACIDE ET DE L'α_1-ANTICHYMOTRYPSINE PAR UTILISATION DE LA TECHNIQUE DU " GEL INTERMEDIAIRE " (β et γ) (voir partie technique p. T.10)

BUS LILLE

Jusqu'à présent, nous n'avons pu mettre en évidence ni l'a_2-HS-glycoprotéine, ni la β_2II-glycoprotéine; nous n'avons caractérisé aucune lipoprotéine que ce soit par la coloration au noir Soudan de la plaque obtenue en double dimension avec l'immunsérum de Lapin anti-sérum humain total ou par l'emploi des immunsérums de Lapin spécifiques de l'a_1-lipoprotéine et de la β-lipoprotéine.

HOCHSTRASSER et coll. (1972-a) ont décrit dans le mucus bronchique humain un inhibiteur de protéases ayant une masse molaire faible (M : 13 000 g). Ensuite, ces auteurs (HOCHSTRASSER et coll., 1973-a) identifient cet inhibiteur au fragment actif de l'inter-a-trypsine-inhibiteur, qui possède le déterminant antigénique de ce constituant. Nous ne l'avons pas encore révélé dans les extraits de mucus : ceci est peut-être dû à notre mode de préparation de l'extrait de mucus qui diffère beaucoup de celui de HOCHSTRASSER et coll. . Ces auteurs éliminent les constituants de masse molaire élevée par précipitation par l'acide perchlorique (concentration finale : 5 p. 100). Après neutralisation par KOH et élimination du précipité par centrifugation, l'inhibiteur de masse molaire faible est mis en évidence dans le surnageant. Nous avons appliqué ce protocole aux extraits de mucus, mais, dans le surnageant obtenu, aucun constituant ayant des caractères antigéniques de l'inter-a-trypsine -inhibiteur n'a été retrouvé. Le tampon que nous utilisons lors de l'échange ionique par lequel nous débutons le protocole d'extraction ne nous permet peut-être pas d'éluer ce constituant. Peu de détails sont indiqués par les auteurs sur le comportement de cet inhibiteur en chromatographie d'échange ionique. HOCHSTRASSER et coll. (1973-b) procèdent ensuite à l'isolement d'un inhibiteur de protéases de masse molaire supérieure (M : 20 000 g) qui, lui aussi, présente des caractères antigéniques communs avec ceux de l'inter-a-trypsine-inhibiteur. La purification de ce constituant nécessite une étape de chromatographie d'échange ionique sur DEAE-cellulose, mais le tampon utilisé pour l'élution de l'inhibiteur n'est pas précisé.

Dans chacun des 80 mucus que nous avons étudiés, nous avons pu mettre en évidence l'a_2-macroglobuline, alors que RYLEY et coll. (1973) ne la caractérisent que dans un mucus sur 30 .

De nombreux protéides sériques sont donc présents dans l'expectoration d'un malade atteint de bronchite chronique. Nous verrons ultérieurement (paragraphe I.F.) les particularités observées pour certains de ces constituants sériques.

I.D.2. Protéides révélés par des immunsérums anti-sécrétions

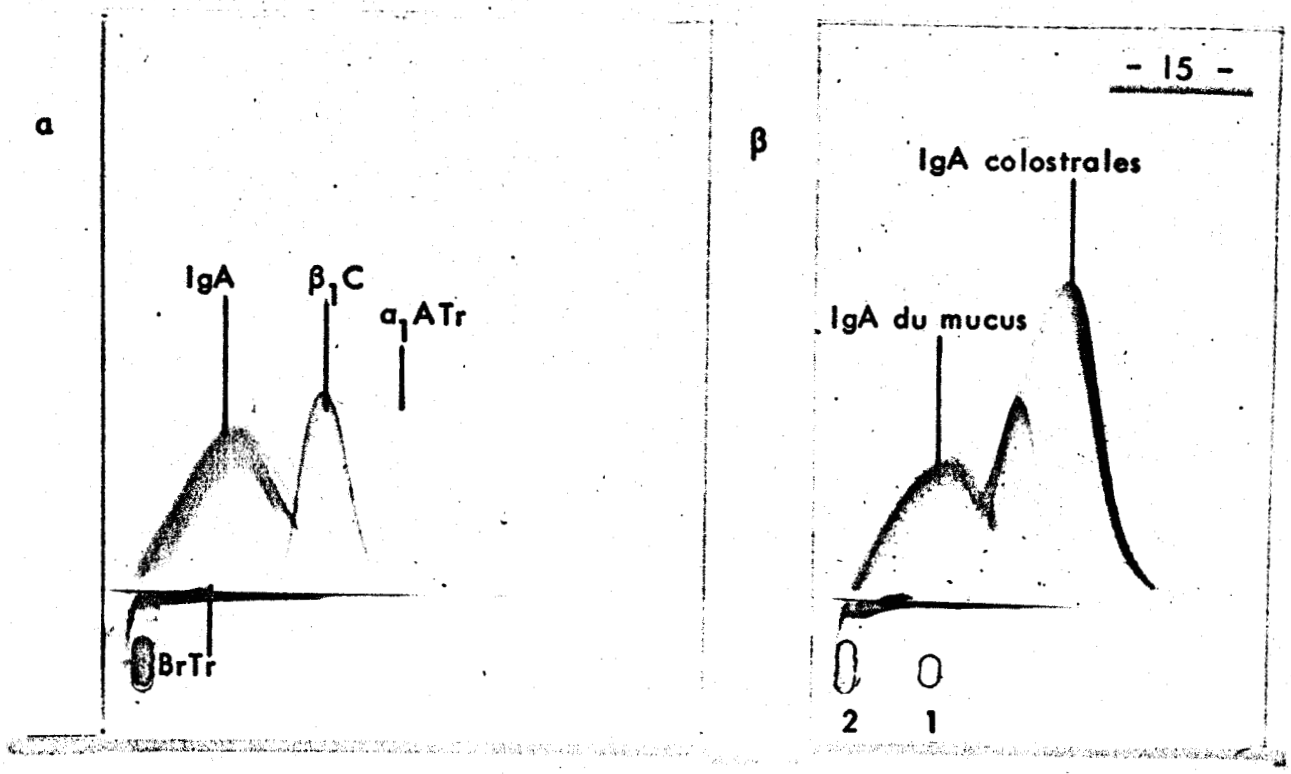
Nous avons utilisé plusieurs types d'immunsérums anti-sécrétions.

I.D.2.a. Immunsérum de Chèvre anti-lait humain (Kallestad)

Quatre arcs sont révélés dans les extraits de mucus (fig. I.D.2.a.a). L'utilisation de la technique dite du "tandem" (de KROLL, 1968-1969) (voir partie technique p.T.8) en déposant en avant du dépôt de l'extrait de mucus une solution d'IgA colostrales purifiées (Fig. I.D.2.a'- α et β) permet l'identification de l'arc des IgA-globulines. Les arcs de la β_{1c}-euglobuline et de l'α_1-antitrypsine sont identifiés avec des immunsérums spécifiques. Après saturation de l'immunsérum avec du sérum humain (100 µl de sérum pour 500 µl d'immunsérum) un seul arc subsiste. L'utilisation d'un immunsérum de Lapin anti-lactotransferrine (Nordic) (fig. I.D.2.a")nous permet de montrer qu'il s'agit d'un constituant possèdant des déterminants antigéniques communs à ceux de la lactotransferrine. Nous l'appellerons cependant avec réserve transferrine bronchique ou bronchotransferrine (Br Tr) puisqu'une communauté antigénique entre deux constituants n'est pas un critère suffisant d'identité de deux molécules. Il faudrait qu'après purification de la bronchotransferrine, étape délicate étant donnéela complexité du milieu étudié, ce constituant ait une masse molaire , une composition en acides aminés et en sucres et enfin un "finger print" identiques à ceux de la lactotransferrine.

I.D.2.b. Immunsérum de Lapin anti-salive de parotide humaine.

Nous avons préparé cet immunsérum chez le Lapin (voir partie technique T.14) avec de la salive de parotide humaine obtenue par stimulation. La salive est centrifugée pendant 10 minutes à 1 500 tours/minute, dialysée quatre jours contre de l'eau désionisée et lyophilisée. Cet immunsérum révèle quatre arcs dans l'extrait de mucus (fig. I.D.2.b) L'amylase est identifiée par la révélation spécifique (technique de HIRSCH - MARIE et coll., 1964) (voir partie technique T.19). Il ne s'agit pas d'une contamination par l'amylase de la salive :



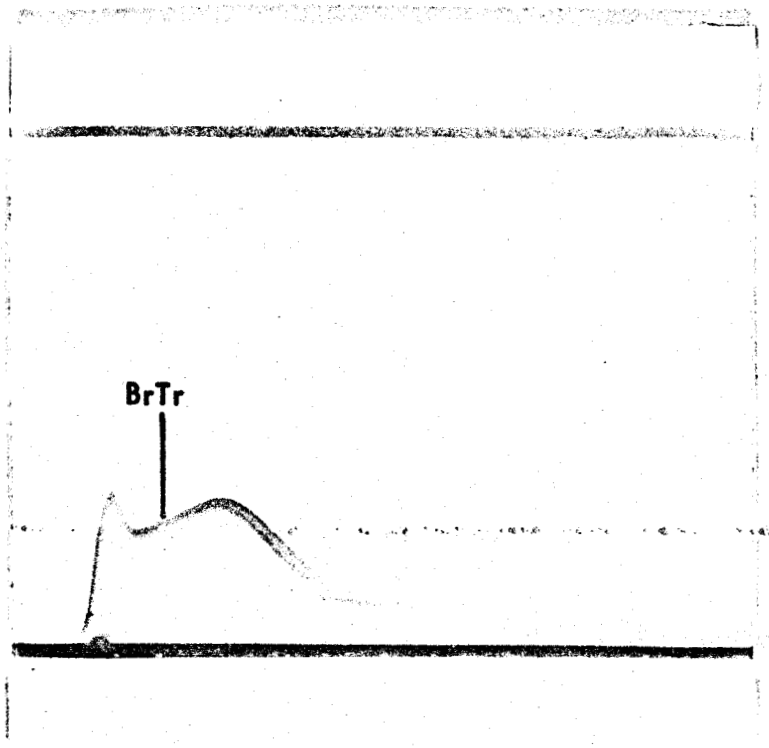
α : Extrait de mucus bronchique.

β : "Tandem" (voir partie technique p: T.8)

1: solution d'IgA colostrales purifiées.

2: extrait de mucus

Figure I.D.2.a' : IMMUNOELECTROPHORESES BIDIMENSIONNELLES AVEC L'IMMUNSERUM DE CHEVRE ANTI-LAIT HUMAIN.



BUS LILLE

Figure I.D.2.a" : IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE DE L'EXTRAIT DE MUCUS AVEC L'IMMUNSERUM DE LAPIN ANTI-LACTOTRANS FERRINE HUMAINE

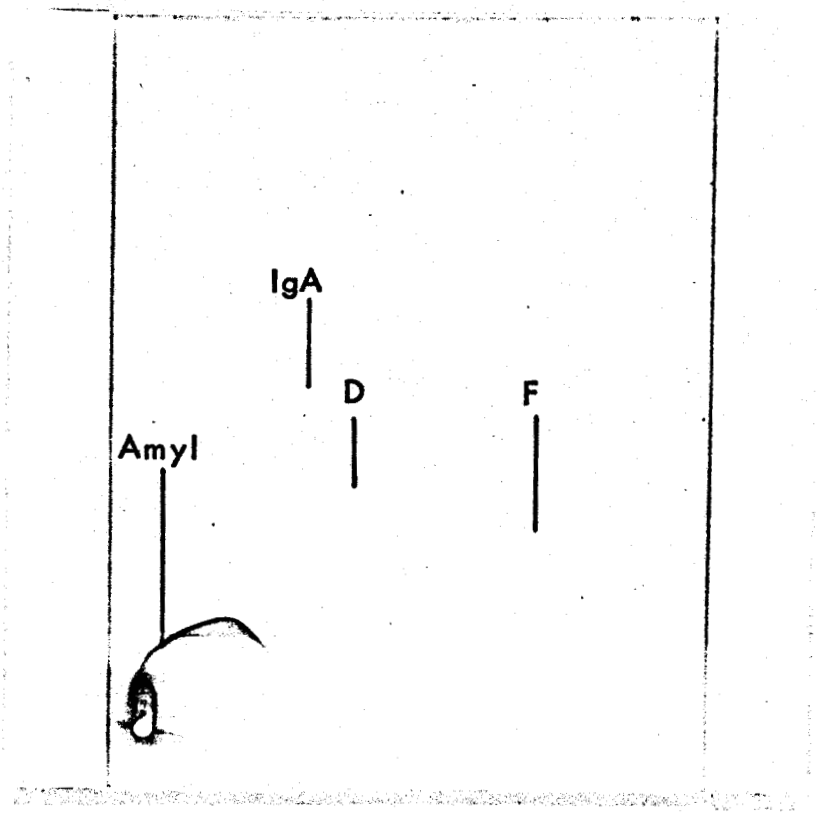
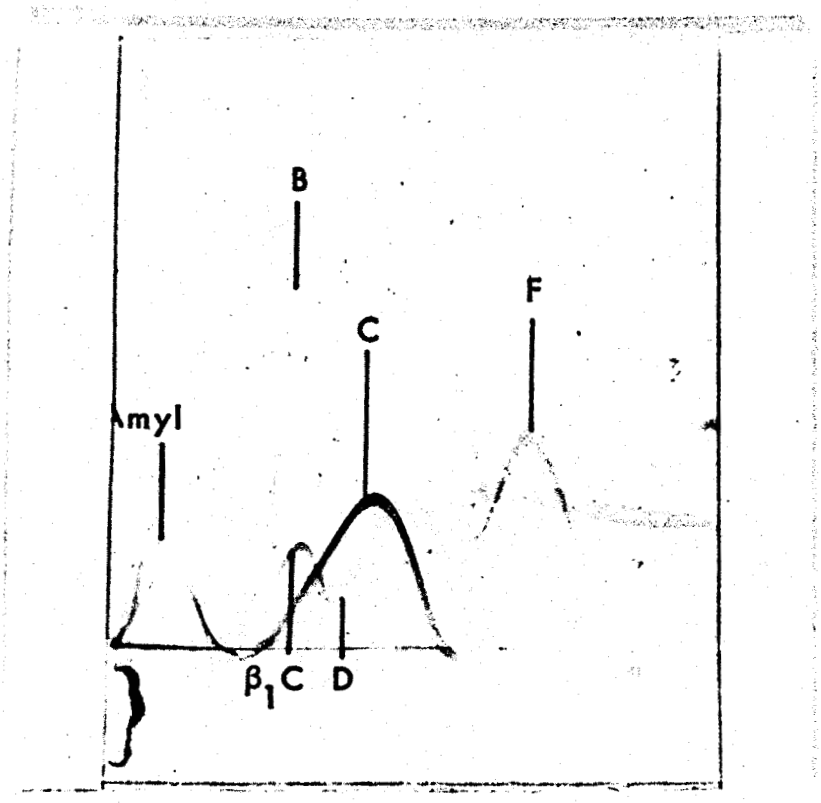


Figure I.D.2.b : IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE DE L'EXTRAIT DE MUCUS AVEC L' IMMUNSERUM DE LAPIN ANTI-SALIVE DE PAROTIDE HUMAINE .



BUS LILLE

Figure I.D.2.c : IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE DE L'EXTRAIT DE MUCUS AVEC L'IMMUNSERUM DE CHEVAL ANTI-SALIVE TOTALE HUMAINE

en effet dans des mucus endobronchiques obtenus chez des sujets trachéotomisés sous aspiration continue, une activité amylasique a été décelée par la technique de BERNFELD (1955) (voir partie technique p.T.18) et l'arc de l'amylase a été mis en évidence avec un immunsérum de Lapin , spécifique de l'amylase.(Nordic)

Cet immunsérum révèle également les IgA présentes dans les extraits de mucus. Si l'immunsérum est saturé par du sérum humain (100 µl de sérum pour 500 µl d'immunsérum) seul l'arc des IgA disparaît. Les arcs D et F n'ont pu être identifiés jusqu'à présent.

I.D.2.c Immunsérum de Cheval anti-salive humaine totale (Kallestad).

Six arcs sont révélés dans les extraits de mucus. La saturation de l'immunsérum par du sérum humain (même proportion que dans le paragraphe précédent) n'élimine que l'arc de la β_{1c} euglobuline. Les arcs B et C, D et F ne sont pas identifiés. (Fig. I.D.2.c)

I.D.2.d Immunsérum de Chèvre anti-lysozyme humain (Kallestad)

L'emploi de cet immunsérum en double dimension avec les adaptations de temps et de sens de migration nécessaires, n'a pas donné de résultats. Le lysozyme a néanmoins été mis en évidence en immunoélectrophorèse simple en gel d'agar (une heure de migration) dans la fraction 6 provenant de gel-filtration d'un extrait de mucus.sur colonne de S 6B (paragraphe I.E.6.,p:29)

I.D.2.e Immunsérums de Lapin anti-mucus bronchique humain

Ces immunsérums ont été préparés au laboratoire. Deux Lapins ont été immunisés avec les fractions de mucus obtenues suivant le protocole indiqué sur le schéma (I.D.2.e). Les immunsérums sont saturés par du sérum humain total (dans les mêmes proportions que précédemment). Les diagrammes obtenus (Fig.I.D.2.e) présentent 6 à 8 pics selon les concentrations d'immunsérums employées. *
Deux constituants sont facilement identifiés : l'amylase par la révélation spécifique, la bronchotransferrine par une méthode voisine de celle décrite par PLATT et coll. (1973) : en avant du dépôt, lors de la première dimension, nous incorporons dans

---

* Les arcs obtenus avec l'immunsérum lot n° 46 qui ne sont pas désignés par des lettres n'ont pas été mis en évidence dans tous les mucus étudiés avec cet immunsérum.

10 ml de mucus
+ 10 g d'Ecteola-cellulose humide *
+ 20 ml de tampon PO_4^{--} 0,01 M , NaCl 0,15 M de pH 7,5

↓

Agitation 1 heure à 4°C

↓

Centrifugation pendant 15 mn à 6 500 tours/mn

↓

→ Surnageant dialysé et lyophilisé

↓

Fabrication de l'immunsérum de Lapin lot n° 46

Culot

+ 10 ml de tampon PO_4^{--} 0,01 M , NaCl 0,5 M de pH 7,5

↓

Agitation 30 mn à 4°C

↓

Centrifugation pendant 15 mn à 6 500 tours/mn

↓

→ Surnageant dialysé et lyophilisé

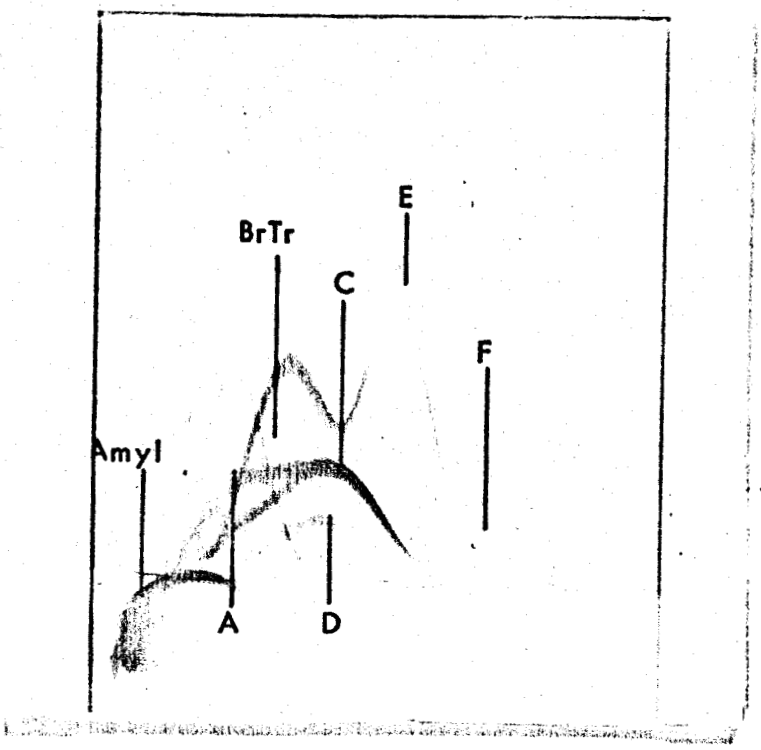
↓

Fabrication de l'immunsérum de Lapin lot n° 45

* Ecteola-cellulose de capacité d'échange ionique 0,33 mEq/g. sec équilibrée dans le tampon PO_4^{--} 0,01 M , NaCl 0,15 M de pH 7,5 .

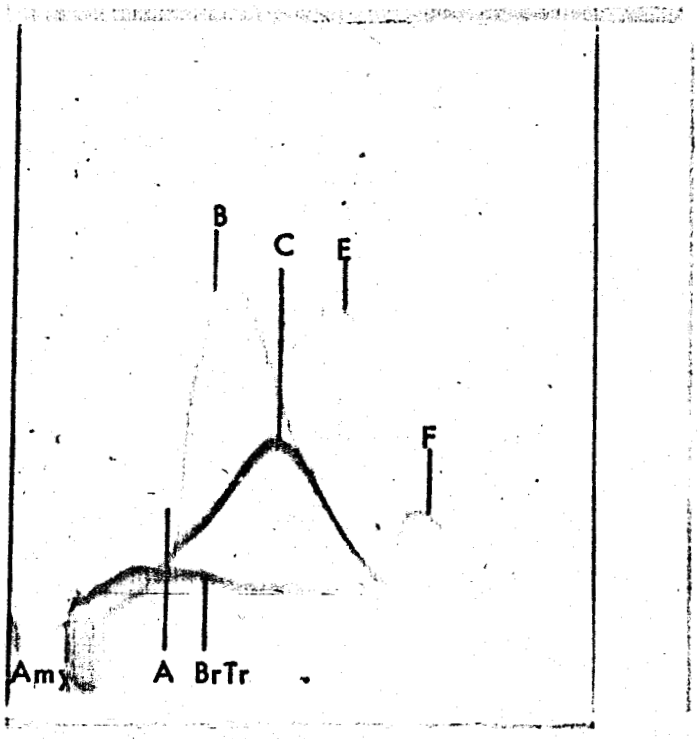
BUS LILLE

Schéma I.D.2.e : PREPARATION DES FRACTIONS DE MUCUS UTILISEES POUR LA FABRICATION DES IMMUNSERUMS DE LAPIN ANTI- MUCUS BRONCHIQUE HUMAIN .



Immunsérum
lot n° 46

(L'arc du composant C présente un dédoublement avec cet immunsérum)



Immunsérum
lot n° 45

(Dans les deux diagrammes, le composant E apparaît sous la forme d'un arc à double courbure. On peut noter la variation du rapport de ces deux formes avec les deux immunsérums utilisés.)

Figure I.D.2.e : IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE DE L' EXTRAIT DE MUCUS AVEC LES IMMUNSERUMS DE LAPINS ANTI-MUCUS BRONCHIQUE HUMAIN .

BUS LILLE

le gel de l'immunsérum anti-lactotransferrine qui élimine dès la première migration électrophorétique l' antigène correspondant ; l'arc qui dans la deuxième dimension a disparu par rapport à la plaque témoin est celui de la bronchotransferrine. .

Dans le but de caractériser d'autres arcs nous avons appliqué la technique de révélation spécifique des éstérases.* Les arcs B et C, d'ailleurs communs à la salive et au mucus, sont colorés. L'un de ces arcs correspond sans doute à la kallicréine mise en évidence par ROUSSEL (1965). La caractérisation et l'identification des autres constituants (A, D, E, F) restent à faire et leur rôle biologique reste à découvrir.

Si les immunsérums anti-mucus épuisés par le sérum humain total sont, de plus, épuisés par de la salive humaine totale lyophilisée (à raison de 1 mg pour 100 µl d'immunsérum) tous les arcs disparaissent dans les conditions de rapport antigène/anticorps utilisées. Cette constatation tendrait à démontrer qu'il n'existe pas de constituants antigéniques spécifiques de la sécrétion bronchique. Cette interprétation doit cependant être nuancée : Tout d'abord sur le plan technique, il faut insister sur le fait que, plus des immunsérums sont saturés, plus il est difficile de mettre des arcs en évidence en double dimension, à cause de la coloration persistante du fond de la plaque. Ensuite, la qualité des immunsérums obtenus peut aussi être mise en cause. Il serait nécessaire d'obtenir d'autres immunsérums chez d'autres animaux, chez le Bouc notamment dont la sensibilité des réponses immunologiques est connue.

I.D.2.f Bilan des protéides de type sécrétoire

Dès 1963, BISERTE et coll. caractérisent dans la phase soluble du mucus une glycoprotéine qui est antigéniquement assimilable à la lactotransferrine récemment isolée du lait de Femme par MONTREUIL et coll. (1960-a). Ils mettent également en évidence la β_2-globuline salivaire. MASSON et coll. (1965) identifient, en plus de la bronchotransferrine, une β_1-globuline salivaire, une α_2-globuline salivaire, de l'amylase (dont ils attribuent la présence uniquement à la contamination salivaire) et du lysozyme.

Des études menées plus récemment par RYLEY et coll. (1972), sur la phase soluble du mucus obtenue après ultracentrifugation, font état

---

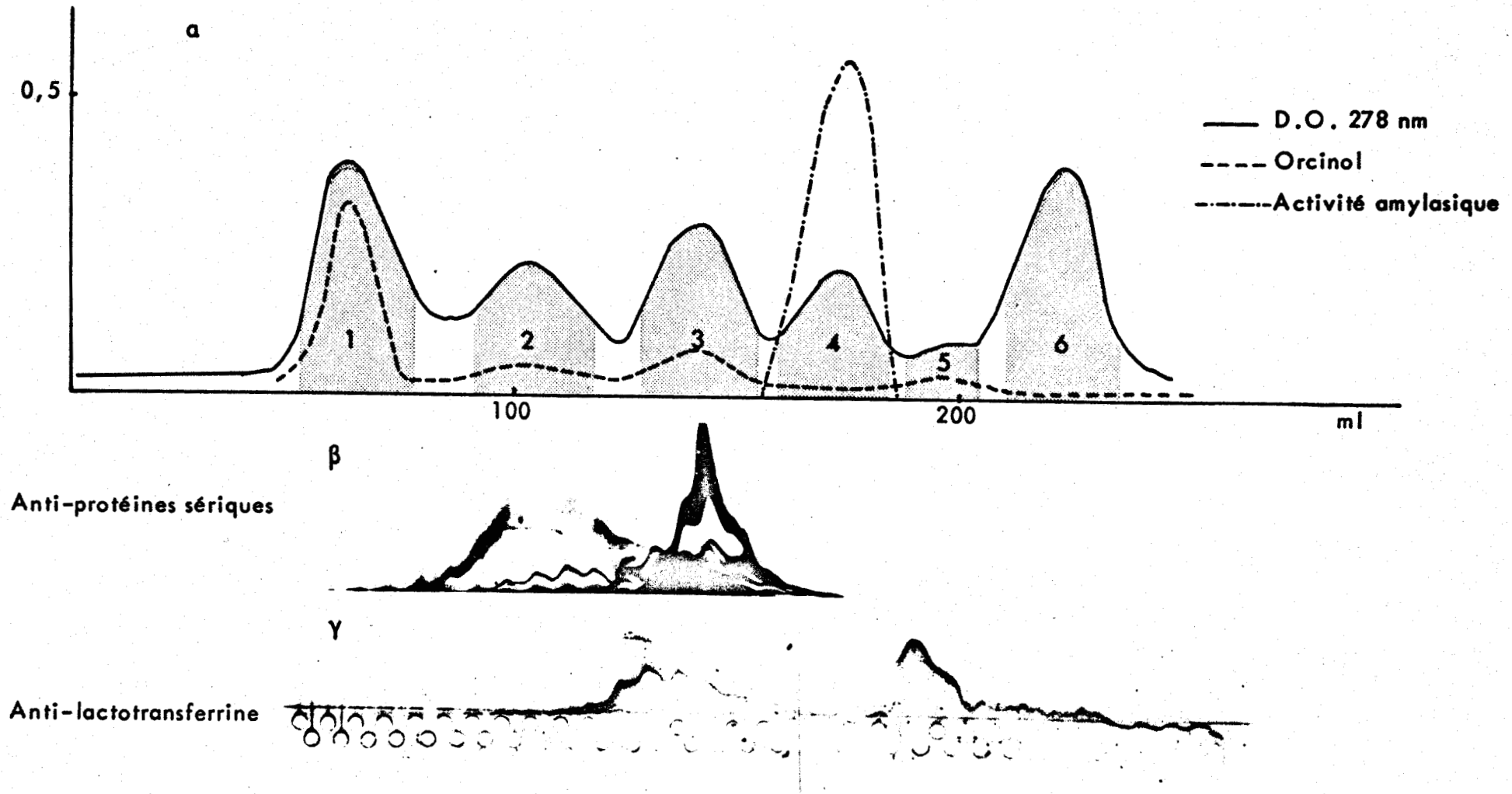
* Voir partie technique p : T.21 .

de la présence d'une protéine qui précipite en présence d'ions Ca^{++} décrite auparavant par GUGLER et coll. (1967) dans la salive humaine. Nous avons repris leur protocole de préparation de ce constituant mais nous n'avons ensuite rien révélé avec les immunsérums de Lapin anti-mucus. Dans le même article RYLEY et coll. (1972) effectuent une étude comparative de la phase soluble de la salive humaine totale (obtenue après une centrifugation à 50.000 g pendant 30 minutes) et la phase soluble de l'expectoration (obtenue après une ultracentrifugation à 120.000 g pendant quatre heures). Leur étude porte sur dix malades. Ils emploient la technique d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle avec un immunsérum de Lapin anti-protéines bronchiques humaines. Les mêmes protéides sécrétoires sont retrouvés dans les deux liquides ; mais, à l'exception de l'amylase, les taux de ces protéides sont plus élevés dans l'expectoration que dans la salive. Considérant qu'en moyenne la contamination de l'expectoration par la salive ne peut dépasser 20 p. 100 (en raison de la différence de viscosité de ces milieux) et que la concentration des protéides sécrétoires n'est dans aucun cas trois fois plus élevée dans la salive que dans le mucus correspondant, les auteurs en déduisent que tous ces protéides de l'expectoration y compris l'amylase n'ont pas uniquement une origine salivaire.

Dans l'état actuel de notre étude, nous pouvons dire que, parmi les six arcs (A à F), quatre au moins (B, C, D et F) sont présents dans la salive et dans l'expectoration . Nous nous proposons de continuer ce travail d'identification sur des prélèvements endobronchiques qui seront dépourvus de contamination salivaire. Dans les prélèvements endobronchiques que nous avons étudiés, seule la recherche de l'amylase avait été effectuée puisque nous ne disposions pas encore, à cette époque, des immunsérums anti-sécrétions.

I.E. Fractionnement de l'extrait de mucus en gel-filtration :

Après action de l'Ecteola-cellulose, l'extrait de mucus est dialysé 4 jours contre de l'eau désionisée ; 15 ml d'extrait (ce qui correspond à 5 ml de mucus) sont déposés sur une colonne (2,3 x 80 cm) de Sepharose 6 B. L'élution est effectuée avec le tampon Tris 0,1 M NaCl 0,2 M de pH 8,0. Les fractions recueillies ont un volume de 3,2 ml. La lecture de la densité optique à 278 nm est suivie d'une repérage des oses combinés par la méthode à l'orcinol sulfurique adaptée à l'autoanalyseur Technicon. La courbe d'élution est représentée



a : Diagramme d'élution de la colonne de Sepharose 6B

β : Prédiffusion avec l'immunsérum de Lapin anti-sérum humain total

γ : Prédiffusion avec l'immunsérum de Lapin anti-lactotransferrine humaine

BUS LILLE

Figure I.E : GEL-FILTRATION DE L'EXTRAIT DE MUCUS SUR COLONNE DE SEPHAROSE 6B
REPERAGE PAR LA TECHNIQUE DE PREDIFFUSION

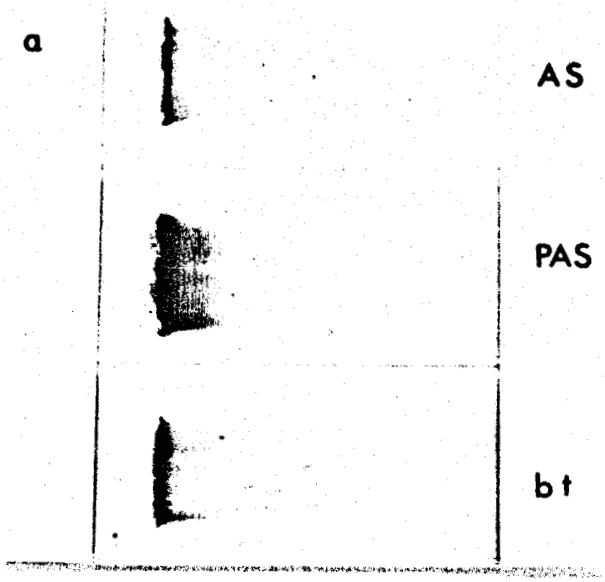
sur la Figure I.E.a. De plus, l'éluat chromatographique est étudié à l'aide de la technique d'électroimmunodiffusion avec prédiffusion de l'antigène : elle permet un repérage rapide de la zone d'élution d'une protéine à l'aide de ses caractères immunologiques. Les immunsérums de Lapin anti-protéines sériques (-β) et anti-lactotransferrine (-γ) sont utilisés. L'amylase est repérée spécifiquement, par la technique de BERNFELD (1955) appliquée à l'éluat chromatographique. L'ensemble des résultats obtenus est indiqué sur la Figure I.E. Les fractions correspondant à chaque pic sont rassemblées et dialysées quatre jours contre de l'eau désionisée puis lyophilisées.

I.E.1. Etude de la fraction 1

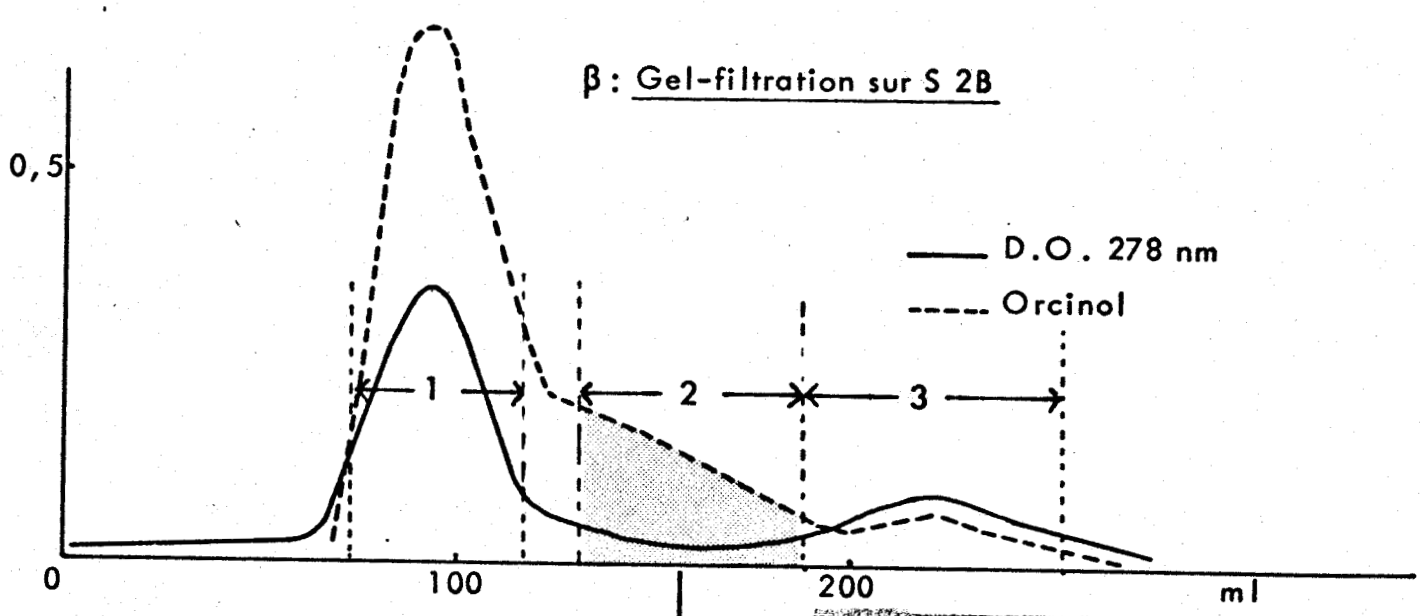
Elle est riche en glucides combinés (courbe à l'orcinol de la Figure I.E.-a, p. 23). La poudre obtenue est étudiée en électrophorèse en lames d'agarose (Fig. I.E.1.-a) ; cette fraction exclue de Sepharose 6 B contient des glycoprotéines de masse molaire élevée qui ne sont pas retenues par l'Ecteola-cellulose dans le tampon employé paur l'extraction des constituants du mucus.

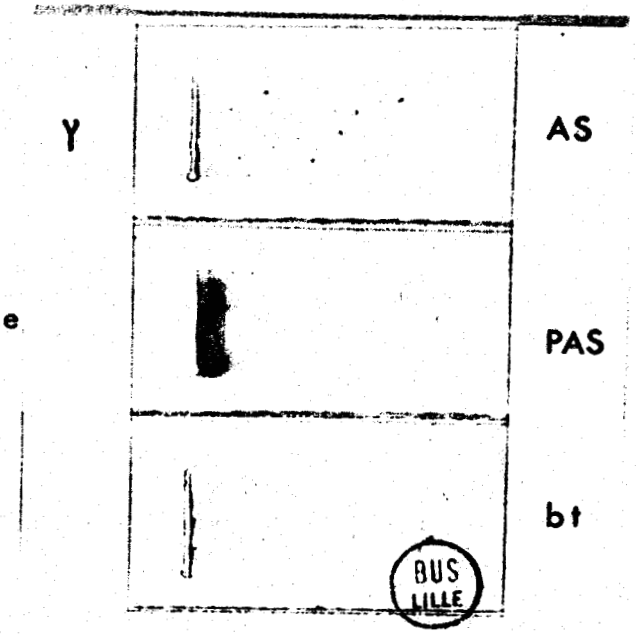
Cette fraction 1 de Sepharose 6 B est déposée sur une colonne (2,3 x 80 cm) de Sepharose 2 B dont la courbe d'élution est représentée sur la Figure I.E.1-β. La fraction exclue du gel correspond à des composants de masse molaire élevée qui ne migrent pas en électrophorèse en lame d'agarose (mucoprotéines). La troisième fraction de l'éluat est composée de constituants protéiques de plus faible masse molaire. La fraction 2 étudiée en électrophorèse en lame d'agarose (Fig. I.E.1.-γ) présente les caractéristiques de migration électrophorétique en lame d'agarose et d'affinité tinctoriale des mucines neutres éluées de l'Ecteola-cellulose en NaCl 0,1 M dans le protocole de préparation des mucines bronchiques de DEGAND (1972).

La composition en acides aminés et en sucres de cette fraction a été déterminée (Tableau I.E.1.). Nous retrouvons les caractéristiques de la composition en acides aminés de mucines : richesse en thréonine et en sérine (31, 57 résidus p. 100), en glycocolle et en proline, pauvreté en acides aminés basiques. Cependant nous trouvons 2 résidus pour 100 de demi-cystine.



α : Etude électrophorétique en lame d'agarose de la Fraction de départ : F_1 S 6B (voir Figure I.E.)





γ : Etude électrophorétique en lame d'agarose de la Fraction 2 de S 2B .

BUS LILLE

Figure I.E.1. PURIFICATION DES MUCINES NEUTRES ET ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES FRACTIONS OBTENUES

Tableau I.E.1.

COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET COMPOSITION GLUCIDIQUE DE LA FRACTION 2 DE S 2B (voir Figure I.E.1.)

MUCINE NEUTRE

Composition en acides aminés *	
ASP	6,06
THR	18,12
SER	13,45
GLU	7,18
PRO	8,31
GLY	9,28
ALA	9,07
VAL	5,17
CYS/2	1,99
MET	/
ILE	2,28
LEU	5,67
TYR	1,66
PHE	3,04
LYS	3,03
HIS	2,49
ARG	3,21

Composition glucidique **	
Fucose	17,0
Acide N-acétyl-neuraminique	1,9
Galactose	23,2
N-acétyl-glucosamine	17,4
N-acétyl-galactosamine	10,1
Sulfate	1,8

Total sucres : 71,4 p.100 du poids sec

Total acides aminés : 16,35 p.100 du poids sec

* Résultats exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus

** Résultats exprimés en pourcentage de poids sec

BUS LILLE

La composition en sucres montre une richesse en fucose (17 p. 100 du poids sec) et en galactose (23 p. 100), peu d'acide N-acétyl-neuraminique (1,9 p. 100) et de sulfate (1,8 p. 100).

La fraction 1 de l'éluat chromatographique après gel-filtration de l'extrait de mucus sur colonne de Sepharose 6 B contient des constituants de type mucine neutre.

I.E.2. Etude de la fraction 2 :

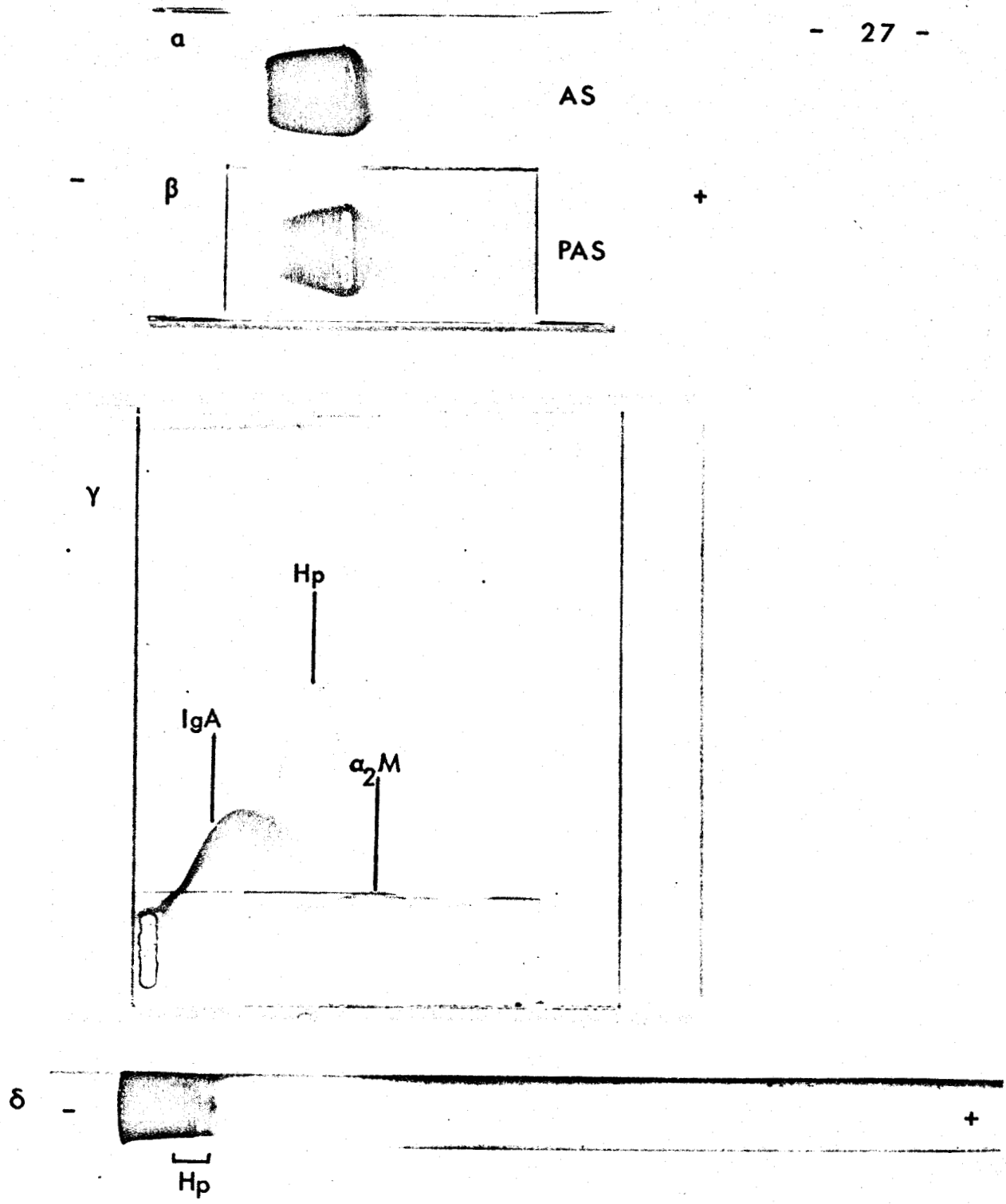
Les résultats obtenus par la technique de prédiffusion avec l'immunsérum de Lapin anti-sérum humain total (Fig. I.E.-β p. 22) indique que cette fraction contient un composant majeur. L'étude de la fraction 2 est représentée sur la Figure I.E.2. L'électrophorèse en lame d'agar (-α et β) montre une fraction dans la zone des gamma-globulines. En double dimension avec l'immunsérum de Lapin anti-sérum humain (- γ), deux constituants apparaissent en plus des IgA-globulines. Ils sont identifiés à l'α_2-macroglobuline et à l'haptoglobine sous forme de polymères (bien visibles sur le gel de polyacrylamide - δ). L'utilisation de l'immunsérum de Lapin spécifique du fibrinogène a permis de montrer que ce constituant est élué dans cette fraction 2.

I.E.3. Etude de la fraction 3 :

La majeure partie des protéides sériques de l'expectoration est éluée dans cette fraction comme l'indiquent les résultats obtenus par la technique de prédiffusion (Fig. I.E. -β; p. 22). L'étude de la Fraction 3 est représentée sur la Figure I.E.3.

En électrophorèse en lame d'agar (-α et β) et en gel de polyacrylamide (- γ) la richesse de cette fraction est mise en évidence. L'étude en double dimension avec l'immunsérum de Lapin anti-sérum humain le confirme (- δ). (L'épaulement de l'arc de la sérumalbumine est vraisemblablement dû à la lyophilisation). L'utilisation des immunsérums de Lapin anti-mucus bronchique nous a permis de savoir que la majorité des protéides révélés par ces immunsérums se trouve également dans cette Fraction 3.

L'étude avec prédiffusion effectuée avec l'immunsérum de Lapin anti-lactotransferrine humaine (Fig. I.E.-γ ; p. 22) montre la présence dans cette fraction de la bronchotransferrine que nous révélons en double dimension (Fig. I.E. 3 - ε).



α : Electrophorèse en lame d'agar (AS)

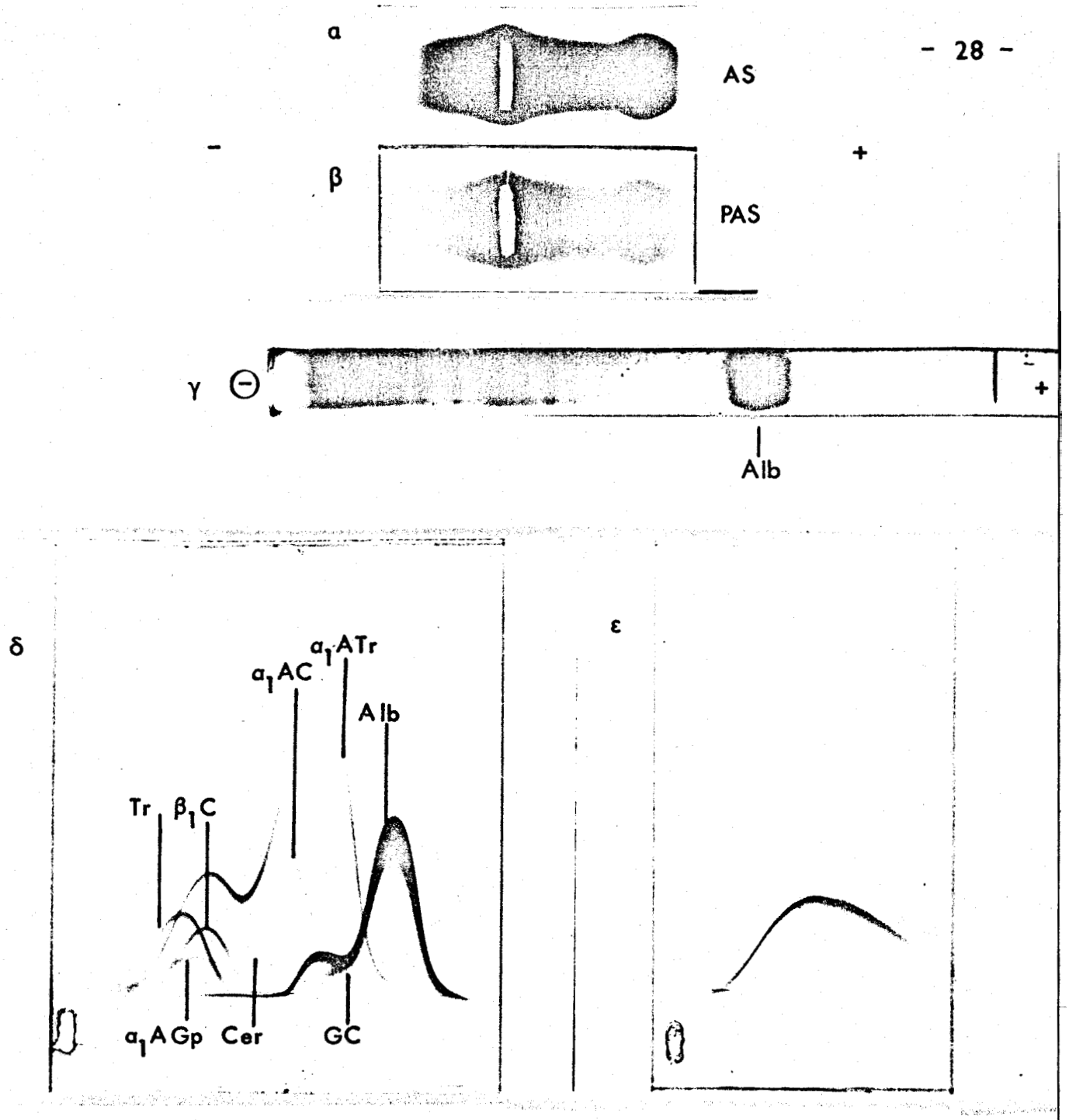
β : Electrophorèse en lame d'agar (PAS)

γ : Immunoélectrophorèse bidimensionnelle avec l'immunsérum de Lapin anti-sérum humain total

δ : Electrophorèse en gel de polyacrylamide

BUS LILLE

Figure I.E.2 : ETUDE DE LA FRACTION 2 DE L'ELUAT DE LA COLONNE DE SEPHAROSE 6 B .



α : Electrophorèse en lame d'agar (AS)

β : Electrophorèse en lame d'agar (PAS)

γ : Electrophorèse en gel de polyacrylamide

δ : Immunoélectrophorèse bidimensionnelle avec l'immunsérum de Lapin anti-sérum humain total

ε : Immunoélectrophorèse bidimensionnelle avec l'immunsérum de Lapin anti-lactotransferrine

BUS LILLE

Figure I.E.3 : ETUDE DE LA FRACTION 3 DE L'ELUAT DE LA COLONNE DE SEPHAROSE 6 B .

I.E.4. Etude de la fraction 4

Le repérage de l'activité amylasique effectué sur l'éluat chromatographique (Fig. I.E.-a ; p. 22) indique que l'amylase est contenue dans cette fraction. La Figure I.E.4 représente l'étude de la Fraction 4. D'après l'analyse électrophorétique en lame d'agar (-a et β), l'amylase en est le constituant principal. L'immunoélectrophorèse est effectuée avec l'immunsérum de Lapin anti-mucus bronchique, lot n°46 (- γ) (qui révèle ici essentiellement l'amylase) et avec un immunsérum de Lapin anti-amylase salivaire (Nordic) -(- δ) . En gel de polyacrylamide (- ε) les quatre isoamylases sont mises en évidence.

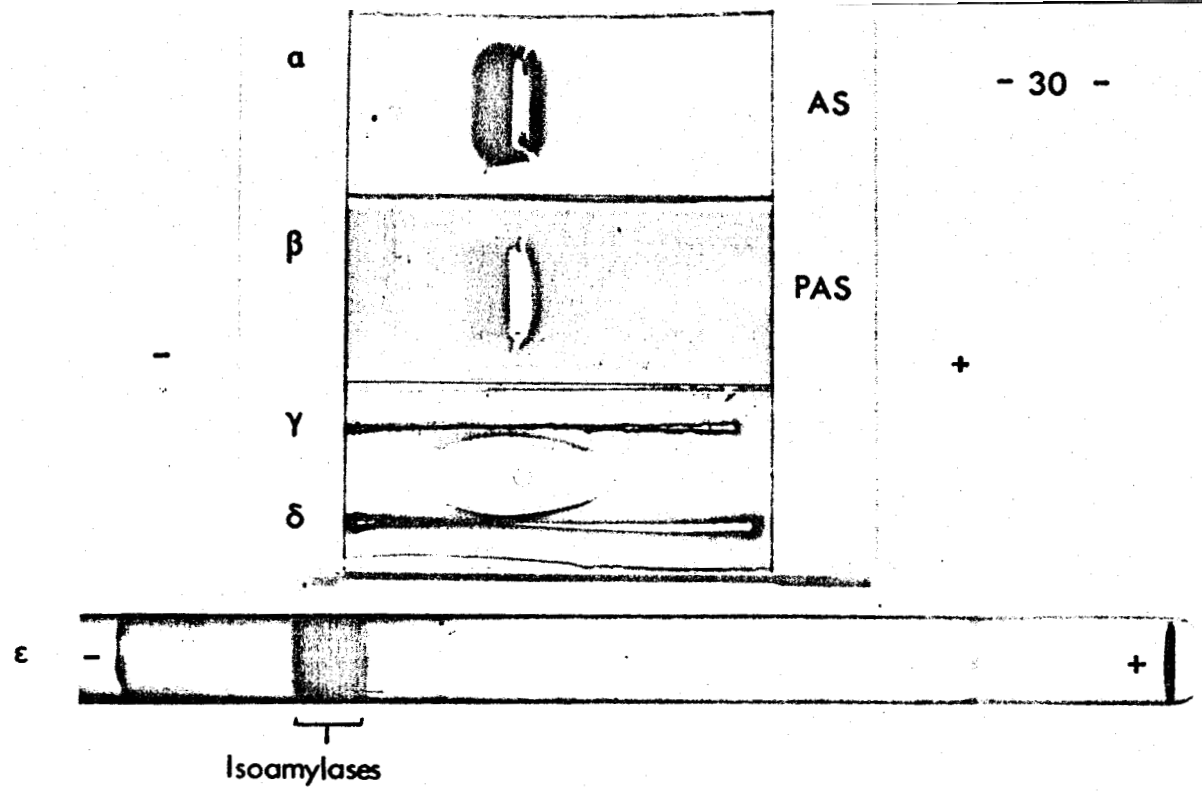
I.E.5. Etude de la fraction 5 :

La technique avec prédiffusion effectuée avec l'immunsérum de Lapin anti-lactotransferrine (Fig. I.E. -γ ; p. 22) nous permet de mettre en évidence dans cette fraction un constituant présentant des caractères antigéniques communs avec ceux de la lactotransferrine du lait.(La quantité de poudre obtenue pour cette fraction est hélas très faible). Nous reviendrons ultérieurement (paragraphe I.F.5 ; p. 36) sur cette observation.

I.E.6. Etude la fraction 6 :

Le lysozyme est le constituant majeur de cette fraction dont l'étude est représentée sur la Figure I.E.6. Il est caractérisé par sa migration électrophorétique en lame d'agar : coloration à l'Amidoschwarz (-a), absence de coloration par le réactif de Schiff après oxydation periodique (-β) il est également identifié par ses caractères antigéniques (- γ). L'absence de sucres est contrôlée en chromatographie en phase gazeuse. La composition en acides aminés a été déterminée (Tableau I.E.6.). Nous avons également fait figurer dans ce Tableau, la composition en acides aminés du lysozyme de sécrétion bronchique humaine isolé par DELBART (1972), la composition en acides aminés du lysozyme isolé de larmes humaines et du lait humain (JOLLES et coll., 1967), de la salive humaine (PETIT et coll., 1963 -a) et du placenta humain (PETIT et coll., 1963, b).

La composition du lysozyme que nous avons isolé de la sécrétion bronchique, présente les mêmes caractéristiques que celles des lysozymes des autres sécrétions : richesse en acides aminés dicarboxy-



α : Electrophorèse en lame d'agar (AS)

β : Electrophorèse en lame d'agar (PAS)

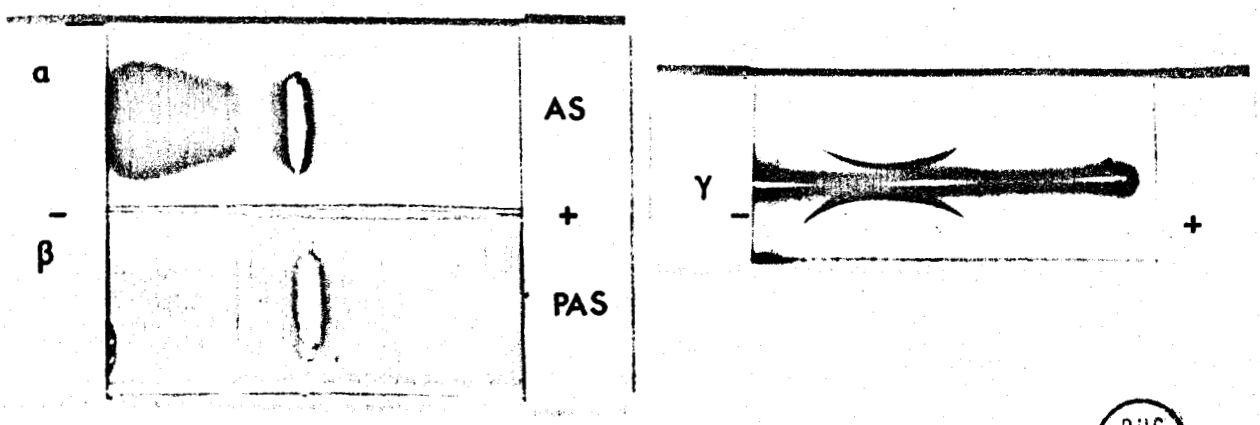
Immunoélectrophorèse avec l'immunsérum de Lapin :

γ : anti-mucus bronchique humain (lot n°46)

δ : anti-amylase salivaire humaine

ε : Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

Figure I.E.4 : ETUDE DE LA FRACTION 4 DE L'ELUAT DE LA COLONNE DE SEPHAROSE 6 B.



BUS LILLE

α : Electrophorèse en lame d'agar (AS)
β : Electrophorèse en lame d'agar (PAS) | 2 heures de migration

γ : Immunoélectrophorèse de 2 fractions 6 de mucus différents avec l'immunsérum de Chèvre anti-lysozyme humain (1 heure de migration)

Figure I.E.6 : ETUDE DE LA FRACTION 6 DE L'ELUAT DE LA COLONNE DE SEPHAROSE 6 B.

Tableau I.E.6.

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DU LYSOZYME DE QUELQUES SECRETIONS HUMAINES

Acide aminé **	Sécrétion bronchique		Larmes	Lait	Salive	Placenta
	Fraction 6	(DELBART, 1972)	(JOLLES * et coll., 1967)	(JOLLES * et coll., 1967)	(PETIT * et coll., 1963-a)	(PETIT * et coll., 1963-b)
ASP	12,53	17,53	13,02	12,5	14,5	13,7
THR	4,49	4,46	3,87	4,15	4,84	5,64
SER	7,26	6,54	4,47	4,92	4,84	6,85
GLU	8,81	9,19	7,29	7,14	7,28	8,06
PRO	3,54	2,10	2,22	1,90	2,42	3,22
GLY	10,41	10,56	9,43	9,11	10,4	10,48
ALA	10,28	12,57	9,51	9,51	9,7	9,68
VAL	6,04	7,10	4,92	5,48	5,64	5,64
CYS/2	4,05	0,84	4,19	4,91	4,84	3,22
MET	1,28	0,83	1,53	1,25	0,81	1,21
ILE	4,27	3,93	3,10	3,26	3,22	3,22
LEU	6,59	6,73	5,76	6,21	6,45	6,45
TYR	4,22	4,63	4,03	4,39	4,03	4,03
PHE	2,11	1,52	1,13	1,57	1,61	1,61
LYS	4,58	4,29	3,51	3,31	3,63	4,43
HIS	1,40	0,86	0,81	0,81	0,81	0,81
ARG	8,15	9,80	9,11	9,4	8,87	8,87

* Les compositions en acides aminés exprimées par les auteurs en nombre de résidus par mole ont été converties en nombre de résidus pour 100 résidus .

** Les résultats sont exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus d'acides aminés dosés.

BUS LILLE

liques (acide aspartique, acide glutamique), richesse en alanine, en leucine, en acides aminés basiques (lysine et arginine). Nous trouvons un pourcentage de résidus de demi-cystine (4 résidus pour 100) qui est plus proche de celui généralement trouvé par les autres auteurs (4 à 6 résidus pour 100) que celui trouvé par DELBART. Cette différence est peut-être due au fait que la méthode choisie par DELBART pour la désorganisation du réseau fibrillaire du mucus bronchique consistait en une réduction par le mercapto-éthanol.

I.F. Particularités de certains constituants du mucus bronchique

I.F.1. Les IgA-globulines des sécrétions bronchiques

MASSON et coll. (1966) établissent, grâce à l'ultracentrifugation que les sécrétions bronchiques contiennent une forme d'IgA ayant une masse molaire élevée(constante de sédimentation 11 S). Cependant ces auteurs précisent que près de 20 p.100 des IgA bronchiques sont des monomères 7 S. Ce type d'étude a été repris ultérieurement par NEWCOMB et coll.(1969) qui ont analysé les proportions relatives d'IgA 11 S et d'IgA 7 S dans sept mucus ⁑. D'après ces auteurs, 23p.100 des IgA du mucus au maximum sont sous forme 7 S. Nous n'avons pas essayé de redéfinir cette proportion, mais nous avons mis en évidence l'hétérogénéité des IgA (voir électrophorèse en gel de polyacrylamide p. 7 . Cette expérience est confirmée par l'étude avec prédiffusion effectuée sur l'éluat chromatographique de la colonne de Sepharose 6 B (Fig. I.E.-β) : des IgA sont éluées dans la fraction 2 et dans la fraction 3; elles ont donc des masses molaires différentes.

Les connaissances que nous avons actuellement sur la structure des IgA sécrétoires résultent essentiellement de travaux effectués sur les sécrétions colostrales. En 1965, TOMASI et coll. définissent dans les IgA colostrales le composant sécrétoire SC. HAVEZ et coll. (1966) caractérisent dans la sécrétion bronchique ainsi que dans les sécrétions salivaires, gastriques, colostrales et intestinales un déterminant antigénique particulier aux IgAs qu'ils appellent chaîne α_s. Depuis, de nombreux travaux sur les IgA colostrales ont montré que les IgA de sécrétion sont des dimères d'IgA 7 S qui comportent outre le composant sécrétoire SC, la chaîne de jonction J découverte en 1970 par HALPERN et coll.

⁑ Les auteurs homogénéisent les mucus dans un homogénéiseur après avoir ajouté un volume égal de NaCl 0,15M additionné d'EDTA. Un traitement par le rivanol est effectué ensuite, et l'ultracentrifugation est faite sur le surnageant obtenu après une centrifugation à 10 000 tours/minute pendant 30 minutes.

Aucune étude structurale n'a encore été menée à bien sur les IgA bronchiques : la difficulté de préparation en est la cause principale. Les études conduites en ultracentrifugation (MASSON et coll., 1966) permettent de penser que les IgA bronchiques résultent du même assemblage moléculaire que les IgA colostrales. Les techniques immunologiques que nous utilisons ne nous ont pas permis jusqu'à présent de mettre en évidence le composant sécrétoire libre dans un extrait de mucus : le potentiel de synthèse du SC par l'épithélium bronchique serait-il entièrement utilisé pour former les IgA de type sécrétoire ? MEDICI et coll. (1971) pensent que les IgA sécrétées par la muqueuse bronchique endommagée des bronchiteux chroniques à un stade avancé ne contiennent plus de composant sécrétoire SC.

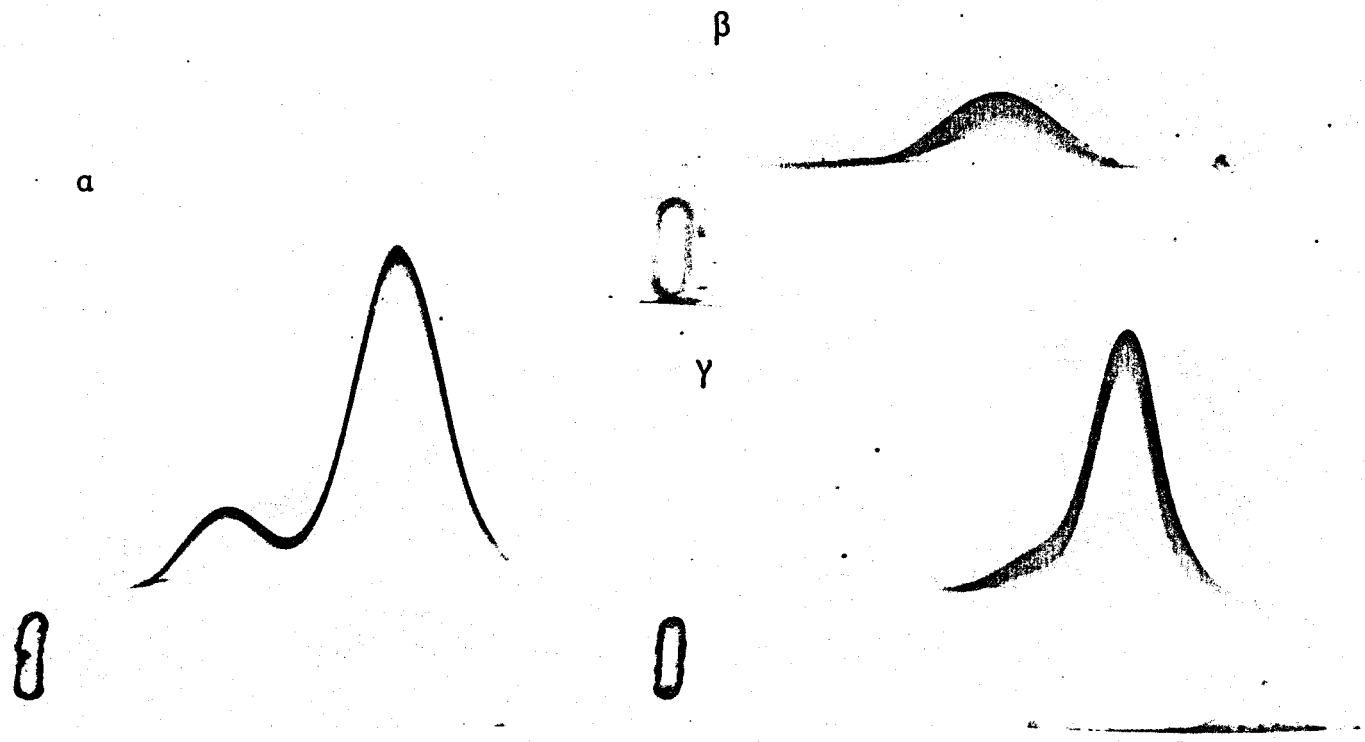
I.F.2. L'α_1-antitrypsine du mucus

Dès 1971, nous avions remarqué que, parmi les arcs révélés en double dimension avec l'immunsérum anti-protéines sériques, un constituant apparaissait sous la forme de deux courbes de précipitation de point isoélectrique différent (LEBAS, 1971). Au cours de l'identification des différentes plages de précipitation, nous avons pu attribuer cet arc, à double courbure à l'α_1-antitrypsine (HAVEZ et coll., 1973) (Figure I.F.2-a). Il ne pouvait s'agir de la séparation des variants génétiques étant donné que les phénotypes ne sont pas différenciés dans cette technique. HOCHSTRASSER et coll. (1972-b) ont également identifié deux formes d'α_1-antitrypsine dans les sécrétions bronchiques infectées.

A de rares exceptions près (2 sur 80 mucus) l' α_1-antitrypsine apparaît sous la forme d'un arc à double courbure dans les extraits de mucus que nous avons étudiés, alors que RYLEY et coll. (1973) ne rencontrent ce phénomène que dans 50 p. 100 des cas. Nous avions tout d'abord pensé que la forme de mobilité électrophorétique la plus faible pouvait être due à une désialidation de la molécule d'α_1-antitrypsine : on compte 6 moles d'acide sialique par molécule (SCHULTZE, 1966). Or, la présence de neuraminidase bactérienne, dans un mucus est très vraisemblable. Nous avons donc, avec l'aide de Madame HOUDRET, fait agir la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae :

1) sur un extrait de mucus contenant les deux formes d'α_1-antitrypsine

2) sur un extrait de mucus ne contenant que la forme d'α_1-antitrypsine la plus rapide dans le but d'observer un éventuel ralentissement de sa migration élec-



α : Fraction soumise à la chromatographie d'affinité.

β : Fraction F.1. non retenue sur la colonne de "Sepharose-trypsine".

γ : Fraction F.2. retenue sur la colonne de "Sepharose-trypsine" et dont l'élution peut être obtenue par un tampon acide.

Figure I.F.2. : IMMUNOELECTROPHORESES BIDIMENSIONNELLES EFFECTUEES AVEC L'IMMUNSERUM DE LAPIN SPECIFIQUE DE L'α_1-ANTITRYPSINE.

BUS LILLE

trophorétique. Les résultats ont été les suivants : dans l'expérience 1) les deux formes se sont déplacées vers la cathode en restant dans le même rapport ; dans l'expérience 2) on n'observe toujours qu'une seule forme qui devient également plus cathodique. L'explication de l'arc à double courbure de l'a_1-antitrypsine par une désialidation partielle ne peut être retenue.

Dans le sérum de Chien, OHLSSON (1971-a, 1971-b) met en évidence la formation in vitro d'un complexe a_1-antitrypsine - protéases leucocytaires caractérisé en immunoélectrophorèse bidimensionnelle.

Nous avons repris ce type d'expérience en ajoutant de la trypsine à un sérum humain : nous provoquons la formation de la plage de précipitation la plus cathodique de l'a_1-antitrypsine. Ces expériences ont également été réalisées par HOCHSTRASSER et coll. (1973-c). Nous avons donc pensé que, dans le mucus bronchique, la forme d'a_1-antitrypsine de migration électrophorétique la plus lente pouvait être due à un complexe a_1-antitrypsine-protéase (dénomination restant très générale). La séparation de ces deux formes de mobilité électrophorétique différente a donc été entreprise (LEBAS et coll. , 1973) sur une colonne (1 x 18 cm) de Sepharose 4 B couplée à la trypsine selon la technique de CHAUVET et coll. (1972) (voir partie technique p : T.21).

20 mg de la Fraction 3 obtenue par gel-filtration sur Sepharose 6 B sont dissous dans 2 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M de pH 4,O contenant 0,3 M NaCl et 0,01 M $CaCl_2$ et déposés sur la colonne. Le lavage de la colonne par ce même tampon permet de recueillir une fraction F.1. Le passage d'un tampon acide HCl 0,1 N , NaCl 0,5 M , $CaCl_2$ 0,01 M de pH 1,2 permet d'éluer une seconde fraction F.2. qui est de suite neutralisée par dialyse contre un tampon Tris 0,1 M , NaCl 0,2 M de pH 8,0. L'étude en double dimension de ces deux fractions (F.1. et F.2.) avec l'immunsérum de Lapin spécifique de l'a_1-antitrypsine donne les diagrammes représentés sur la Figure I.F.2. La Fraction F.1. correspond à l'ensemble des protéides non retenus sur la colonne; l'a_1-antitrypsine présente dans cette fraction est sous la forme de mobilité électrophorétique la plus faible (Figure I.F.2.-β). La Fraction F.2. contient la forme d'a_1-antitrypsine de mobilité électrophorétique la plus grande (Figure I.F.2-γ) : cette forme est donc encore capable , d'après cette expérience, de se lier à la trypsine. Cependant nous n'avons encore jamais réussi , dans un mucus, à modifier le rapport entre les deux formes d'a_1-antitrypsine par addition de trypsine à l'extrait de mucus.

I.F.3. Glycoprotéines de point isoélectrique modifié

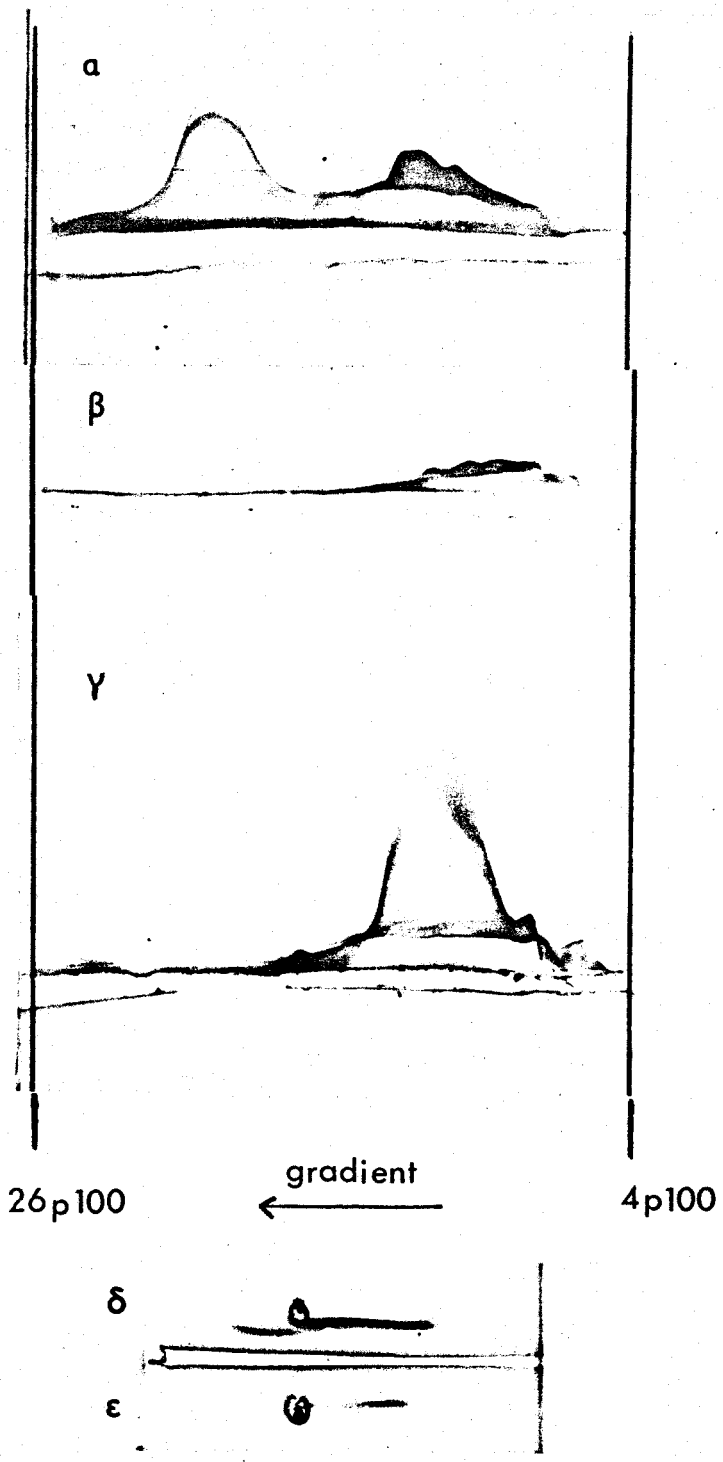
Certaines glycoprotéines telles l'α_1-glycoprotéine acide, l'α_1-antichymotrypsine, l'haptoglobine ont un comportement électrophorétique différent de celui qu'elles ont dans le sérum : ceci confirme l'impossibilité de ne se fier qu'aux seuls critères de mobilité électrophorétique pour l'identification des composants du mucus et l'intérêt de l'emploi de méthodes immunologiques. Ce phénomène de ralentissement de migration électrophorétique pourrait être attribué à l'élimination d'une certaine quantité d'acide sialique consécutive à l'action d'une neuraminidase présente dans le mucus et d'origine microbienne. Lorsque nous avons fait agir la neuraminidase de Diplococcus pneumoniae sur l'extrait de mucus (paragraphe I.F.2) et effectué les immunoélectrophorèses en double dimension avec les immunsérums de Lapin spécifiques de l'haptoglobine et de l'α_1-glycoprotéine acide, nous avons pu voir qu'après un temps d'incubation prolongé (2 heures et plus) les arcs correspondant à ces glycoprotéines se situaient à peu près au niveau du dépôt : nous pouvons donc penser que dans le mucus où nous assistons à un ralentissement de la migration électrophorétique de ces glycoprotéines, ce phénomène peut être dû à une désialidation partielle des molécules.

I.F.4. Protéides de masse molaire élevée.

Parmi les composants d'origine sérique identifiés, il est surprenant de trouver des protéides de masse molaire élevée tels que les IgM (de masse molaire voisine de 900 000 g) et l'α_2-macroglobuline (de masse molaire 820 000 g). En effet, si l'on admet que la présence des protéides d'origine sérique dans le mucus bronchique est dûe à un phénomène de transsudation au niveau de la bronche, on ne comprend pas comment peuvent transsuder des molécules de si grande taille. Il faudrait donc admettre qu'il existe des mécanismes de transferts actifs.

I.F.5. Bronchotransferrine

Lors du repérage par la méthode de prédiffusion avec l'immunsérum de Lapin anti-lactotransferrine (Nordic) appliqué à l'éluat chromatographique de la colonne de Sepharose 6 B (Figure I;E. p : 22) , deux zones d'élu-



Tehnique associant une électrophorèse en "Gradipore" (gradient de polyacrylamide de 4 à 26 p.100) à une 2ième dimension en agarose à 1 p.100 contenant de l'immunsérum de Lapin anti-lactotransferrine humaine appliquée à :

α : Fraction 3 de l'éluat de S 6B

β : Fraction 5 de l'éluat de S 6B

γ : Solution riche en lactotransferrine

Immunoélectrophorèse avec l'immunsérum de Lapin anti-lactotransferrine de :

δ : Fraction 3 de l'éluat de S 6B

ε : Fraction 5 de l'éluat de S 6B

BUS LILLE

Figure I.F.5. : ETUDE DES PARTICULARITES DE LA BRONCHOTRANSFERRINE HUMAINE .

tion sont observées au niveau des fractions 3 et 5. Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette observation. Tout d'abord, il pourrait s'agir, dans la fraction5 d'une forme dégradée de bronchotransferrine. En effet, la zone d'élution de la fraction 5 correspond à celle de constituant de plus faible masse molaire (M: 20 à 30.000g,contre 50 à 100.000 pour la fraction 3). Nous avons donc tenté de vérifier cette hypothèse. Seule peut être utilisée une technique dans laquelle l'identification par les caractères immunologiques est possible. En effet, la bronchotransferrine n'est pas le seul constituant ni de la fraction 3, ni de la fraction 5. Ainsi la technique en gel de polyacrylamide en milieu SDS n'est pas utilisable puisqu'une deuxième dimension en immunoélectrophorèse n'est plus réalisable. Nous avons donc employé une technique proche de la technique d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle. La première dimension est effectuée en électrophorèse sur plaque de Gradipore (*) (gradient de polyacrylamide de 4 à 26 p. 100, en tampon véronal de pH 8,6 ; 48 heures sous une différence de potentiel de 4 volts/cm aux bords du gel) ; puis la deuxième dimension est classique dans un gel d'agarose à 1.p. 100 contenant de l'immunsérum de Lapin anti-lactotransferrine. Les fractions3 et 5 sont étudiées dans cette technique comparativemen à une solution riche en lactotransferrine (Fig. I.F.5-, α, β, γ). Cette solution riche en lactotransferrine est obtenue à partir du précipité 2,0 - 4,0 M en sulfate d'ammonium à pH 7,0 du lactosérum, traité selon la méthode de cristallisation préconisée par HAUPT et coll. (1973) : la fraction ainsi préparée contient essentiellement de la lactotransferrine, un peu de complexe lactotransferrine - composant SC et des traces de sérumalbumine.

Dans la fraction 3, on trouve deux constituants présentant des caractères antigéniques communs avec ceux de la lactotransferrine : l'un de masse molaire identique à celle de la lactotransferrine témoin, l'autre migre plus loin dans le gradient de polyacrylamide. Dans la fraction 5, seul un constituant de masse molaire correspondant à celle de la lactotransferrine témoin est mis en évidence : la bronchotransferrine éluée dans cette fraction n'est donc pas une forme dégradée de bronchotransferrine.

(*) Labo - Moderne

La deuxième hypothèse , pour expliquer le comportement particulier de la bronchotransferrine en gel-filtration, est la formation d'association entre la bronchotransferrine et d'autres constituants. DESCAMPS (1974) a montré que la lactotransferrine humaine peut se complexer avec des glycopeptides de lait (c'est sous cette forme qu'elle existerait à l'état natif dans le lactosérum). Ainsi associée, la lactotransferrine n'a pas le même comportement que la lactotransferrine purifiée en chromatographie de gel-filtration. De même , elle possède une mobilité électrophorétique en lame d'agar à pH 8,2 beaucoup plus grande que la lactotransferrine purifiée. Or , pour la bronchotransferrine, nous observons en immunoélectrophorèse en lame d'agar à pH 8,2 (Figure I.F.5.) avec l'immunsérum de Lapin anti-lactotransferrine deux arcs de précipitation que ce soit dans la fraction 3 (-δ) ou dans la fraction 5 (-ε) de l'éluat de la colonne de Sepharose 6 B . L'arc qui possède une migration plus anodique pourrait correspondre à la bronchotransferrine associée à des glycopeptides. Il pourrait s'agir, dans le mucus bronchique, de glycopeptides provenant de la dégradation des mucines bronchiques , par exemple, dont la proportion serait différente dans la fraction 3 et dans la fraction 5 .

I.G. Application de la technique de double dimension à l'étude de la sécrétion bronchique de quelques cas particuliers :

Les études que nous avons effectuées ont essentiellement porté sur des mucus de malades atteints de bronchite chronique. A l'aide de la technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide nous avons déjà pu constater les variations qui existent d'un mucus à l'autre. A l'aide de la technique d'immunoélectrophorèse en double dimension ces variations sont encore plus nettes. En effet, cette technique apporte un aspect qualitatif et semi quantitatif global intéressant pour définir l'aptitude fonctionnelle de la muqueuse d'un sujet. Nous avons effectué une comparaison des diagrammes que nous obtenons pour différentes sécrétions bronchiques particulières, en double dimension en utilisant l'immunsérum de Lapin anti-protéines sériques humaines. Dans la mesure où les dépôts effectués correspondent à une même quantité de mucus et où l'on inclut dans le gel la même quantité du même immunsérum, des comparaisons quantitatives peu-

vent être faites.

I.G.1. Sécrétion bronchique du fumeur :

Nous appelons "sécrétion normale" ou "témoin", cette sécrétion d'un sujet dont les mécanismes de défense bronchopulmonaire sont encore puissants : en effet, la fraction majeure d'IgA témoigne de l'activité de synthèse de la muqueuse bronchique du sujet (Fig. I.G.1'). La pauvreté du diagramme en ce qui concerne les protéines sériques montre que la filtration des constituants plasmatiques est encore bien contrôlée par la muqueuse. La simplification du diagramme par rapport à celui du mucus d'un bronchitiquechronique est très nettement mise en évidence dans cette tec hnique ; pour rendre la comparaison plus aisée nous avons fait figurer (Fig. I.G.1'') la plaque obtenue avec le mucus d'un bronchitique chronique effectuée avec la même quantité d'extrait et la même quantité d'immunsérum que pour la plaque du mucus de fumeur. La variation du rapport des surfaces de précipitation des IgA et de la sérumalbumine est très remarquable.

I.G.2. Sécrétion bronchique d'un malade atteint de cancer bronchiolo-alvéolaire (Fig. I.G.2.) :

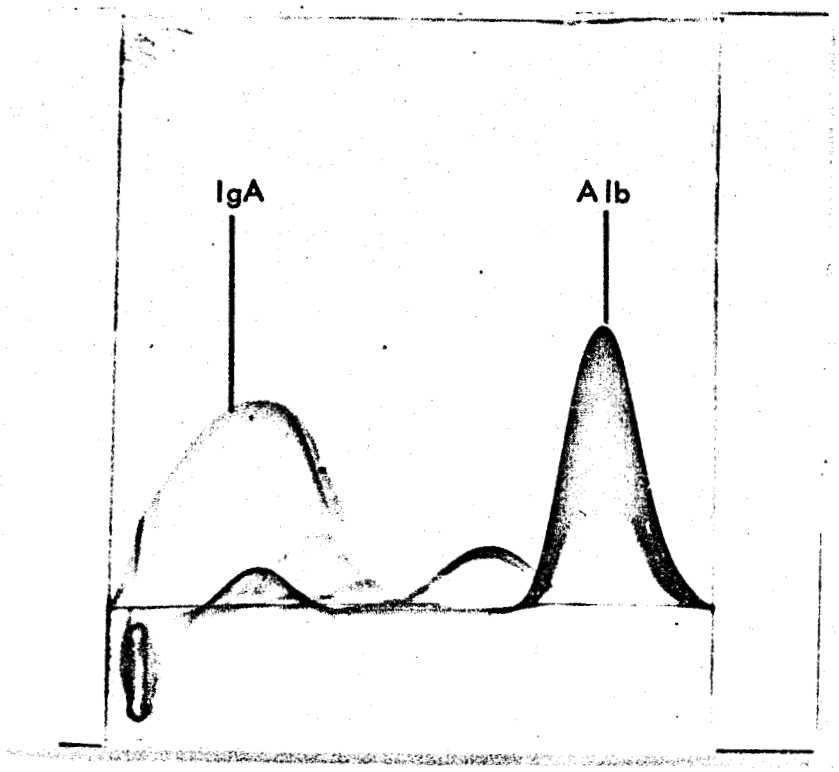
La teneur en protéines sériques de cette sécrétion est très élevée;elle atteint environ 1/10 du taux de protéines du sérum. La transsudation est très importante ; si l'on considère le volume qui peut être expectoré par le malade en 24 heures (500 ml), la perte protéique du sujet atteint un taux très élevé. Par contre, la synthèse locale est très déprimée ; l'arc des IgA est peu important par rapport à ceux des autres constituants.

I.G.3. Sécrétion bronchique d'un malade présentant un déficit en IgA :

Avec la technique d'immuno-électrophorèse bidimensionnelle on peut facilement déceler des déficits en IgA. Parmi les mucus que nous avons étudiés, deux cas de déficit total en IgA ont été rencontrés. Sur la Fig. I.G.3. l'absence totale de l'arc des IgA est facilement visualisée.

I.G.4. Sécrétion bronchique d'un malade présentant un déficit partiel en α_1-antitrypsine :

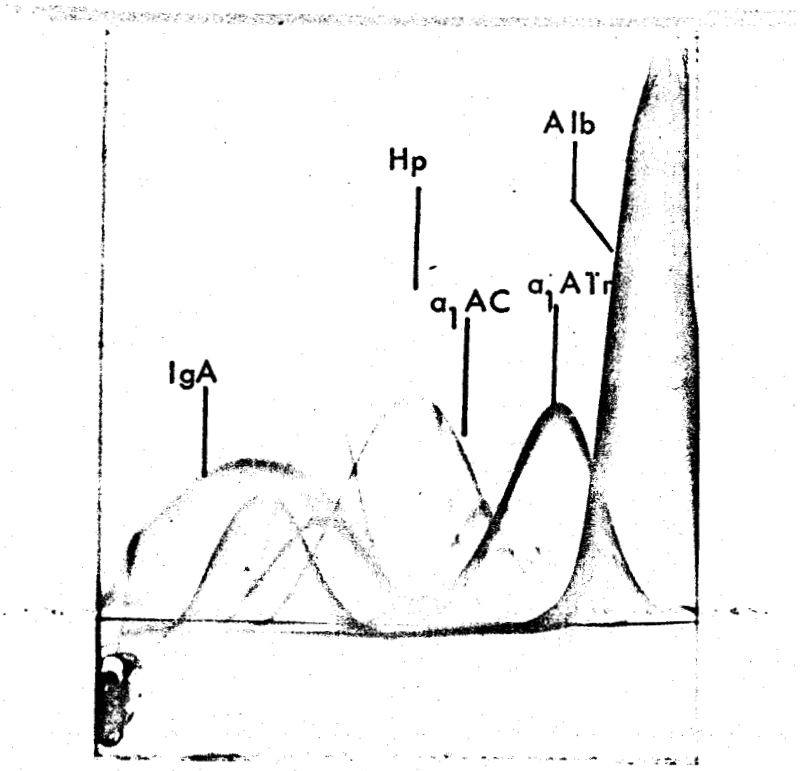
Le déficit partiel en α_1-antitrypsine peut être également objectivé par cette technique. Ce déficit en α_1-antitrypsine est particulièrement



(Immunsérum de Lapin anti-sérum humain total)

Figure I.G.1' : SECRETION BRONCHIQUE D'UN SUJET FUMEUR

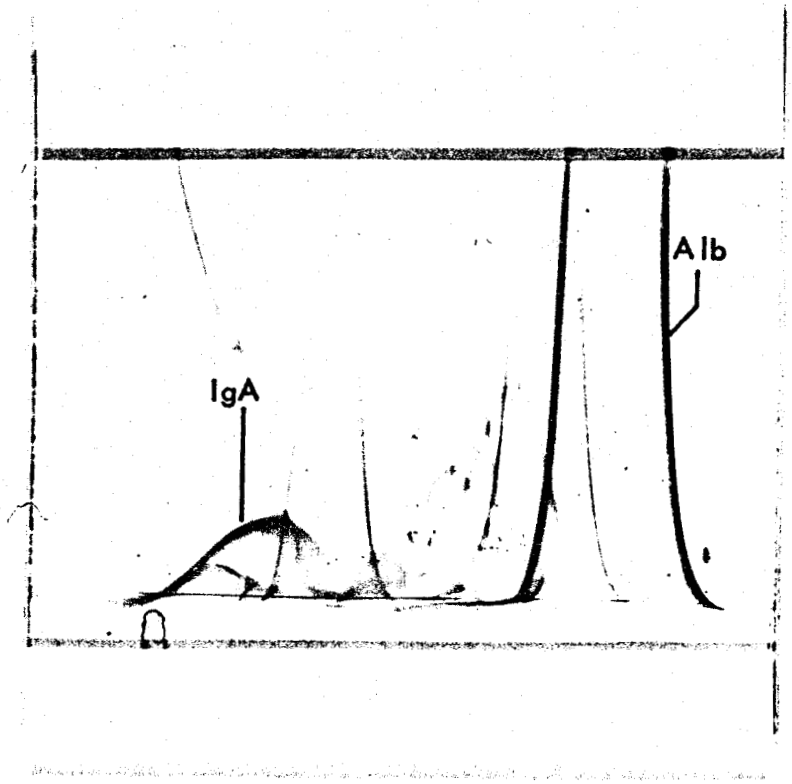
(" TEMOIN ")



BUS LILLE

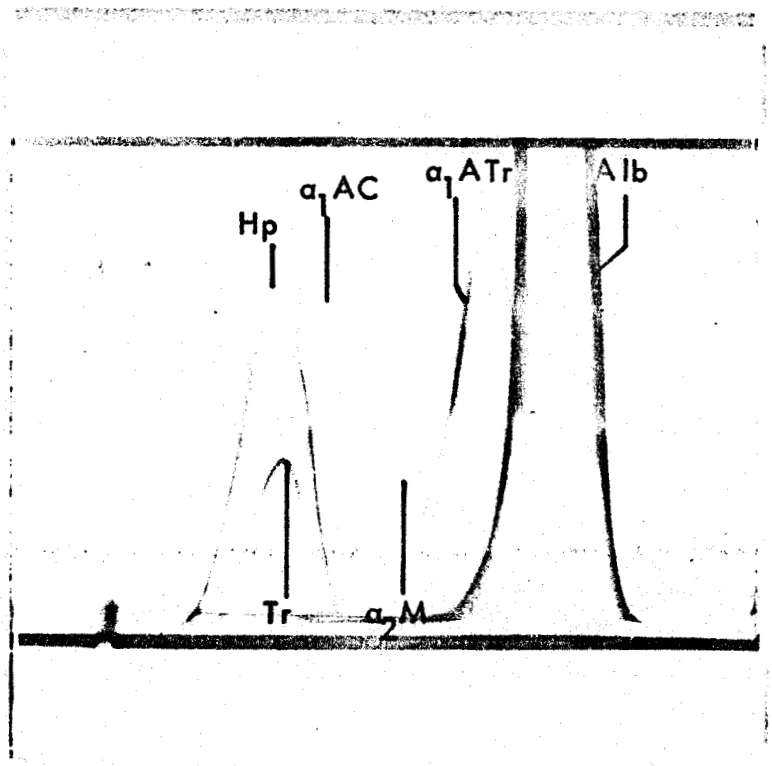
(Immunsérum de Lapin anti-sérum humain total)

Figure I.G.1" : SECRETION BRONCHIQUE D'UN BRONCHITIQUE CHRONIQUE.



(Immunsérum de Lapin anti-sérum humain total)

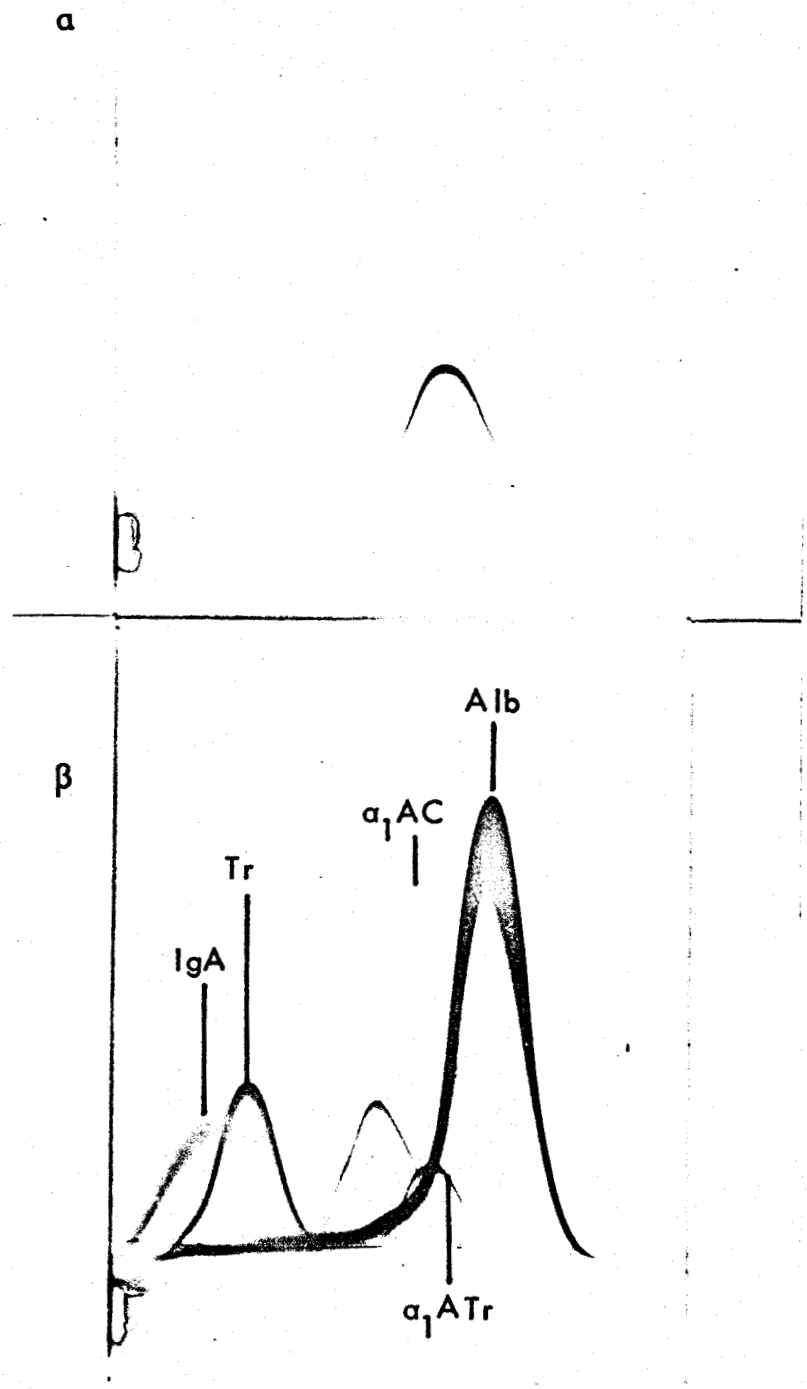
Figure I.G.2 : SECRETION BRONCHIQUE D'UN MALADE ATTEINT DE CANCER BRONCHIOLO-ALVEOLAIRE .



BUS LILLE

(Immunsérum de Lapin anti-sérum humain total)

Figure I.G.3 : SECRETION BRONCHIQUE D'UN MALADE PRESENTANT UN DEFICIT TOTAL EN IGA .



Immunoélectrophorèses bidimensionnelles avec :

α : l'immunsérum de Lapin anti-α_1-antitrypsine humaine

β : l'immunsérum de Lapin anti-sérum humain total

BUS LILLE

Figure I.G.4. : SECRETION BRONCHIQUE D'UN MALADE PRESENTANT UN DEFICIT PARTIEL EN α_1- ANTITRYPSINE .

(Sujet homozygote ZZ)

intéressant à mettre en évidence dans la sécrétion bronchique, car il a été prouvé qu'un sujet adulte, présentant un déficit héréditaire en α_1-antitrypsine (homozygote ZZ) avait une grande probabilité de développer un emphysème pulmonaire très grave (KUEPPERS et coll. , 1974). Pour obtenir en double dimension avec l'immunsérum de Lapin spécifique (Fig. I.G.4-a) un pic visible d' α_1-antitrypsine lors de l'étude du mucus d'un sujet homozygote ZZ il faut concentrer dix fois l'extrait de mucus ; d'autre part, une seule forme d'α_1-antitrypsine est observée, la forme de mobilité électrophorétique la plus rapide.

II. ESTIMATION QUANTITATIVE DES IGA ET DE LA SERUMALBUMINE DANS LE MUCUS BRONCHIQUE HUMAIN

II.A. Méthode de dosage

II.B. Homogénéisation du mucus

II.C. Caractéristiques du mucus homogénéisé

II.D. Etape d'échange ionique

II.E. Dosages des IgA-globulines et de la sérumalbumine du mucus bronchique humain

II.F. Etude critique des dosages

II.G. Premières corrélations entre études rhéologiques et biochimiques et fonction d'épuration de la sécrétion bronchique

Le bilan de nos connaissances sur les constituants protéiques de la sécrétion bronchique nous a permis de constater des variations individuelles importantes mais il faudrait pouvoir les quantifier. Nous avons cherché à mettre au point un protocole de dosages qui permettrait de mieux connaître les rapports existant entre la composition biochimique de la sécrétion et les propriétés physico-chimiques qui conditionnent la qualité d'épurateur bronchique. D'autre part, il semblait intéressant de tenter d'établir une corrélation entre la tendance à l'infection chez certains sujets et une éventuelle perturbation des IgA sécrétoires auxquelles on peut rattacher un rôle dans la défense immunitaire (WALDMAN et coll., 1974). La teneur en IgA de la sécrétion bronchique pourrait donc être un paramètre intéressant à connaître, comme un reflet de l'activité de synthèse de la muqueuse bronchique.

Il a, en effet, été démontré que la structuration des IgA sécrétoires est assurée tout au long de l'arbre respiratoire (COUTURIER et coll, 1973, BRANDTZAEG 1974) : les dimères d'IgA avec la chaîne J sont synthétisés par les plasmocytes sub-épithéliaux et le composant SC est produit par les cellules épithéliales des alvéoles et de la sous-muqueuse trachéo-bronchique.

D'autre part, la sérumalbumine a été choisie comme témoin de la transsudation plasmatique.

Les dosages d'IgA et de sérumalbumine ont été effectués par électro-immunodiffusion. Quelques adaptations ont dû être faites à cause de la nature du milieu sur lequel nous travaillons. Il nous a fallu également préparer des gammes étalons qui correspondent aux protéides à doser.

Cependant, le problème principal auquel nous avons été confrontée est celui de la volumétrie : il est impossible de prélever un échantillon volumétrique correct dans un liquide hétérogène et visqueux. Or, nous voulions que ces dosages soient effectués à partir d'une faible quantité de mucus (1 ml), pour pouvoir l'appliquer aussi bien aux expectorations limitées d'un asthmatique en crise qu'aux expectorations abondantes d'un bronchitique chronique ou d'un malade atteint de cancer bronchiolo-alvéolaire.

Dans tous les cas, l'hétérogénéité du milieu est telle que des variations importantes des taux de protéines dosées peuvent être observées dans des échantillons de 1 ml prélevés en des points différents au sein d'une même expectoration (VOISIN et coll., 1973). Nous avons donc été dans l'obligation de mettre au point un proto-

cole d'homogénéisation du mucus permettant de résoudre les problèmes posés par l'hétérogénéité de la sécrétion bronchique.

Une des particularités des IgA bronchiques étant de s'associer étroitement aux mucines (DEGAND, 1972), le problème de ces interactions devait donc également être résolu.

II. A. Méthode de dosage

La méthode de dosage par électroimmunodiffusion ou méthode des "rockets", est simple, rapide et reproductible (WEEKE, 1973). Le principe est le même que celui de l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle : c'est-à-dire que l'on fait migrer des antigènes dans un gel d'agarose contenant des anticorps. L'utilisation d'un immunsérum monospécifique est nécessaire et une gamme étalon de titre connu en antigène doit être préparée. Quelques adaptations ont dû être faites à la technique originale pour qu'elle soit applicable à la sécrétion bronchique : les dépôts sont plus espacés (7 mm au lieu de 5 mm), le voltage appliqué est plus faible, ce qui augmente la durée de migration. En effet, les migrations en rockets à haut voltage que nous avons pu faire sur des extraits de mucus ne donnaient pas de pics nets de précipitation. Il faut également trouver les concentrations en anticorps convenables pour obtenir des pics mesurables.

II.A.1. Préparation des gammes étalons

II.A.1.a Gamme de sérumalbumine

La gamme étalon est réalisée à partir d'un sérum standard Behring dont le taux en sérumalbumine est connu (sérum standard Behring ORDT 570 AM, 4180 mg/100 ml). Des dilutions au 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000 et 1/4000 sont faites et correspondent donc à des concentrations en sérumalbumine de 20,9 ; 8,3 ; 4,18 ; 2,09 ; 1,04 mg/100 ml.

II.A.1.b. Gamme d'IgA

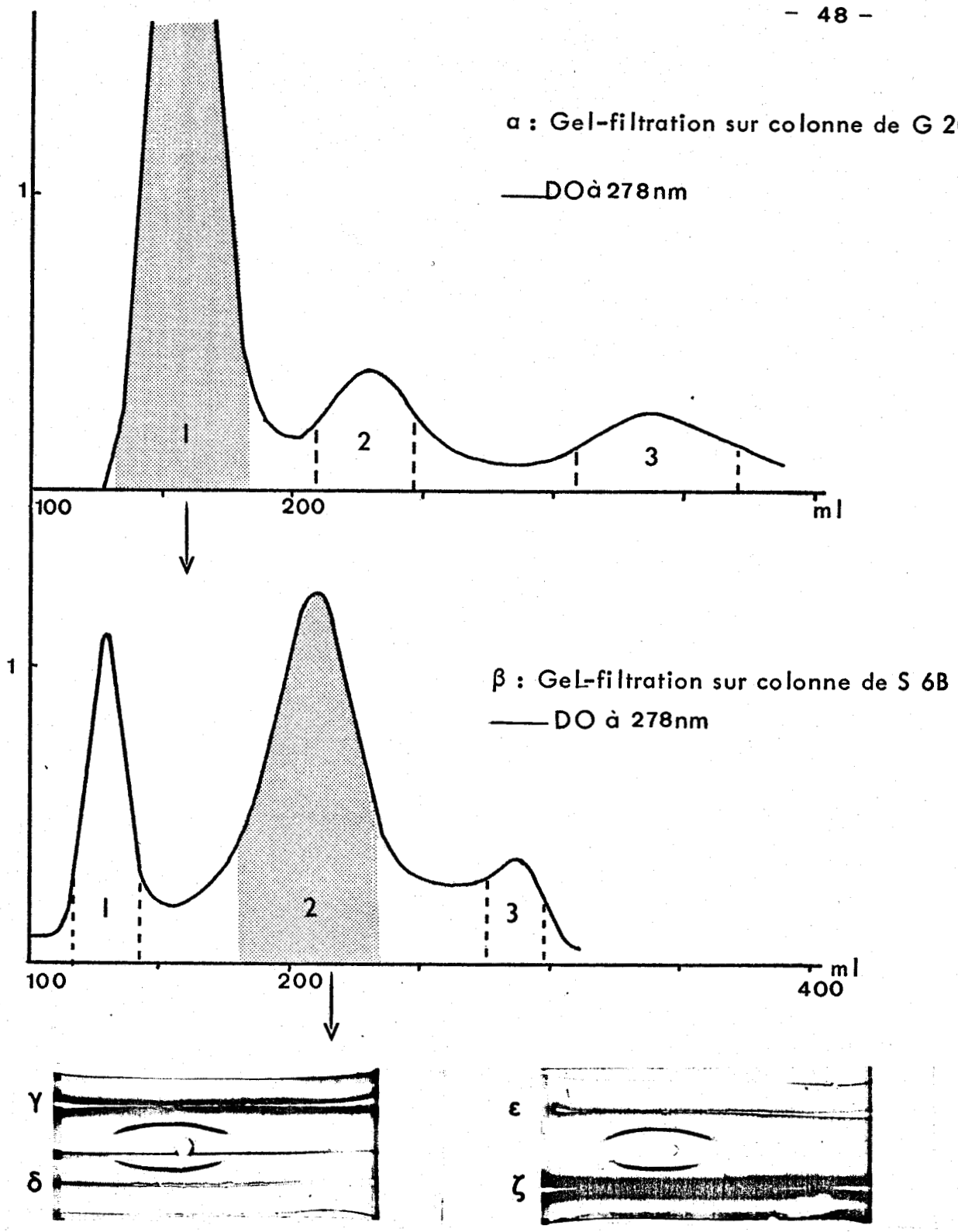
Il a déjà été démontré (MASSON et coll., 1966, HAVEZ et coll., 1966) que les IgA rencontrées dans le mucus bronchique et dans la muqueuse bronchique sont essentiellement des IgA 11 S. Il est donc nécessaire d'effectuer les dosages par rapport à une gamme d'IgA sécrétoires 11 S, car dans la technique d'électro-immunodiffusion la taille moléculaire de l'antigène que

l'on fait migrer influe sur la hauteur du pic de précipitation obtenu. Nous reviendrons ultérieurement sur cette question.

La gamme étalon d'IgA 11S est constituée par une solution d'IgA colostrales humaines convenablement diluée. La préparation des IgA colostrales (HAVEZ et coll., 1973) est une modification de la méthode préconisée parMUH (1966) qui était déjà une adaptation de la méthode de MONTREUIL et coll. (1960-b). Nous avons éliminé tout passage de la solution d'IgA en milieu acide susceptible d'introduire une modification de structure d'une partie des IgAs dissociables en milieu acide (MUH, 1966). La lyophilisation est évitée, car elle modifie la constante de diffusion des IgAs en milieu gélifié : elle provoque en effet une polymérisation. De toute façon, la poudre obtenue après lyophilisation n'est que partiellement soluble. Le protocole de fractionnement du lait est le suivant :

100ml de lait colostral sont délipidés par centrifugation à 10 000 tours/minute pendant 30 minutes dans une centrifugeuse refroidie à 4°C. Le lactosérum est ensuite amené à 33p.100 de saturation en sulfate d'ammonium avec une solution saturée de sulfate d'ammonium. Le pH est maintenu à 7,0. Après 16 heures à 4°C, le mélange est centrifugé à 4°C pendant 30 minutes à 10 000 tours/minute. On recueille la solution surnageante qui est ajustée à 50 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium. Après 16 heures à 4°C, le précipité est recueilli par centrifugation, dissous dans l'eau désionisée. La solution est dialysée 3 jours à 4°C contre de l'eau désionisée. Elle est ensuite concentrée sur un appareil Diaflo, sous pression d'azote (membrane UM 2). Les IgA sont séparées des protéines de plus faible taille moléculaire par chromatographie sur colonne (2,6 x 100 cm) de Sephadex G 200 en tampon Tris 0,1M , NaCl 0,2M de pH 8,0 contenant 0,02 p.100 d'azide de sodium (Fig. II.A.1.b-α). Les IgA de sécrétion exclues du gel de Sephadex G 200 sont recueillies, dialysées et concentrées, puis purifiées par chromatographie sur colonne de Sepharose 6 B (2 x 75 cm) équilibrée dans la même solution tamponnée (Fig. II.A.1.b-β). On élimine ainsi une fraction de masse molaire élevée, tandis que les IgA sont identifiées dans une fraction majeure faiblement retardée. La solution obtenue est dialysée puis concentrée sur appareil Diaflo jusqu'à une concentration de l'ordre de 5 à 7 mg/ml.

Son étude immunoélectrophorétique est effectuée avec différents immunsérums de Lapin (Fig. II.A.1.b): anti-chaîne α (γ), anti-



Immunoélectrophorèse de la fraction 2 de S 6B avec les immunsérums de Lapin :

γ : anti-chaîne α

δ : anti-sérum humain total

ε : anti-IgAs

ζ : anti-lait humain total

BUS LILLE

Figure II.A.1.b. : PURIFICATION DES IGA COLOSTRALES

CONTROLE DE LEUR PURETE

sérum humain total (δ), anti-IgAs (ε), anti-lait humain total (ζ) . D'après les résultats obtenus nous voyons que la solution d'IgA de sécrétion est d'une pureté très satisfaisante, en particulier elle n'est pas contaminée par de la lactotransferrine (un seul arc avec l'anti-lait humain total). Le dosage de la solution d'IgA purifiées est effectué par la méthode de LOWRY (1951) (technique de BISERTE et coll., 1957)* La solution d'IgA colostrales titrée est répartie en plusieurs échantillons conservés à -20°C.

La gamme étalon est préparée à partir de cette solution mère d'IgA 11 S; elle doit être conservée à 4°C (les dilutions effectuées fournissent des concentrations de 150, 100, 75, 50, 25, 10 mg/ml). La gamme est utilisable dans ces conditions pendant 15 jours.

Nous avons comparé les courbes d'étalonnage établies avec des IgA plasmatiques (dilutions d'un sérum standard titré Behring **), d'une part , et des IgA colostrales purifiées d'autre part. Le coefficient obtenu est de 2,74 ± 0,17 (LEBAS, 1971). Il représente le nombre par lequel doit être multipliée la valeur obtenue en dosant une solution d'IgA de sécrétion par rapport à une gamme d'IgA sériques pour avoir son expression en terme d'IgA 11 S (cette valeur est comparable à celle que BRANDTZAEG et coll., 1970, ont déterminée : 3,25***)

II.A.2. Immunsérums utilisés

II.A.2.a Anti-sérumalbumine

Nous utilisons l'anti-sérumalbumine Behring (ORCB , lot n° 2448 L ; titre en anticorps: 1,1 mg/ml) à raison de 0,1 ml d'immunsérum pour 15 ml d'agarose.

II.A.2.b. Anti-IgA

Les IgA sécrétoires sont constituées de deux molécules d'IgA 7 S auxquelles se joignent le composant sécrétoire SC et la chaîne J. Elles possèdent donc les déterminants antigéniques communs aux IgA 7 S et aux IgA 11 S :

---

* La gamme de référence est établie à partir d'une solution titrée de sérumalbumine bovine cristallisée.

** La concentration en IgA-globulines du sérum standard titré de l'Institut Behring a été déterminée par la méthode de l'immunodiffusion radiale et à l'aide de préparation de protéine pure (titre en IgA : 155 U.I/ml soit 260 mg/ml).

*** Ces auteurs ont utilisé l'immunodiffusion radiale comme technique de dosage.

chaînes lourdes α et chaînes légères, et d'autre part, un déterminant spécifique du composant sécrétoire. Le déterminant antigénique de la chaîne J est masqué : en effet, la chaîne J ne peut être révélée sur la molécule entière d'IgA 11 S.

Un immunsérum anti-SC (Nordic) ne nous a donné, jusqu'à présent, que de mauvais résultats dans les techniques d'électro-immunodiffusion : la spécificité de cet immunsérum est obtenue par saturation et la présence importante de protéines dissoutes empêche la bonne décoloration des électrophorégrammes.

Nous avons donc utilisé un immunsérum anti-chaîne α Behring ORCI T 1988 N,(titre en anticorps : 0,8 mg/ml) ou Technicon T 21-0452, lot n°B3F794, (titre en anticorps non indiqué) , à raison de 30 µl pour 15ml d'agarose. Avec cet immunsérum, nous effectuons un dosage global des IgA de type sérique et de type sécrétoire, qui sera un dosage en excès puisque les IgA 7 S qui peuvent se trouver dans le milieu sont exprimées en IgA 11 S.

Il faut signaler que l'utilisation de l'immunsérum spécifique du composant SC présenterait d'autres inconvénients. En effet certains auteurs ont démontré que des IgA sécrétoires pouvaient être dépourvues de composant SC. Ainsi MESTECKY et coll. (1970) estiment que cette proportion est de 10 p.100 pour les IgA colostrales. En ce qui concerne les IgA bronchiques, MEDICI et coll. (1971) pensent que la muqueuse endommagée des bronchiteux chroniques ne synthétise plus suffisamment de composant sécrétoire : il existerait donc une proportion non négligeable, d'après ces auteurs, d'IgA bronchiques ne contenant pas ce composant sécrétoire.

II.B. Homogénéisation du mucus

II.B.1. Procédés d'homogénéisation et de liquéfaction du mucus bronchique mis en œuvre par d'autres auteurs

S'il était nécessaire d'établir la preuve que la sécrétion bronchique est un milieu fort complexe et difficile à étudier, il suffirait d'énumérer les diverses techniques qui ont été préconisées pour homogénéiser ou liquéfier la sécrétion bronchique en vue de son étude électrophorétique et des dosages.

II.B.1.a Procédés chimiques

Une hydrolyse chlorhydrique ménagée a été proposée par BUKANTZet coll. (1958) mais le passage à pH 2,3 est à éviter si l'on désire conserver aux protéides l'ensemble de leurs propriétés.

BISERTE et coll. (1963) ont utilisé l'urée 6 M, mais la préparation bien liquide obtenue ne donne pas de bons résultats lors de l'étude électrophorétique. TURGEON et coll. (1969) font agir la soude normale pour réduire la viscosité des mucus et neutralisent ensuite avec HCl 1 N.

LIEBERMAN et coll. (1970) effectuent des études sur le mucus de la poche trachéale du Chien : un volume de NaCl 0,15 M de pH 7,5 est ajouté et le mélange est agité vigoureusement. Après une heure d'incubation à 37°C, le mélange est centrifugé pendant 30 minutes à 1 500 g (l'opération est répétée 2 fois sur le culot obtenu). GERNEZ-RIEUX et coll. (1964) étudient l'activité in vitro de différents agents réduisant la viscosité de l'expectoration et particulièrement les agents réducteurs (L-cystéine, N-acétylcystéine). Ces agents réducteurs, auxquels on peut ajouter le mercapto-éthanol et le dithiothréitol, ont été et sont très utilisés au laboratoire pour le fractionnement des mucines de la sécrétion bronchique.

II.B.1.b Procédés mécaniques

IBAYASHI et coll. (1963) procèdent à 6 congélations-décongélations suivies de centrifugation à 2 000 tours/minute pendant 15 minutes.

De nombreux auteurs utilisent un homogénéiseur (SUHS et coll., 1965 ; BURGI et coll., 1967, NEWCOMB et coll., 1969, GOTZ et coll. 1970 ; POIRIER, 1972 ; VOISIN et coll., 1973). Les opérations sont généralement effectuées pendant quelques minutes à 4°C.

RYLEY et coll. (1968) réalisent une ultracentrifugation à 118.000 g pendant 4 heures à 4°C et étudient le surnageant obtenu.

II.B.1.c Procédés physico-chimiques

BROGAN (1960) utilise l'action des ultra-sons (de fréquence 20 kH_z) pendant 2 heures sur la phase géliforme du mucus bronchique. Il obtient alors une solubilisation totale des macromolécules.

L'utilisation de résines cationiques a été tentée par BISERTE et coll. (1963) et a permis une liquéfaction du gel qui s'accompagne d'une

baisse de pH très importante et génante.

II.B.1.d : Procédés enzymatiques :

BROGAN (1959) utilise la pepsine pour homogénéiser le mucus.

BISERTE et coll. (1963) comparent l'action de plusieurs enzymes sur la sécrétion : hyaluronidase et thiomucase sont inactives; chymotrypsine et trypsine sont actives.

II.B.1.e : Association de plusieurs procédés :

RASCHE et coll. (1971) et SZABO et coll. (1973) soumettent la sécrétion à une ultracentrifugation (25000 tours/minute) pendant 4 heures puis utilisent pendant 4 minutes les ultra-sons dont la fréquence est 20 kHz.

SALVAGGIO et coll. (1973) soumettent l'expectoration aux ultra-sons pendant 10 secondes (*), centrifugent à 2 000 tours/minute, dialysent, lyophilisent.

II.B.2. Mise au point d'une technique d'homogénéisation :

II.B.2.a : Remarques sur les divers procédés précités :

Parmi tous ces procédés, nous devons en rejeter plusieurs d'emblée puisqu'ils sont incompatibles avec l'étude que nous désirons mener. En effet, les dosages immunologiques que nous voulons effectuer nécessitant une récupération quantitative et la conservation de l'intégrité des déterminants antigéniques des molécules. Donc l'hydrolyse chlorhydrique, l'action de l'urée 6 M, des agents réducteurs, d'enzymes protéolytiques ne peuvent être retenues; l'utilisation d'ultra-sons de grande puissance pendant une durée prolongée est également destructrice.

Les autres procédés agissent sur la viscosité du mucus et permettent d'obtenir une solution homogène, mais les interactions mucines-protéines subsistent et sont négligées. Ainsi VOISIN et coll. (1973) ont appliqué l'homogénéisation mécanique à quelques mucus (**) ; ils comparent

---

(*) La seule indication donnée par les auteurs est la puissance de l'appareil : 80 Watts

(**) Ces auteurs homogénéisent les mucus pendant 1 à 3 minutes à l'aide d'un "homogenizer Virtis 45", 10 000 tours/minute.

en rockets les pics d'IgA obtenus avant et après homogénéisation. Dans trois des quatre expectorations étudiées, ils observent dans l'échantillon qui a subi l'homogénéisation une baisse importante du taux d'IgA. Ce phénomène correspond sans doute à un artéfact. En effet, l'homogénéisation mécanique provoque la formation d'une suspension micellaire masquant les molécules protéiques et en particulier les IgA.

En ce qui concerne l'ultracentrifugation préconisée par RYLEY et coll. (1968), nous l'avons appliquée à quatre mucus et nous avons comparé les résultats ainsi obtenus à ceux donnés par la méthode que nous avons mise au point (paragraphe II.F.1.ap:84). Nous verrons que les interactions mucines-protéides sont également négligées dans cette méthode.

II.B.2.b : Essais préliminaires :

Pour dissocier les réseaux fibrillaires du mucus nous avons tout d'abord pensé faire agir l'EDTA qui complexe les ions Ca^{++} et Mg^{++}, mais le pH du mucus s'est abaissé jusqu'à la valeur de 1,0 et ce pH est trop acide.

Un autre moyen d'éliminer les ions est de les capter par une résine. Nous avons déjà cité les essais de BISERTE et coll. (1963) une dialyse de la phase géliforme du mucus contre la résine cationique (Amberlite IR 120) amène une rupture brutale de la structure fibrillaire du gel. A l'époque où ces travaux avaient été réalisés, ce phénomène avait été mis en corrélation avec la baisse importante de pH qui résultait de l'emploi de la résine.

Afin de désioniser totalement le mucus nous avons effectué une dialyse contre deux types de résine : une résine anionique (AG 2 x 8) et une résine cationique (AG 50 W x 8) (20-50 mesh Bio-Rad). L'utilisation successive des deux résines nous a permis de démontrer que seule la résine cationique était nécessaire. Son action suffit pour obtenir l'homogénéisation du mucus. Nous avons cependant substitué la résine AG 50W x 2 (20-50 mesh Bio-Rad) à la résine AG 50 W x 8 ; car son degré de réticulation est plus faible cette résine doit donc pouvoir capter des constituants du mucus de plus grande taille, notamment dans la série des polypeptides.

Enfin, avant de faire agir la résine cationique, nous avons essayé d'obtenir une dissociation du réseau fibrillaire par l'action

des ultra-sons pendant un temps court.

II.B.2.c : Protocole d'homogénéisation :

Le mucus est soumis à l'action des ultra-sons. (appareil Bransonic 100 Watts, 50-55 kHz) pendant 6 minutes à 4°C. Immédiatement après, on ajoute la résine AG 50 W x 2 sous forme H^+ (20-50 mesh Bio-Rad), à raison de 100 mg pour 5 ml de mucus (le protocole est cependant applicable à des volumes inférieurs ou supérieurs). Des billes de verre sont ajoutées pour faciliter le mélange du mucus avec les grains de résine. L'agitation est effectuée pendant 2 heures à 4°C à l'aide d'un agitateur à mouvement lent de va-et-vient horizontal.

II.B.2. d : Définition de l'action des ultra-sons et de la résine :

Les ultra-sons provoquent une dissocation du réseau fibrillaire qui est réversible lorsque l'action de ces ultra-sons est de courte durée ; en effet, le mucus ainsi traité et laissé quelques heures à la température du laboratoire, retrouve rapidement une organisation fibrillaire. Pour éviter cette réorganisation, nous faisons de suite intervenir une résine qui échange ses ions H^+ contre les ions présents dans le mucus (NH_4^+, K^+, Na^+....) et contre des peptides, surtout de type basique. Ce phénomène d'échange provoque une baisse de pH qui est variable selon les mucus (Tableau II.E.1. , p : 74).

L'étude des constituants fixés sur la résine cationique a été entreprise. Pour avoir une quantité de matériel suffisante, après élution, l'homogénéisation d'une quantité importante de mucus a été effectuée. (un essai sur 1 200 ml, un essai sur 1 000 ml) (*). Après agitation, les grains de résine et les billes de verre sont séparées du mucus par décantation. Après lavage abondant par de l'eau distillée, 20 ml de résine sont récupérés et placés dans une petite colonne (1 x 10 cm) munie d'un verre fritté. Après un nouveau lavage abondant l'élution des constituants fixés sur la résine est effectuée par 20 ml d'ammoniaque 2 N. L'éluat est récupéré dans une coupelle et l'ammoniac est évaporé. Le résidu sec, repris dans 6 ml d'eau distillée, fait l'objet de deux types

---

(*) Lors de ces expériences toute la verrerie utilisée ainsi que les billes de verre sont soigneusement lavées dans HCl 3 N puis rincées abondamment par de l'eau distillée.

d'étude : étude électrochromatographique et étude en gel -filtration.

Les résultats obtenus en collaboration avec V. BAILLEUL, peuvent être résumés de la façon suivante :

- En électrochromatographie (électrophorèse à pH 3,6 chromatographie dans le N-butanol/acide acétique/eau (4/1/5)). On met en évidence de nombreuses taches ninhydrine positive. Après hydrolyse acide totale (HCl 5,6 N), on rélève la présence de nombreux acides aminés, notamment proline, acide glutamique et glycocolle qui sont importants.

- En chromatographie de gel-filtration sur Biogel P_2, trois fractions peptidiques peuvent être séparées dont l'étude est actuellement en cours (travail de V. BAILLEUL).

II.B.2.e : Comportement de protéides purifiés soumis au protocole d'homogénéisation

Nous avons soumis des solutions de protéides purs au même protocole comportant l'action des ultra-sons et celle de la résine cationique ; puis nous avons essayé de démontrer qu'en électro-immunodiffusion, la récupération de ces constituants était quantitative.

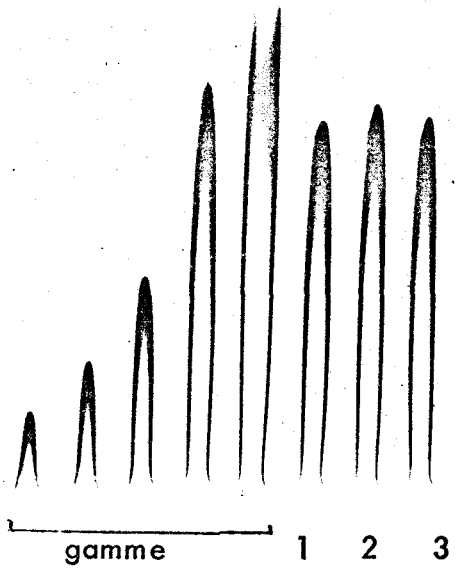
1°) Sérumalbumine (Fig. II.B.2.e-α)

5 mg de sérumalbumine humaine (Behring) sont dissous dans 5 ml de tampon phosphate 0,01 M de pH 5,0 ; 0,1 ml de cette solution constitue le témoin "sérumalbumine native". Sur le volume restant, est applique notre protocole d'homogénéisation. On prélève 0,1 ml après chacune des deux étapes essentielles. Le dosage de ces différentes solutions par rapport à des dilutions de la gamme étalon indique que nous retrouvons la même quantité de sérumalbumine après chaque traitement.

2°) IgA (Fig II.B.2.e-β)

De façon identique, une solution d'IgA colostrales purifiées a été soumise aux opérations d'homogénéisation. Cependant, il nous fallait tout d'abord choisir un tampon dont le pH, après action de la résine cationique, ne soit pas trop acide : les IgA colostrales sont en effet particulièrement sensibles au pH acide (MUH, 1966).

A 5 ml de tampon phosphate 0,1 M de pH 7,0, on ajoute 0,5 ml d'une solution d'IgA colostrales à 570 mg/100 ml.

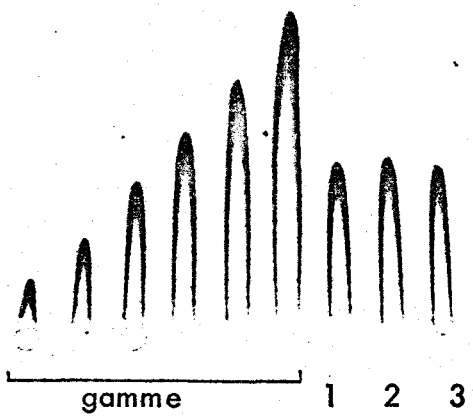


α : solution de sérumalbumine.

1 solution de sérumalbumine "native".

2 solution de sérumalbumine après action des ultra-sons.

3 solution de sérumalbumine après action des ultra-sons et de la résine AG50 Wx2.



β : solution d' IgA colostrales.

1 solution d'IgA colostrales "native" .

2 solution d'IgA après action des ultra-sons.

3 solution d'IgA après action des ultra-sons et de la résine AG50 Wx2 .

BUS LILLE

Figure II.B.2.e : ACTION DU PROTOCOLE D' HOMOGENEISATION SUR DES SOLUTIONS DE SERUMALBUMINE ET D' IGA COLOSTRALES HUMAINES PURIFIEES .

Après chaque étape 0,1 ml sont prélevés. Le dosage de chacune de ces solutions, par rapport à une gamme étalon d'IgA colostrales, indique que nous retrouvons la même quantité d'IgA après chaque étape.

Ce résultat montre que les ultra-sons et la résine cationique ont respecté la molécule d'IgA de sécrétion, car si cette molécule avait été dissociée en IgA 7 S, nous aurions observé en électro-immuno diffusion une forte augmentation de la hauteur du pic (voir paragraphe II.A.1.b)

II.C. Caractéristiques du mucus homogénéisé :

L'appréciation de l'homogénéité du mucus est faite par l'examen macroscopique de l'échantillon : après l'application de notre protocole, nous ne distinguons plus de phase géliforme et de phase soluble dans le mucus. Des études de la reproductibilité des dosages prouveront cette homogénéité.

II.C.1 . Etudes de la rhéologie du mucus :

Avec le concours de Madame PUCHELLE (Unité INSERM de Nancy), des études comparatives de la viscosité et de la recouvrance élastique du mucus avant et après homogénéisation ont été effectuées. Elles ont été réalisées sur cinq mucus à l'aide du rhéomètre rotatif, (type Rotovisko, Haake). Les résultats sont rapportés dans le Tableau II.C.1 . Les valeurs de la viscosité et de la recouvrance élastique, pour un taux de cisaillement de 0,3 sec^{-1}, sont très nettement diminuées après homogénéisation . Le procédé utilisé affecte donc notablement les propriétés rhéologiques du mucus et permet des mesures volumétriques correctes.

Il faut signaler l' imperfection des résultats obtenus sur quelques mucus très visqueux (viscosité $>$ 400 poises, alors que pour les autres mucus la viscosité varie de 25 à 300 poises). Dans ce cas, nous obtenons certes, un milieu homogéne, mais encore trop visqueux pour que la mesure d'un volume soit très précise.

II.C.2. Cytologie :

Les cellules présentes dans l'expectoration ne sont pas détruites après homogénéisation (contrôle au microscope optique) : on peut donc en conclure que les constituants cellulaires ne diffusent pas après l'étape d'homogénéisation.

Tableau II.C.1

ETUDE DES PROPRIETES RHEOLOGIQUES DU MUCUS HOMOGENEISE

(après ultra-sons et action de la résine AG50 Wx2)

	η_o	S_R
Mucus n° 1		
natif	379,4	8,5
homogénéisé	123,1	1,5
Mucus n° 2		
natif	172,1	9,9
homogénéisé	123,8	0,07
Mucus n° 3		
natif	301,8	3,2
homogénéisé	72,7	0,37
Mucus n° 4		
natif	282,5	8,3
homogénéisé	88,9	1,6
Mucus n° 5		
natif	273,9	1,6
homogénéisé	50,6	0,1

η_o : viscosité exprimée en poises *

S_R : recouvrance élastique

BUS LILLE

* Unité "Système International" (SI) : poiseuille. 1 poise = 0,1 poiseuille.

II.C.3. pH du mucus homogénéisé :

Après homogénéisation, le pH du mucus est plus acide que celui du mucus natif. Les valeurs sont indiquées dans le Tableau (II.E.1)Alors que pour les mucus natifs, le pH varie de 5,9 à 8,9, après homogénéisation, il varie de 3,0 à 6,4.

II.C.4 : Capacité d'échange ionique :

La capacité d'échange d'ions de l'expectoration homogénéisée a été mesurée par titrage potentiométrique. Les résultats (Figure II.C.4) permettent d'assimiler le mucus homogénéisé à un échangeur d'ion faible, de caractère carboxylique, dont la valeur du pH voisine de 6 s'apparente à celle de la carboxy-méthyl cellulose . Ce pouvoir d'échange ionique peut être rattaché à l'activité de certaines classes de mucines bronchiques, mucines polyanioniques, dont l'affinité pour les IgA et la lactotransferrine a pu être démontrée (DEGAND, 1972).

II.C.5 : Critères électrophorétiques :

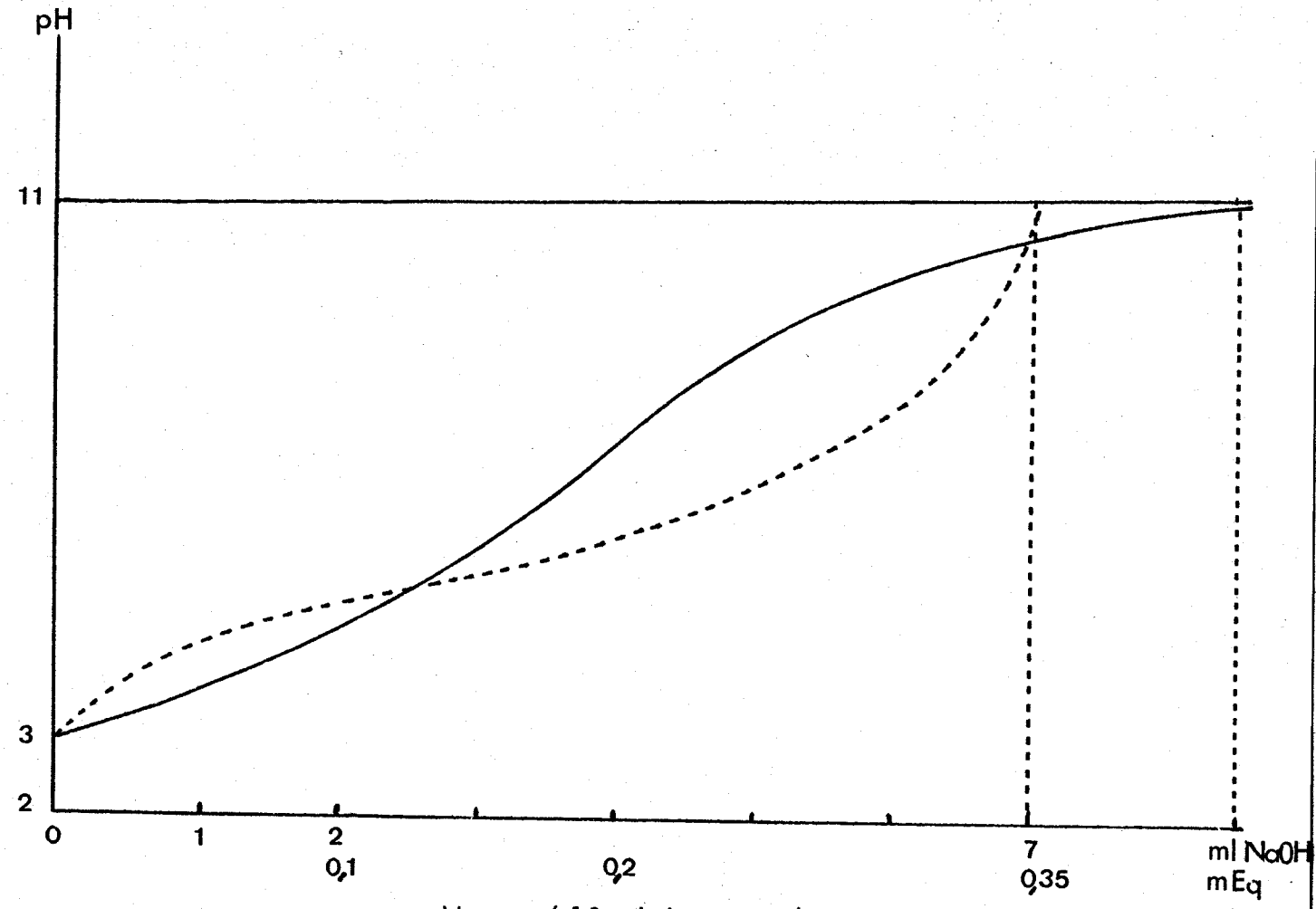
Une immunoélectrophorèse en double dimension du mucus homogénéisé revélée avec un immunsérum de Lapin anti-sérum humain total, montre que des interactions entre mucines et protéides subsistent (Figure II.C.5); au niveau du dépôt, on peut voir la persistance de substances qui n'ont pas migré. L'arc des IgA présente des traînées : c'est la preuve que les IgA sont encore liées à d'autres constituants et ne peuvent migrer normalement.

L'action des ultra-sons et de la résine cationique provoque donc une modification du réseau fibrillaire mais laisse subsister des interactions mucines-protéides.

II. D. Etape d'échange ionique :

II.D.1. Protocole :

Les conditions d'utilisation de l'Ecteola-cellulose sont modifiées par rapport à celles de la première partie, car, après homogénéisation le pH du mucus est en moyenne égal à 5,0 ; nous utiliserons donc un tampon



——— Mucus (10 ml de mucus homogénéisé dans 10 ml d'eau)

- - - - CMC (500 mg dans 10 ml d'eau)

Titrage effectué avec de la soude 0,05 N

Le mucus étudié dans cette expérience a une capacité de 0,425 mEq de NaOH pour 10 ml . (Les valeurs trouvées pour 15 mucus étudiés s'échelonnent de 0,3 à 0,6 mEq de NaOH)

Figure II.C.4. : APPRECIATION DE LA CAPACITE D'ECHANGE DE 10 ml DE MUCUS HOMOGENEISE A pH 11 , PAR RAPPORT A CELLE DE 500 mg DE CARBOXYMETHYLCELLULOSE (CMC : 0,7 mEq / g)

BUS

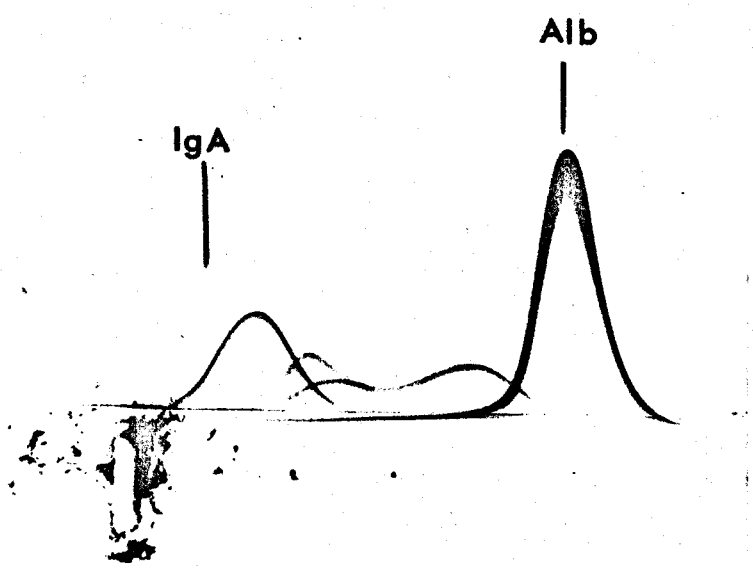


Figure II.C.5 : IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE DU MUCUS HOMOGENEISE AVEC L' IMMUNSERUM DE LAPIN ANTI-SERUM HUMAIN TOTAL.

BUS LILLE

de pH égal à 5,0

II.D.1.a : Choix du tampon :

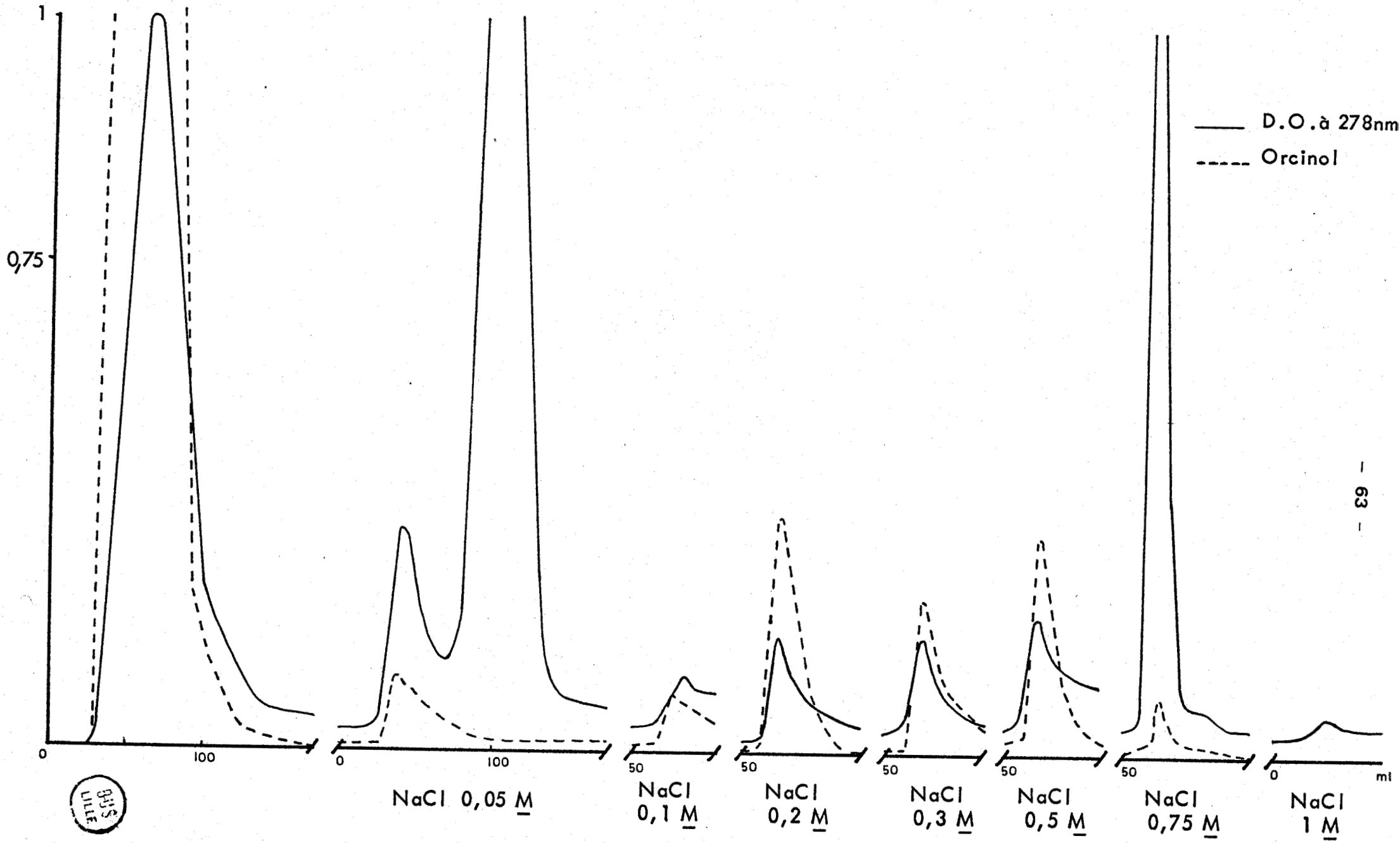
La force ionique nécessaire pour l'élution des protéides du mucus fixés sur l'échangeur d'ion a été déterminée par l'expérience suivante :

après l'homogénéisation, le mucus est fortement désionisé; nous le mettons donc en contact avec l'Ecteola-cellulose équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 0,01 M ne contenant pas de chlorure de sodium. 50 ml de mucus homogénéisé sont déposés sur une colonne d'Ecteola-cellulose ; la colonne est lavée par le tampon phosphate de sodium 0,01 M Puis l'élution est faite avec un gradient discontinu en molarité de NaCl (de 0,05 M à 1 M). Les résultats obtenus sont indiqués sur la Fig.II.D.1.a. . La majeure partie des protéides du mucus est éluée par le tampon phosphate de sodium 0,01 M et par le tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,05 M Ensuite, l'interprétation du diagramme au moyen du dosage des oses par la méthode à l'orcinol, nous indique que les mucines commencent à être éluées par les tampons de molarité supérieure en NaCl (0,2 M et plus). Nous considérons donc qu'en choisissant une molarité égale à 0,15 M NaCl (comme dans la première partie) nous éluons de l'Ecteola-cellulose l'ensemble des protéides du mucus.

Donc, pour atteindre en "batch adsorption" une molarité finale voisine de 0,15 M en NaCl, nous ajoutons au mélange de 1 ml de mucus homogène et d'Ecteola-cellulose, 2 ml de tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,3 M de pH 5,0.

II.D.1.b : Détermination de la quantité d'Ecteola-cellulose nécessaire :

Les conditions d'utilisation dépendent de la capacité des lots d'Ecteola-cellulose : par exemple, si la capacité est de 0,5 mEq/g sec. on peut traiter 1 ml de mucus avec 0,6 g d'Ectéola-cellulose humide. Nous avons, en effet, démontré, en traitant deux mucus de composition très différente (Tableau II.D.1.b) qu'une quantité supérieure d'Ecteola-cellulose n'amène pas une meilleure extraction des protéides (IgA



BUS LILLE

Tampon phosphate de sodium 0,01 M de pH 5,0 . Gradient discontinu en NaCl .

Figure II.D.1.a. : CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE IONIQUE D'UN MUCUS HOMOGENEISE SUR ECTEOLA - CELLULOSE

Tableau II.D.1.b

DETERMINATION DE LA QUANTITE D'ECTEOLA-CELLULOSE (0,5 mEq/g.sec) NECESSAIRE POUR L'EXTRACTION DES IGA ET DE LA SERUMALBUMINE DE 1 ml DE MUCUS HOMOGENEISE .

1 ml de mucus homogénéisé	0,6 g d'Ecteola-cellulose *	1 g d'Ecteola-cellulose *
Mucus n°1		
IgA	22	23
Sérumalbumine	25	26
Mucus n°2		
IgA	200	193
Sérumalbumine	35	28,5

(résultats des dosages exprimés en mg/100 ml de mucus)

* Ecteola-cellulose humide équilibrée en tampon phosphate de sodium 0,01 M de pH 5,0 .

BUS LILLE

et sérumalbumine).

II.D.1.c . Mode opératoire de l'extraction :

L'extraction s'effectue à 4°C de la façon suivante : immédiatement après l'homogénéisation, on dépose 1 ml de mucus exactement mesuré dans un petit erlenmeyer et 0,6 g d'Ecteola-cellulose humide équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 0,01 M de pH 5,0. Ce mélange est agité pendant 30 minutes. Puis après addition de 2 ml de tampon phosphate de sodium 0,01 M NaCl 0,3 M de pH 5,0 le mélange est à nouveau agité pendant 15 minutes puis centrifugé pendant 10 minutes à 6.500 tours/minute. La solution surnageante (E_1) recueillie, correspond à une dilution au tiers du mucus. Nous l'appelons "extrait" de mucus homogénéisé. Le culot de centrifugation est repris dans 1 ml de tampon phosphate de sodium 0,01 M NaCl 0,3 M de pH 5,0. Après une nouvelle agitation de quinze minutes, le mélange est centrifugé dans les mêmes conditions. La solution surnageante (E_2) est également recueillie.

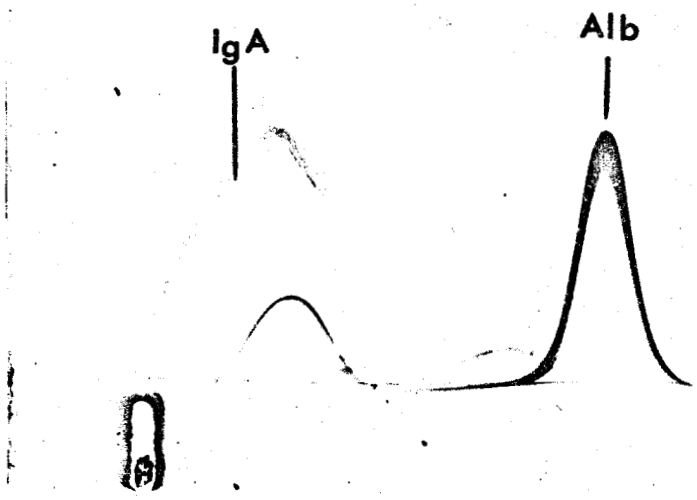
II.D.2 . Etude de l'extrait de mucus homogénéisé :

Il faut tout d'abord déterminer si l'extrait de mucus homogénéisé obtenu peut donner des résultats satisfaisants dans les techniques d'électrophorèse et d'immunoélectrophorèse. De plus, nous essaierons de voir si de profondes modifications des divers constituants du mucus sont intervenues par l'homogénéisation : c'est pourquoi nous effectuons un fractionnement en gel filtration sur colonne de Sepharose 6 B comparativement à ce que sont devenues les mucines neutres qui constituaient la première fraction de l'éluat chromatographique.

II.D.2.a. Etude en électro-immunodiffusion :

L'immunoélectrophorèse en double dimension de l'extrait réalisée avec un immunsérum de Lapin anti-sérum humain total montre que les protéides sont libérés de leurs interactions avec les mucines (Fig II.D.2.a) ; l'arc des IgA ne présente plus de traînées.

Les pics obtenus dans la technique des "rockets" sont bien délimités, que ce soit avec l'immunsérum anti-chaîne α,



(diagramme à comparer avec celui de la figure II.C.5. , p : 61 , dans lequel était observée la persistance des interactions mucines-protéides; pour une plage de sérumalbumine équivalente à celle que l'on obtenait p : 61 , la plage des IgA est ici bien plus importante . les IgA sont libérées par l'action de l'Ecteola-cellulose et peuvent migrer plus facilement dans le milieu gélifié.)

Figure II.D.2.a. : IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE DE L'EXTRAIT DE MUCUS HOMOGENEISE AVEC L'IMMUNSERUM DE LAPIN ANTI-SERUM HUMAIN TOTAL

BUS LILLE

ou l'immunsérum anti-sérumalbumine. Leur mesure peut donc permettre un dosage correct.

II.D.2.b . Fractionnement du mucus en gel-filtration :

Après une dialyse de quatre jours contre de l'eau désionisée, l'extrait de mucus homogénéisé est fractionné par gel-filtration sur colonne de Sepharose 6 B selon le protocole déjà décrit dans le paragraphe I.E. (p.22). Le diagramme d'élution obtenu n'indique pas de variations par rapport à ce que l'on observait pour un mucus non homogénéisé.

Nous avons plus particulièrement étudié la fraction 1 de l'éluat qui contient principalement des glycoprotéines de masse molaire élevée encore contaminées par des protéines comme en témoignent les électrophorèses en lame d'agarose (Fig. I.D.2.b. -α). Une étape de gel-filtration sur colonne de Sepharose 2 B (Fig. I.D.2.b. -β) est nécessaire pour éliminer d'une part les mucoprotéines contenues dans la première fraction et les protéines de masse molaire plus faible (fraction 3). Les tubes correspondant à la fraction 2 sont rassemblés. Après dialyse et lyophilisation, la poudre obtenue est étudiée en électrophorèse en lame d'agarose(γ).Cette fraction présente les critères de mobilité électrophorétique et d'affinité tinctoriale des mucines neutres éluées de l'Ecteola-cellulose en NaCl 0,1 M dans le protocole de préparation des mucines bronchiques de DEGAND (1972). La composition en acides aminés et en sucres de cette fraction a été déterminée (Tableau II.D.2.b). Les caractéristiques de la composition en acides aminés de mucines sont retrouvées : richesse en thréonine et en sérine (32,06 résidus pour 100), en glycocolle et en proline, peu d'acides aminés basiques. Comme pour les mucines neutres du mucus qui n'avaient pas été homogénéisées (paragraphe I.E.1., p.23)nous trouvons ici 1 à 2 résidus de demi-cystine pour 100 résidus d'acides aminés. La composition en sucres montre une richesse relative en fucose (13,4 p. 100 du poids sec), richesse en galactose (20,4 p. 100), peu de sulfate (1,9 p. 100). La perte des propriétés rhéologiques observée après homogénéisation ne semble donc pas due à une modification des mucines neutres.

II.D.3. Elution des constituants fixés sur l'Ecteola-cellulose :

Nous voulons vérifier si l'Ecteola-cellulose élimine également les mucines poly anioniques du mucus bronchique homogénéisé et si

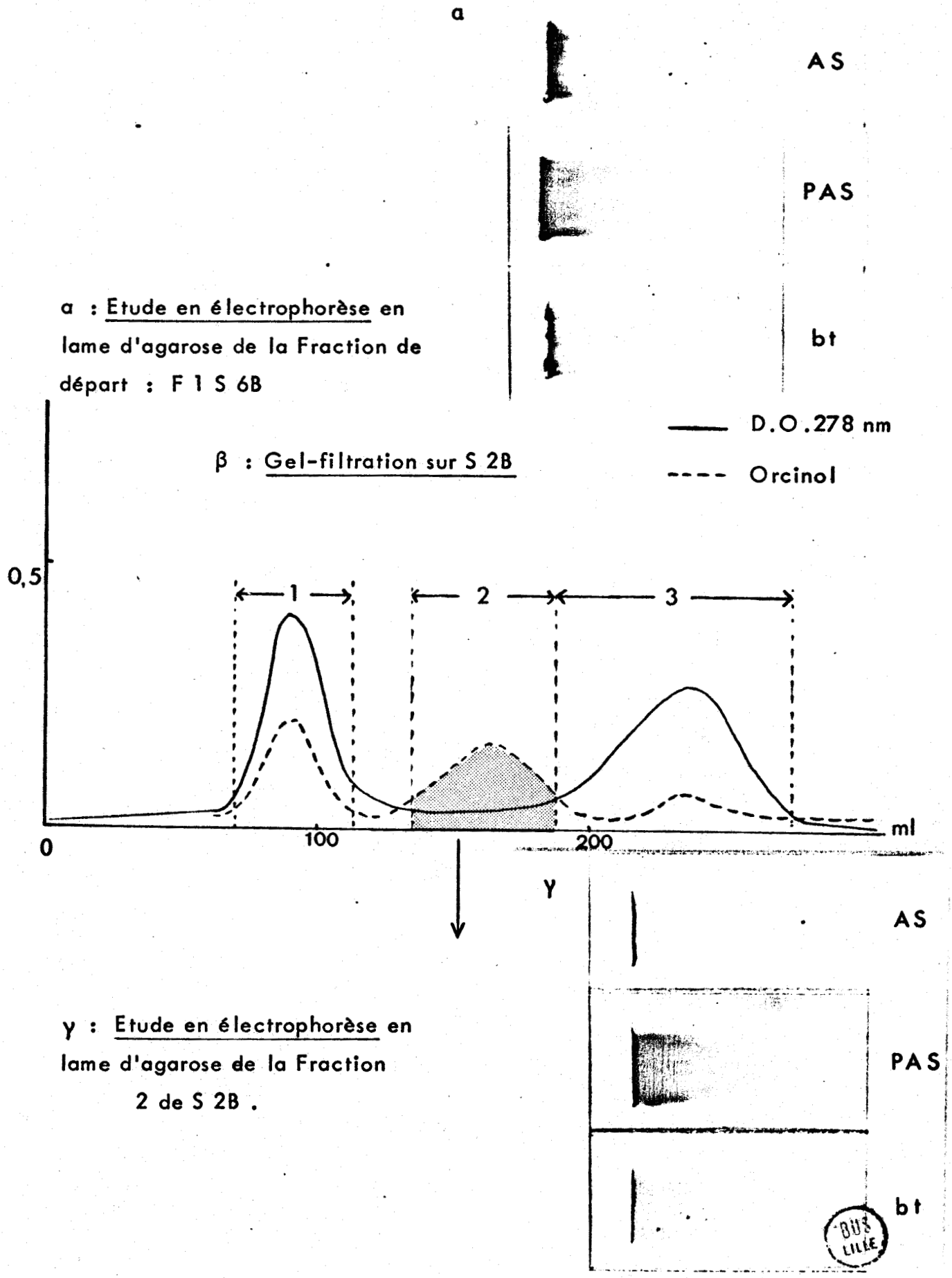


Figure II.D.2.b. : PURIFICATION DES MUCINES NEUTRES DU MUCUS HOMOGENEISE ET ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES FRACTIONS OBTENUES

Tableau II.D.2.b.

COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET COMPOSITION GLUCIDIQUE DE LA FRACTION 2 DE S 2B (voir Figure II.D.2.b.)

Mucine neutre d'un mucus homogénéisé

Composition en acides aminés *	
ASP	5,26
THR	19,96
SER	12,10
GLU	7,37
PRO	9,42
GLY	8,90
ALA	9,32
VAL	4,75
CYS/2	1,47
MET	/
ILE	2,97
LEU	5,68
TYR	2,09
PHE	2,35
LYS	2,89
HIS	2,14
ARG	3,33

Composition glucidique **	
Fucose	13,4
Acide N-acétyl-neuraminique	2,4
Galactose	20,4
N-acétyl-glucosamine	16,8
N-acétyl-galactosamine	7,8
Sulfate	1,9

Total sucres : 62,7 p.100 du poids sec

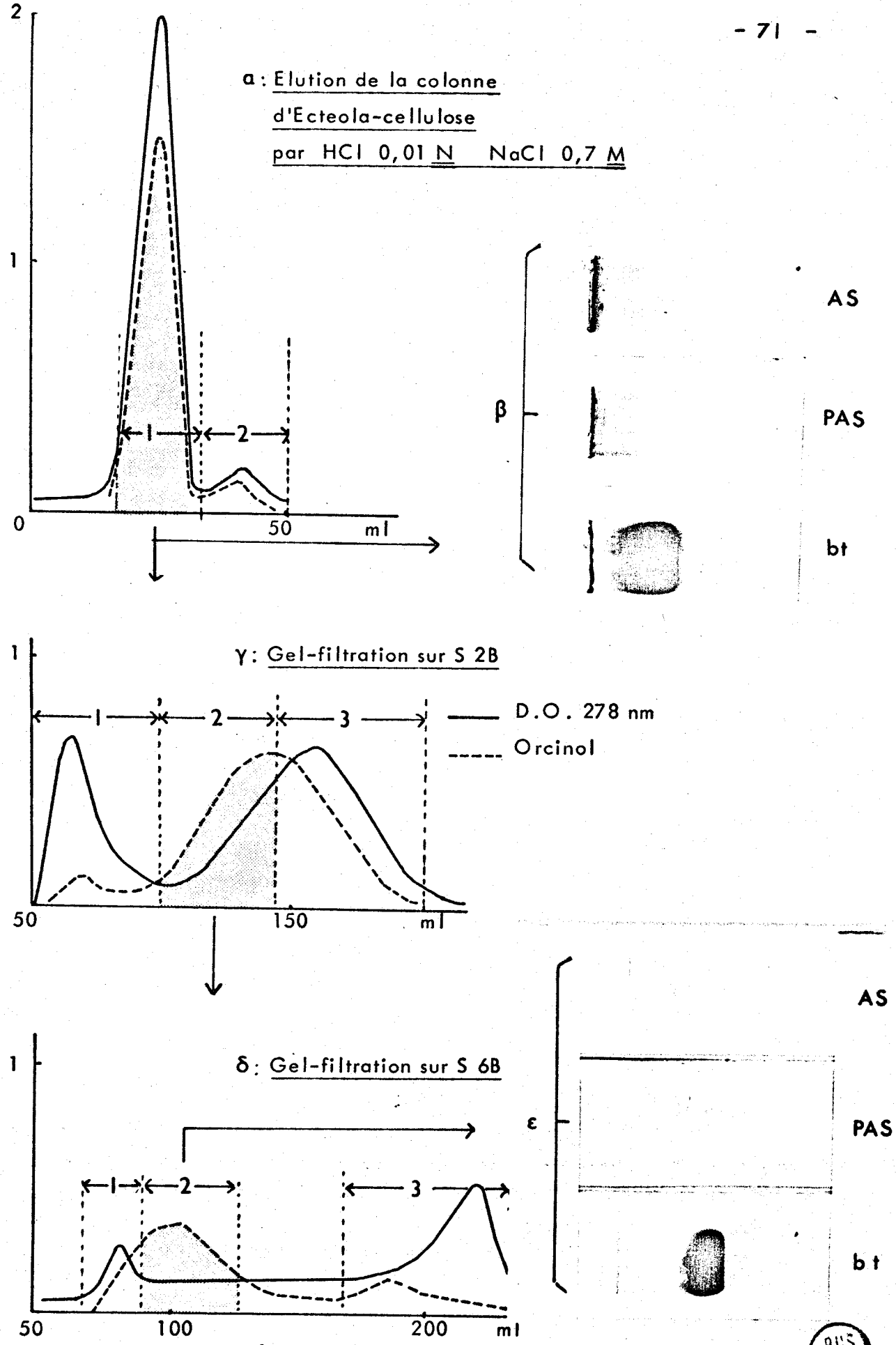
Total acides aminés : 12,88 p.100 du poids sec

* Résultats exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus

** Résultats exprimés en pourcentage de poids sec

BUS

l'homogénéisation a provoqué des modifications de ces constituants. Avec les quantités d'expectoration que nous pouvions nous procurer, nous n'avons pas eu la possibilité d'effectuer sur le mucus d'un même malade, à la fois l'étude des mucines neutres et celle des constituants restés fixés sur l'Ecteola-cellulose en tampon phosphate de sodium 0,01 M NaCl 0,3 M. 250 ml d'une autre mucus homogénéisé sont extraits par l'Ecteola-cellulose selon le protocole décrit puis après centrifugation, l'Ecteola-cellulose est de nouveau mélangéeavec du tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,3 M, de pH 5,0 et placée dans une colonne (4 x 30 cm) munie d'un verre fritté. Après lavage abondant par le même tampon et contrôle de la densité optique nulle à 278 nm de l'éffluent, le passage sur la colonne de la solution HCl 0,01 N, NaCl 0,7 M permet d'éluer les composants plus acides fixés sur l'Ecteola-cellulose (Fig. II.D.3.-α). Les tubes correspondant à la première fraction sont rassemblés. Après dialyse et lyophilisation, l'électrophorèse en lame d'agarose (Fig. II.D.3.-β) indique qu'il subsiste une contamination des glycoprotéines par des constituants protéiques. La purification est poursuivie par deux chromatographies de gel-filtration en Sepharose 2 B et Sepharose 6 B (Fig. II.D.3.- γ et δ). Après dialyse et lyophilisation, la poudre obtenue pour la fraction 2 de S 6B est étudiée en électrophorèse en lame d'agarose (Fig. II.D.3.- ε). On observe les carastéristiques de migration électrophorétique et d'affinité tinctoriale des mucines poly anioniques suivant la classification de DEGAND (1972). La composition en acides aminés et en sucres de cette fraction confirme ce résultat (Tableau II.D.3) ; en effet, les caractéristiques sont les suivantes : richesse en thréonine et sérine (39,79 résidus pour 100 résidus), richesse en glycocolle et en proline, peu d'acides aminés basiques et absence de demi-cystine. Dans la composition glucidique, on observe peu de fucose (8,4 p. 100 du poids sec) ; ce fait lié à la présence de sulfate (3,5 p. 100) permet d'assimiler cette fraction à une mucine polyanionique. Cependant, par rapport aux caractéristiques données par DEGAND (1972), la mucine que nous avons isolée représente vraisemblablement une forme dégradée de la mucine native. Le protocole d'homogénéisation est responsable, sans doute, de la perte de certains résidus périphériques de la molécule, en particulier de l'acide sialique. C'est l'un des phénomènes impliqués dans la diminution des propriétés rhéologiques du mucus homogénéisé(BAILLEUL, Communication personnelle).



PURIFICATION DES MUCINES ACIDES D'UN MUCUS HOMOGENEISE ET ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES FRACTIONS OBTENUES

Figure II.D.3

BUS LILLE

Tableau II.D.3.

COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET COMPOSITION GLUCIDIQUE DE LA FRACTION 2 DE S 6B (voir Figure II.D.3.)

Mucine polyanionique du mucus homogénéisé

Composition en acides aminés *	
ASP	3,82
THR	25,34
SER	14,45
GLU	5,80
PRO	8,35
GLY	7,22
ALA	10,70
VAL	4,94
CYS/2	/
MET	/
ILE	2,55
LEU	5,38
TYR	1,18
PHE	1,73
LYS	2,32
HIS	2,37
ARG	3,85

Composition glucidique **	
Fucose	8,4
Acide N-acétyl-neuraminique	2,2
Galactose	22,5
N-acétyl-glucosamine	21,6
N-acétyl-galactosamine	10,2
Sulfate	3,5

Total sucres : 68,38 p.100 du poids sec

Total acides aminés : 15,62 p.100 du poids sec

* Résultats exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus

** Résultats exprimés en pourcentage de poids sec

BUS LILLE

Nous pouvons souligner que dans la présente expérience nous avons pu effectuer toutes les étapes de purification nécessaires contrairement à l'expérience que nous n'avons pu mener à bien avec du mucus non homogénéisé (paragraphe I.B.3. p.5).

II.E. Dosages des IgA - globulines et de la sérumalbumine du mucus bronchique humain :

Pour effectuer ces dosages, l'homogénéisation est pratiquée sur 5 ml de mucus et l'étape de contact avec l'Ecteola-cellulose est effectuée sur 1 ml de mucus homogénéisé. Les dosages sont faits par la technique des "rockets" : 3 µl de chaque dilution de la gamme étalon sont déposés en commençant par la dilution la plus forte, puis 3 µl de chaque échantillon sont déposés à la suite (extraits E_1 et E_2 pour chaque mucus). Les résultats correspondent à la somme ($(E_1 \times 3) + E_2$) : E_1 en effet, est une dilution au 1/3 du mucus et E_2 est sans dilution par rapport au mucus. Nous avons vérifié en effectuant un troisième extrait, dans les mêmes conditions que E_2, que la récupération des IgA et de la sérumalbumine dans le tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,3 M de pH 5,0 était totale dans E_1 et E_2.

Avant d'exprimer les résultats, il nous faut déterminer les limites de notre méthode. La fiabilité de la technique de dosage par électroimmunodiffusion a déjà été établie précédemment (WEEKE, 1973),. Nous l'avons également retrouvée dans nos conditions opératoires.

Nous avons donc cherché à prouver que la reproductibilité des étapes d'homogénéisation et de chromatographie d'échange ionique était satisfaisante. Puisque tout dosage n'est possible qu'après action de l'Ecteola-cellulose, il est donc indispensable de déterminer tout d'abord la reproductibilité de l'étape d'échange ionique.

II.E.1. : Reproductibilité de l'extraction par l'Ecteola-cellulose :

Sur des échantillons de 5 ml de mucus homogénéisé, nous avons effectué deux prélèvements de 1 ml qui sont soumis à une extraction par l'Ecteola-cellulose. Les résultats des dosages ainsi effectués en double sur 22 mucus sont rapportés dans le Tableau II.E.1. La moyenne des erreurs relatives sur deux dosages d'un même mucus s'élève à 4,6p.100 pour les IgA.Pour

Tableau II.E.1.

REPRODUCTIBILITE DES DOSAGES DES IGA ET DE LA SERUMALBUMINE DANS LE MUCUS BRONCHIQUE

Mucus	pH **		IgA			Sérumalbumine		
	avant	après	Dosage 1 (mg/100 ml)	Dosage 2 (mg/100 ml)	Erreur relative en p.100	Dosage 1 (mg/100 ml)	Dosage 2 (mg/100 ml)	Erreur relative en p.100
1	5,9	3,8	183	188	2,6	105	109	3,6
2	8,9	5,7	94	94	0	45	60	28
3	6,0	3,4	195	186	4,6	17	16	6
4	8,6	4,6	156	174	10,8	ND *	ND *	
5	7,9	3,5	165	157	5,0	ND *	ND *	
6	7,0	4,1	42	42	0	10	11	9,4
7	6,1	4,0	65	73	11,6	26	25	3,8
8	7,0	4,3	29	29	0	14,5	15	3,4
9	6,8	5,6	50	50	0	40	38,5	3,8
10	6,4	4,6	123	120	2,4	22,5	23	2,2
11	7,7	5,0	177	163	8,2	32	36	11,8
12	7,7	4,4	141	136	3,6	24	24,5	2
13	7,2	6,1	190	193	1,6	19	18	3,4
14	6,1	5,3	236	223	5,6	11	16	37
15	7,6	5,3	110	104	5,6	14	16	13,2
16	6,2	3,6	163	151	7,6	21	26	21,2
17	6,1	3,0	239	213	11,4	48	69,5	36,5
18	8,6	6,2	42	42	0	25	21,5	15
19	8,4	6,4	22	22	0	25	25	0
20	8,6	3,6	78	78	0	16	16	0
21	8,9	4,2	74	65	15,8	12,5	12,5	0
22	8,1	4,2	194	206	6	34,5	35,5	2,8
					Moyenne 4,6			Moyenne 10,2

BUS LILLE

* ND : non dosé

** Le pH est mesuré avant et après homogénéisation

la sérumalbumine, cette moyenne des erreurs relatives est supérieure, et atteint 10,2 p. 100. Nous pouvons penser que cette erreur est admissible, étant données les difficultés inhérentes au milieu que nous étudions.

II.E.2. Reproductibilité de l'homogénéisation :

La bonne reproductibilité de l'extraction par l'Ecteola-cellulose étant prouvée, nous avons abordé la détermination de la reproductibilité de l'homogénéisation elle-même. Sur trois mucus, nous avons effectué en double un prélèvement de 5 ml (a et b) auquel nous avons fait subir séparément le même protocole d'homogénéisation. Le pH du milieu a été mesuré avant et après homogénéisation. Puis, sur 1 ml de chaque prélèvement, nous faisons agir l'Ecteola-cellulose, et dosons les IgA et la sérumalbumine. Les résultats rassemblés dans le Tableau II.E.2. indiquent que, pour les IgA, la reproductibilité est excellente tandis que pour la sérumalbumine, elle l'est moins. Cette discordance entre les deux types de protéines est assez difficilement explicable. Il n'est pas impossible de penser que l'abaissement du pH constaté après l'homogénéisation puisse être responsable, dans une certaine mesure, de cette différence, qui affecterait plus particulièrement la sérumalbumine dont le pI est voisin de 4,6.

II.E.3. Expériences de surcharge en protéine d'un mucus :

Il ne nous est pas possible de déterminer le rendement de notre méthode, c'est-à-dire le pourcentage d'IgA et de sérumalbumine extraites et dosées dans un mucus : en effet, le dosage est impossible sur un mucus natif. Nous avons donc réalisé des expériences de surcharge d'un mucus : nous ajoutons une quantité connue d'IgA ou de sérumalbumine à un mucus avant la mise en oeuvre de l'homogénéisation et nous comparons les résultats des dosages avec ceux obtenus pour le même mucus sans surcharge.

II.E.3.a . Essais avec les IgA :

A 5 ml de mucus, nous ajoutons 0,15 ml d'une solution d'IgA colostrales (5,74 mg/ml) ; un autre prélèvement de 5 ml du même mucus est additionné de 0,15 ml de sérum physiologique ; l'homogénéisation des deux échantillons est effectuée simultanément. Puis 1 ml de chaque échantillon est soumis à l'action de l'Ecteola-cellulose. Les résultats obtenus (Tableau II.E.3a)

Tableau II.E.2

REPRODUCTIBILITE DE L'HOMOGENEISATION DU MUCUS

	pH *		IgA	Sérumalbumine
	avant	après	mg/100 ml	mg/100 ml
Mucus n° 1				
a	5,8	3,8	185,5	107
b	5,8	3,4	187	70,4
Mucus n°2				
a	8,9	5,7	94	52,5
b	8,9	4,0	99	25,5
Mucus n°3				
a	6,0	3,4	199,5	16,4
b	6,0	3,5	187,5	14,6

* Le pH du mucus est mesuré avant et après homogénéisation.

BUS LILLE

Tableau II.E.3.a

SURCHARGE D'UN MUCUS PAR DES IGA COLOSTRALES. TAUX DE RECUPERATION DE CES IGA.

(Extraction et dosage effectués en double)

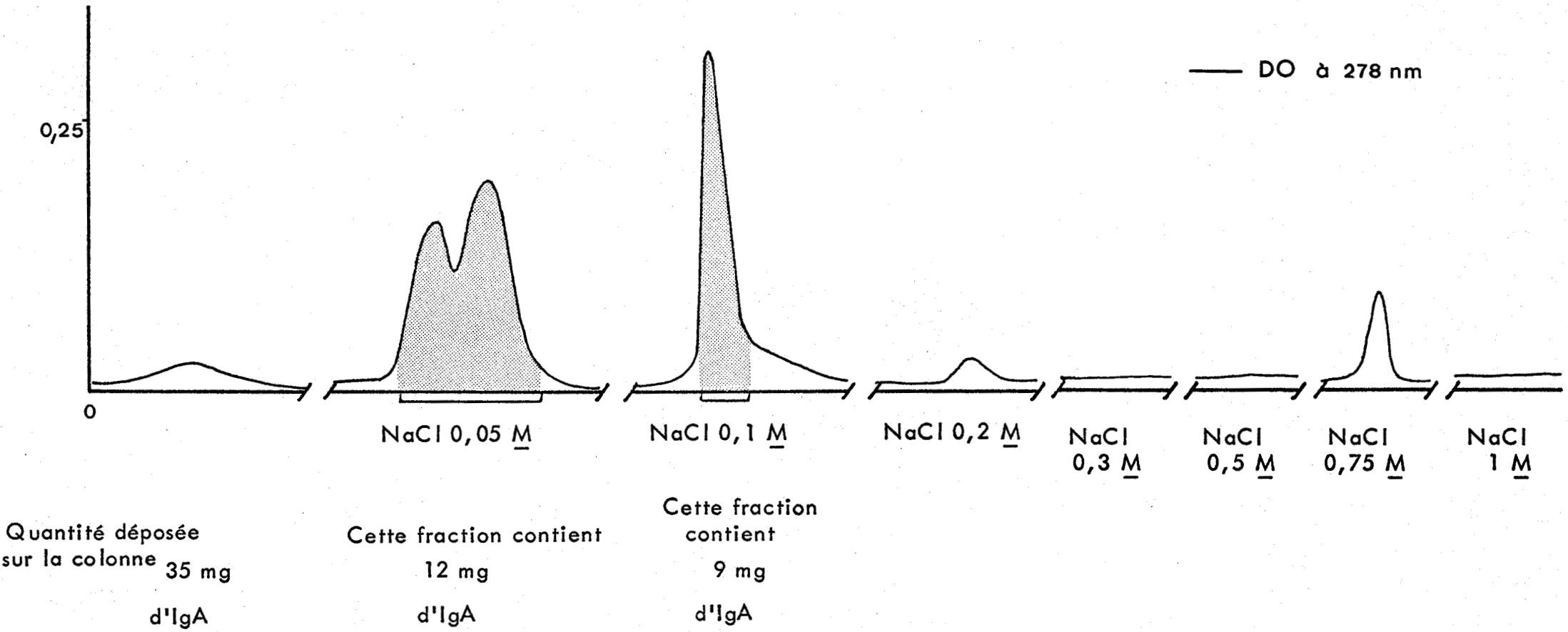
	Dosage 1 *	Dosage 2 *	Moyenne	Récupération
Mucus sans surcharge	34	38	36	
Mucus avec surcharge de 17 mg d'IgA colostrales pour 100 ml de mucus	45	46	45,5	55 p. 100

* Les résultats sont exprimés en mg/ 100 ml d'expectoration.

BUS LIEGE

montrent que 55 p. 100 des IgA colostrales ajoutées sont récupérées. Or nous savons qu'elles ne sont pas modifiées par l'homogénéisation (paragraphe II.B.2.e. 2) p :55) Pour essayer d'expliquer ce résultat, nous avons , tout d'abord, cherché à déterminer le comportement d'une solution d'IgA colostrales soumise à l'homogénéisation et traitée par l'Ecteola-cellulose. Or, après dosage, nous constatons que 58 p.100 seulement des IgA sont récupérées.

Pour expliquer ce comportement des IgA , nous devons tenir compte du polymorphisme des IgA sécrétoires qui est bien démontré , notamment par la chromatographie d'échange ionique : en effet, toute chromatographie d'échange ionique, même réalisée avec une fraction homogène au point de vue masse molaire , entraîne un " sous-fractionnement " des IgA sécrétoires (HAVEZ et coll., 1967-a ; DESCAMPS, 1974 ; BRANDTZAEG, 1971) ; ce dernier auteur a soumis une solution d'IgA colostrales à une chromatographie d'échange ionique sur DEAE-cellulose en tampon phosphate de sodium 0,01 M de pH 7,5 avec un gradient discontinu de molarité en NaCl (0 à 1 M). Les IgA colostrales sont éluées en quatre fractions principales correspondant respectivement aux tampons de molarité 0,04 M ; 0,1 M ; 0,2 M ; 0,4 M en NaCl. Avec une solution d'IgA colostrales également , nous avons repris ce genre de protocole dans les conditions de chromatographie d'échange ionique que nous utilisons pour l'extraction des protéides du mucus bronchique : Ecteola-cellulose en tampon phosphate de sodium 0,01 M de pH 5,0; nous employons un gradient de molarité en NaCl de 0 à 1 M . Dans ces conditions les IgA sont éluées en trois fractions principales (Figure II.E.3.a.) , à des molarités de 0,05 M ; 0,1 M et 0,75 M en NaCl. Or nous avons observé, lorsque nous travaillons avec du mucus (paragraphe II.D.1.a) que pour une molarité en NaCl égale ou supérieure à 0,2 M , les mucines plus acides que les fucomucines commencent à être éluées de l'échangeur d'ions. Nous avons donc cherché quelle quantité d'IgA colostrales nous récupérons dans les deux premières fractions seulement (0,05 M et 0,1 M en NaCl) . Le dosage immunologique indique que l'ensemble de ces deux fractions représente 60 p. 100 des IgA colostrales déposées au sommet de la colonne d'Ecteola-cellulose. Cette valeur de 60 p. 100 est à rapprocher des 55 p . 100 de récupération des IgA colostrales dans l'expérience de surcharge d'un mucus et des 58 p. 100 d'IgA colostrales récupérées lorsqu'une solution d'IgA colostrales est soumise à l'homogénéisation et traitée par l' Ecteola-cellulose . Dans les conditions d'échange ionique



Tampon phosphate de sodium 0,01 M de pH 5,0 . Gradient discontinu en NaCl .

Figure II.E.3.a : CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE IONIQUE DES IGA COLOSTRALES SUR COLONNE D'ECTEOLA-CELLULOSE .

BUS LILLE

que nous utilisons (molarité assez faible en NaCl) , 60 p. 100 seulement des IgA colostrales peuvent être récupérées.

II.E.3.b. Essais avec la sérumalbumine

La surcharge a été faite sur deux mucus. A 5 ml de mucus on ajoute 0,2 ml d'une solution de sérumalbumine humaine (Behring) à 5 mg/ml ; un autre prélèvement de 5 ml du même mucus est additionné de 0,2 ml de sérum physiologique. Après homogénéisation, 1 ml de chaque échantillon est traité en "batch-adsorption" avec l'Ecteola-cellulose. Les résultats des dosages (Tableau II.E.3.b.) montrent que la récupération de la sérumalbumine ajoutée est très différente dans les deux cas. Toutefois, 90 p. 100 d'une solution de sérumalbumine sont récupérés et dosés après la mise en œuvre de l'homogénéisation sur une solution de sérumalbumine et traitement par l'Ecteola-cellulose. Une adsorption partielle sur l'échangeur d'ions ne peut donc expliquer la récupération faible de la sérumalbumine dans un des deux cas de surcharge. Nous n'avons pas, actuellement, d'explications à présenter pour la dispersion de ces deux résultats. D'autres expériences pourront peut-être expliquer ce phénomène.

II.E.4. Valeurs obtenues pour les dosages des IgA-globulines et de la sérumalbumine.

Les dosages ont été effectués sur 50 mucus de malades atteints de bronchite chronique à des stades différents d'évolution. de leur bronchite ; certains malades ont déjà présenté plusieurs épisodes infectieux.

Pour les IgA les valeurs obtenues s'échelonnent de 22 à 340 mg/ 100 ml d'expectoration. Pour la sérumalbumine des valeurs s'échelonnant de 10 à 110 mg/ 100 ml ont été trouvées.
La dispersion de ces résultats n'est pas due à la méthodologie , elle reflète l'activité de synthèse (IgA) et l'importance de la transsudation (sérumalbumine) qui sont variables d'un sujet à l'autre.

Nous ne pouvons pas établir de valeur moyenne pour l'un ou l'autre de ces constituants, cela ne présente en effet aucun intérêt , à notre avis: Il est alors impossible de tenir compte de l'état de la bronche du malade ou de son degré de surinfection au moment du recueil du mucus.

Tableau II.E.3.b.

SURCHARGE DES MUCUS PAR DE LA SERUMALBUMINE HUMAINE

TAUX DE RECUPERATION.

	Dosage (en mg/100ml)	Récupération de la sérumalbumine ajoutée (en p.100)
Mucus 1		
Sans surcharge	35	40 p. 100
Avec surcharge de 10 mg pour 100 ml de mucus	39	
Mucus 2		
Sans surcharge	18	90 p. 100
Avec surcharge de 10 mg pour 100 ml de mucus	27	

BUS LILLE

Tableau II.E.4.'

VALEURS DES DOSAGES DES IGA DU MUCUS ENDOBRONCHIQUE OBTENU CHEZ UN MALADE TRACHEOTOMISE

(le même jour et à des heures différentes)

Heure de prèlèvement	IgA (en mg/ 100 ml)
0 h.	175
4 h.	240
8 h.	210

Tableau II.E.4."

COMPARAISON DES DOSAGES DES IGA ET DE LA SERUMALBUMINE DANS DES EXPECTORATIONS RECUEILLIES A DES HEURES DIFFERENTES DE JOURS DIFFERENTS AUPRES DE QUATRE MALADES

Malades		6 h 30 - 8 h			9 h 50 - 11 h		
		IgA *	Alb *	IgA/Alb	IgA *	Alb *	IgA/Alb
n° 1	Jour 1	220	20	11	115	13	8,8
	Jour 2	125	15	8,3	135	17	7,9
n° 2	Jour 1	180	26	6,9	170	40	4,2
	Jour 2	130	37	3,5	180	33	5,5
n° 3	Jour 1	55	16	3,4	40	6	6,6
	Jour 2	50	12	4,1	55	9	6,1
	Jour 3	35	13	2,7	50	8	6,3
n° 4	Jour 1	235	100	2,4	220	35	6,2
	Jour 2	230	45	5,1	80	10	8

BUS LILLE

* Résultats exprimés en mg/ 100 ml.

En outre, pour que des valeurs de dosages aient une certaine signification, il serait indispensable que le recueil des sécrétions soit effectué dans des conditions très précises. En effet, nous avons pu mettre en évidence des variations du taux d'IgA dans la sécrétion bronchique au cours de la journée : chez un sujet trachéotomisé, sous aspiration continue, des prélèvements toutes les quatre heures ont fait l'objet de dosages en IgA -globulines ; ils montrent que la synthèse des IgA varie de façon significative au cours de la journée, (Tableau II.E.4.') . Sur des expectorations recueillies au près d'une série de malades, le même jour à des heures différentes (6 h 30 - 8 h et 9 h 30 - 11h) des variations importantes du taux d'IgA et de sérumalbumine sont observées suivant l'heure du recueil chez le même malade (Tableau II.E.4."). De plus, les sécrétions bronchiques doivent être recueillies pendant un court laps de temps pour éviter l'action des enzymes bactériens. Les sécrétions de la toilette bronchique doivent être éliminées, car elles ne sont émises qu'après un séjour variable dans l'arbre trachéobronchique. Lors de notre expérimentation, les expectorations émises entre 8 h 30 et 9 h sont recueillies. Dans l'expectoration, il existe toujours une contamination salivaire difficile à mesurer qui provoque une dilution du mucus, car la concentration protéique de la salive est faible : en particulier en IgA - (2 à 9 mg/ 100 ml) et en sérumalbumine. Toutefois, en exprimant les résultats des dosages sous forme d'un rapport, taux d'IgA / taux de sérumalbumine, on est moins gêné par l'effet de dilution dû à la salive.

Les valeurs de ce rapport peuvent s'échelonner entre 0,5 et 90 environ. Si le rapport est élevé (supérieur ou voisin de 10), la muqueuse est capable de synthétiser des IgA 11 S en grosse quantité, tout en limitant les pertes protéiques par transsudation. Lorsque l'on trouve un rapport bas (inférieur ou voisin de 3), la muqueuse bronchique ne synthétise pas beaucoup d'IgA tandis que les phénomènes de transsudation sont très importants. Ceci peut être rapproché des observations que nous avons faites lors de l'application de la technique de double dimension à l'étude de quelques sécrétions particulières (paragraphe I.G. ; p.39). Les diagrammes obtenus montraient l'amplitude des variations de la plage des IgA et de la plage de la sérumalbumine selon les cas étudiés (sécrétion du fumeur, du bronchitique bronchique, d'un malade atteint de cancer bronchiolo-alvéolaire.)

II.F. Etude critique des dosages

II.F.1. Comparaison de nos résultats avec les travaux d'autres auteurs

Il est difficile de comparer les valeurs des dosages que nous avons effectués avec les valeurs données par d'autres auteurs, pour des raisons méthodologiques d'abord, à cause du mode d'expression des résultats, ensuite. Nous avons fait figurer dans le Tableau II.F.1. les différents paramètres pour lesquels des différences sont rencontrées d'un auteur à l'autre.

II.F.1.a. Méthodologie

Les techniques de dosage utilisées par les différents auteurs, bien que toutes immunologiques, n'ont pas la même précision ni la même fiabilité. NEWCOMB et coll. (1969), TURGEON et coll. (1969) utilisent l'immunodiffusion radiale de MANCINI (1965). RYLEY et coll. (1973) dosent neuf protéines sériques dans 30 échantillons d'expectoration, à l'aide de la technique de double dimension: ils établissent les courbes étalons en utilisant une série de dilutions d'un sérum standard. Pour notre part, bien que nous trouvions que la technique de double dimension soit très précise, nous pensons qu'il est toutefois délicat de l'utiliser à des fins quantitatives surtout lorsqu'elle est appliquée à un milieu visqueux comme le mucus.

Concernant le protocole d'homogénéisation lui-même, nous avons déjà (paragraphe II.B.2., p : 52) fait le bilan des méthodes proposées par d'autres auteurs. La technique d'ultracentrifugation préconisée par RYLEY et coll. (1968) semble, d'après les nombreux travaux de cette équipe, satisfaisante pour résoudre les problèmes d'hétérogénéité et de viscosité du milieu. Néanmoins, d'après la description du protocole, il semble que le problème des interactions mucines-protéines y soit négligé. Nous avons essayé de déterminer si cela avait une grande incidence sur les résultats des dosages qui peuvent être effectués après la mise en œuvre de ce protocole. A l'aide de la technique de dosage immunologique la plus fiable, l'électroimmunodiffusion, nous avons effectué sur quatre mucus l'étude comparative de la phase soluble obtenue selon le protocole de RYLEY et coll. et de l'extrait de mucus homogénéisé. Après ultracentrifugation à 118 000 g pendant 4 heures, le mucus est séparé en une phase soluble limpide, légèrement visqueuse, qui représente à peu près les 7/8 du volume et un culot très compact. Après les dosages des IgA et de la sérumalbumine, seules peuvent être comparées les valeurs du rapport IgA/sérumalbumine, puisque notre méthode amène une dilution de l'échantillon qui n'intervient pas dans le protocole de RYLEY et coll. Les résultats sont indiqués dans le tableau II.F.1.a. . Les différences observées montrent que l'ultracentrifugation, dans les quatre

Tableau II.F.1.a

COMPARAISON DU RAPPORT IGA / SERUMALBUMINE OBTENU POUR LES EXTRAITS DE MUCUS HOMOGENEISES ET POUR LES SOLUTIONS RECUEILLIES APRES ULTRACENTRIFUGATION DES MUCUS (Protocole de RYLEY et coll. 1968)

Mucus	IgA / Sérumalbumine	
	Extrait de mucus homogénéisé	Mucus ultracentrifugé
1	6,6	1,9
2	4,2	2,9
3	8	4,8
4	5,7	4,5

BUS LILLE

RYLEY et coll. (1973)	expectoration de 24 h.	ultra-centrifugation 4 h. à 118000 g	double dimension	IgA 7 S		mg/100ml	valeur moyenne : 80,0 ± 41,8
SALVAGGIO et coll. (1973)	expectoration matinale	US (80 Watts par sec) 10 sec. centrifugation dialyse lyophilisation	EID	IgA 11 S		µg/ml	valeur moyenne : 94,7 ± 38,7 de 17 à 204 ug/ml
DEUSCHL et coll. (1973)	sécrétion endo-bronchique diluée	pas de traitement	IDR	IgA 7 S		mg/100ml	1,1 à 7,4 IgA/Alb moyenne 0,29 IgG/Alb moyenne 1,06
GUMP et coll. (1973)	expectoration recueillie pendant 30 minutes	incubation 20 mn à 56°C centrifugation dialyse lyophilisation	IDR	IgA 7S		mg/100mg de protéines	6,0 ± 2,3

IDR : Immunodiffusion radiale

EID : Electro-immunodiffusion

BUS LILLE

cas examinés, provoque une perte des IgA par rapport à la sérumalbumine et ce, suivant une proportion variable d'un mucus à l'autre. L'interprétation de cette observation peut être la suivante : les IgA seraient plus fortement liées que la sérumalbumine aux mucines qui sédimentent lors de la centrifugation à très grande vitesse. Cette technique de "liquéfaction" du mucus ne résoud pas le problème des interactions mucines-protéides et ne constitue donc pas une première étape intéressante si l'on veut effectuer des dosages.

II.F.1.b. Expression des résultats et signification :

En plus des différences d'ordre méthodologiques rencontrées lors de la comparaison de nos résultats avec ceux d'autres auteurs, les unités employées pour l'expression des résultats varient notablement. Ceci est important pour les résultats du dosage des IgA-globulines. Le choix comme solution étalon d'une préparation d'IgA sécrétoires 11 S est rare.

En outre, de nombreux auteurs donnent une valeur moyenne des taux d'IgA, ce qui ne présente aucun intérêt . Par ailleurs, nous avons insisté sur la nécessité de précautions lors du recueil de l'expectoration. Or, dans les travaux effectués, peu d'auteurs standardisent les conditions de recueil des échantillons (Tableau II.F.1.). Or un travail comparatif ne peut être effectué que sur des sécrétions recueillies à un moment fixe de la journée pendant un court laps de temps.

Une valeur de dosage d'IgA ou de sérumalbumine ne peut avoir selon nous, une signification que si les conditions de prélèvement ou de recueil de la sécrétion sont indiquées, ainsi que la méthode utilisée pour préparer l'échantillon qui sert au dosage, la technique de dosage, l'étalon employé pour la gamme, et la reproductibilité de l'ensemble des techniques Dans ces conditions, les valeurs des dosages peuvent alors avoir une certaine signification et permettre de suivre l'évolution d'un malade ou l'action d'une thérapeutique.

II.F.2. Critiques de notre méthode :

Nous travaillons sur l'expectoration et nous sommes donc génée par la contamination salivaire. L'expression des résultats sous forme du rapport taux d'IgA/taux de sérumalbumine permet de minimiser ce problème. Certes, pour éviter la contamination salivaire, il faudrait recueillir la sécrétion endobronchique par broncho-aspiration, mais ceci n'est pas possible

dans le cadre d'un dosage de routine. En outre, dans ce cas, on peut être gêné par un phénomène d'hypersécrétion réactionnelle qui fausserait les dosages. De plus, bien souvent, les prélèvements endobronchiques sont contaminés par du sang et ne sont pas utilisables.

Notre méthode présente aussi d'autres imperfections : l'étape d'échange ionique que nous sommes obligée d'effectuer pour obtenir un extrait de mucus où les interactions mucines-protéides sont détruites ne permet pas une récupération totale des IgA. Ainsi le fait que 40 p. 100 des IgA colostrales restent adsorbées sur l'Ecteola-cellulose après le passage du tampon phosphate de sodium 0,01 M - NaCl 0,3 M, sans que l'on réussisse à les éluer avec des tampons de molarité croissante en NaCl, permet de se poser la question du pourcentage de récupération des IgA du mucus bronchiqu e. Néanmoins nous pouvons considérer que, si nous ne récupérons pas toutes les IgA, nous en éluons une proportion constante., car nous observons une bonne reproductibilité dans les dosages d'IgA.

En ce qui concerne la sérumalbumine nous n'avons pas rencontré de problème d'adsorption sur l'échangeur d'ions. Toutefois, la reproductibilité des dosages effectués est beaucoup moins bonne que pour les IgA sans que l'on puisse encore en donner une explication satisfaisante.

II.F.3. Choix d'autres paramètres :

Au début de cette étude nous avions choisi la sérumalbumine comme témoin de la transsudation plasmatique et les IgA comme témoins de la synthèse active glandulaire. Après les résultats obtenus et les difficultés rencontrées, nous pouvons nous demander si le choix d'autres paramètres aurait été meilleur.

II.F.3.a. Paramètres sériques :

La sérumalbumine a été choisie parce qu'elle est le constituant sérique présent en plus grande quantité dans le mucus bronchique.

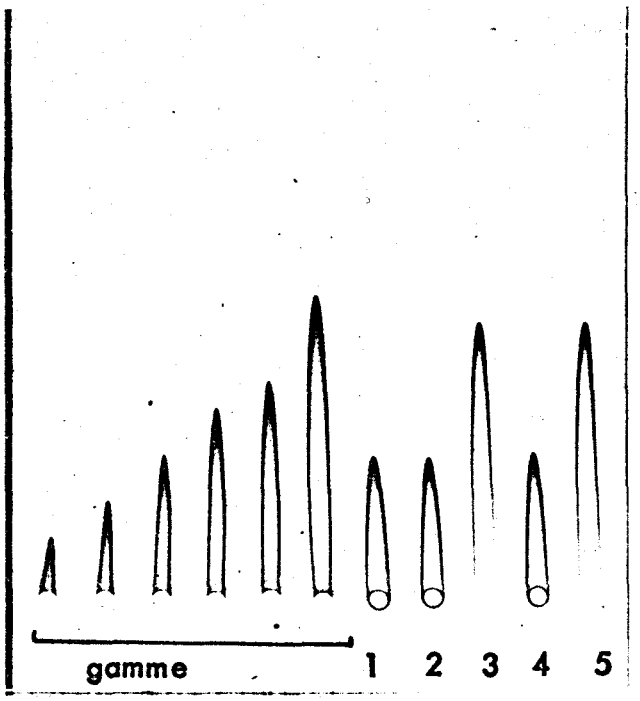
Nous avons tenté une estimation quantitative de l'α_1-antitrypsine, mais les concentrations trouvées sont très faibles (de

l'ordre de 1 à 5 mg /100 ml d'expectoration). Des essais de dosage de l'α_1-glycoprotéine acide n'ont pu être satisfaisants : la précipitation obtenue dans la technique des "rockets" ne fournit pas un pic net bien mesurable.

Des essais de dosage de la transferrine sérique sont en cours, mais nous ne pouvons pas encore déterminer si ce paramètre pourra être retenu. Il faudrait notamment contrôler l'action de l'homogénéisation et de l'extraction par l'Ecteola-cellulose sur une solution de transferrine sérique purifiée.

II.F.3.b. Paramètres sécrétoires :

En ce qui concerne l'activité spécifique de synthèse de la muqueuse bronchique, un autre paramètre pourrait être envisagé, à savoir le dosage de la bronchotransferrine. Mais, plusieurs difficultés ont été rencontrées au cours de la mise au point de ce dosage. Comme pour les IgA et la sérumalbumine, nous avons voulu contrôler le devenir d'une solution riche en lactotransferrine humaine (qui constituerait la gamme étalon lors du dosage de la bronchotransferrine), après action des ultra-sons et de la résine AG 50 W x 2. La préparation enrichie en lactotransferrine que nous avons utilisée est la même que celle qui a été utilisée dans les expériences du paragraphe I.F.5 (p. 36): 5 mg de cette préparation sont dissous dans 10 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 7,0. 0,1 ml de cette solution constitue le témoin "lactotransferrine native". sur le volume restant, le protocole d'homogénéisation est appliqué. 0,1 ml sont prélevés après l'action des ultra-sons. Le dosage de ces différentes solutions par rapport à une gamme constituée par des dilutions croissantes d'une solution aqueuse de lactotransferrine montre , qu'après homogénéisation, on observe une augmentation très forte de la hauteur du pic de précipitation (Fig. II.F3.b.). Les calculs indiquent que la hauteur du pic (3) correspond à une concentration 3,5 fois plus élevée que la concentration de la solution de départ (pic 1). En immunodiffusion radiale, nous observons également une très forte augmentation du diamètre de l'anneau de diffusion. Nous avons pu démontrer que ce phénomène était dû à l'action de la résine AG 50 W x 2 (pic 5 de la Fig. II.F3.b.). Il nous faut signaler que nous avons obtenu des résultats analogues avec la lactotransferrine pure qui nous a été aimablement fournie par Mademoiselle le Professeur SPIK.



1 solution de lactotransferrine "native".

2 solution de lactotransferrine après action des ultra-sons.

3 solution de lactotransferrine après action des ultra-sons et de la résine AG50 Wx2.

4 solution de lactotransferrine "native".

5 solution de lactotransferrine après action de la résine AG50 Wx2.

(Immunsérum de Lapin anti-lactotransferrine humaine (Sébia)).

Figure II.F.3.b. ETUDE DE L'ACTION DE L'HOMOGENEISATION SUR UNE SOLUTION DE LACTOTRANSFERRINE HUMAINE .

BUS

Les résultats observés en électro-immunodiffusion et en immunodiffusion radiale nous ont amenée à rechercher une éventuelle différence de masse molaire entre la lactotransferrine native et la lactotransferrine "homogénéisée" . Des électrophorèses effectuées en gel de polyacrylamide à 10 p. 100 en milieu SDS (technique de LAEMMLI , 1970) ne mettent en évidence aucune différence de masse molaire.

Nous avons également appliqué la technique présentée au paragraphe I.F.5. (p : 36) qui associe une première dimension en électrophorèse sur plaque de "Gradipore" * à une deuxième dimension classique de la technique d'immuno-électrophorèse bidimensionnelle. Nous avons comparé , avec cette technique, la solution de lactotransferrine native et la solution de lactotransferrine soumise à l'action de la résine cationique. Après coloration des plaques, aucune différence n'est mise en évidence : les deux solutions ont migré de manière identique dans le gradient de polyacrylamide. A la suite de ces deux expérimentations, nous pouvons donc conclure qu'il n'y a pas de différence importante de masse molaire entre la lactotransferrine native et la lactotransferrine " homogénéisée ".

Nous pouvons avancer une autre hypothèse : la résine cationique AG 50 Wx2 détacherait un peptide ou un glycopeptide basique de la molécule de lactotransferrine; ceci provoquerait un réarrangement de la molécule qui diffuserait plus facilement dans un milieu gélifié. Le réarrangement de la molécule pourrait, ou bien, avoir pour conséquence le démasquage d'un ou plusieurs sites antigéniques " cachés " dans la molécule de lactotransferrine native : il serait alors possible d'expliquer l'obtention d'un pic de précipitation bien plus élevé en électro-immunodiffusion et d'un anneau de précipitation bien supérieur en immunodiffusion radiale . Il ne s'agit là que d'une hypothèse, qui est cependant étayée par l'observation de la différence de migration électrophorétique en plaque d'acrylamide-agarose (Indubiose **) témoignant de la différence de charge de ces constituants : la lactotransferrine soumise au protocole d'homogénéisation possède une mobilité électrophorétique, à pH 8,6, plus grande que celle de la lactotransferrine native.

Les difficultés rencontrées lors de nos essais sur la lactotransferrine empêchent , tant que nous n'avons pas d'explication précise des phénomènes observés, la mise au point du dosage de la bronchotransferrine :
les dosages de ce constituant ne peuvent , en effet , être effectués actuellement que par

---

* Labo-moderne

** Industrie Biologique Française.

rapport à une gamme étalon de la lactotransferrine puisque la bronchotransferrine n'a pas encore été préparée à l'état pur. De plus, les particularités observées pour la lactotransferrine après l'action de la résine cationique sont également rencontrées pour la bronchotransferrine qui présente en plaque d'acrylamide agarose, les mêmes caractéristiques électrophorétiques que la lactotransferrine "homogénéisée".

II . F.3.c. Bilan :

D'après nos résultats, les IgA-globulines du mucus apparaissent actuellement comme les seuls témoins de l'activité de synthèse glandulaire qui puissent être dosés valablement par les méthodes dont nous disposons. La transferrine sérique, pourrait, sans doute, être substituée à la sérumalbumine, qui reste néanmoins un paramètre témoin intéressant de la transsudation. Malgré leurs imperfections, les méthodes d'homogénéisation et de dosage que nous avons mises au point peuvent être appliquées à la sécrétion bronchique pour suivre chez un même malade, l'évolution du taux d'IgA et de la sérumalbumine au cours d'épisodes infectieux ou d'interventions thérapeutiques.

II. G. Premières corrélations entre études rhéologiques et biochimiques et fonction d'épuration de la sécrétion bronchique :

II. G. 1. Relations des protéides et mucines bronchiques avec les propriétés rhéologiques :

Dès 1973, (DEGAND et coll. ; HAVEZ et coll. ; PUCHELLE et coll.), ces relations ont été étudiées pour 21 mucus de bronchiteux chroniques. Les premiers résultats permettaient de mettre en évidence le rôle prédominant des IgA de la sécrétion sur les caractères visco-élastiques de l'expectoration. Une relation significative est observée entre la sérumalbumine et la viscosité.

Parmi les différents types de mucines identifiés, seules les sialomucines, de caractère poly anionique type carboxylique, sont très fortement corrélées avec les variables rhéologiques reflétant la viscosité et l'élasticité des expectorations. Les sulfomucines et les fucomucines ne semblent

pas intervenir de façon significative sur les propriétés visco-élastiques de ces sécrétions.

II. G.2. Etude rhéologique et biochimique de la sécrétion bronchique ; lien avec l'état infectieux bronchique et la fonction respiratoire :

Après la première confrontation, une analyse des expectorations sur le plan cytologique, rhéologique et biochimique est réalisée (PUCHELLE et coll., 1974) afin de connaître les mécanismes susceptibles d'expliquer les variations des profils rhéologiques des sécrétions, en liaison avec l'état local d'infection bronchique. Les 18 bronchitiques chroniques retenus ont été classés en deux groupes :

1°) 7 bronchitiques chroniques non surinfectés

2°) 11 bronchitiques chroniques surinfectés

Dans le premier groupe, le taux d'IgA est généralement élevé ($\geqslant$ 170 mg/100 ml), pour la sérumalbumine des valeurs faibles ($\leqslant$ 15 mg/100 ml) sont observées. Le rapport IgA/sérumalbumine est donc élevé ($\geqslant$9).

Dans le deuxième groupe, le taux d'IgA est plus faible($\leqslant$150 mg/100 ml) alors que le taux de sérumalbumine est plus élevé ($\geqslant$25 mg/100 ml). Le rapport IgA/sérumalbumine est ici plus faible ($\leqslant$3).

Les variations dissociées du taux d'IgA et de la sérumalbumine pourraient alors expliquer, dans une large mesure, les modifications du profil rhéologique observées au cours de l'infection bronchique. L'état d'infection bronchique s'accompagne d'un accroissement de la viscosité des sécrétions lié à la transsudation de constituants sériques, telle que la sérumalbumine, et d'une diminution de l'élasticité, en relation avec une synthèse moins active des IgA. Cette étude mettrait en évidence un lien entre élasticité et taux d'IgA, viscosité et taux de sérumalbumine.

Ces observations ont été complétées par les données relatives à la morphologie bronchique dans le but de préciser dans quelle mesure les analyses effectuées reflètent un état pathologique de la bronche.

Tableau II.G.2.

ESSAIS DE CORRELATION ENTRE : TAUX D' IgA ET TAUX DE SERUMALBUMINE , VALEUR DU RAPPORT IgA / Sérumalbumine ET NOMBRE D'EPISODES DE SURINFECTION POUR CINQ MALADES .

Malade	IgA (mg/100ml)	Sérumalbumine (mg/100ml)	IgA / Sérumalbumine	Nombre d'épisodes de surinfection pendant les 3 dernières années.
1	435	5	87	0
2	173	4	43	2
3	103	138	0,74	5
4	88	10	8,8	6
5	69	25	2,7	13

BUS LILLE

Dans le premier groupe, la plupart des malades présentent des images bronchographiques sub-normales. Dans le second groupe, hormis un malade, on note que tous présentent des remaniements et des déformations bronchiques marquées. Donc, dans l'ensemble, le degré de gravité des déformations et décalibrations bronchiques semble aller de pair avec une diminution du taux d'IgA et , surtout, avec un abaissement du rapport taux d'IgA / taux de sérumalbumine.

Plus récemment, (PUCHELLE et coll., 1975), chez cinq malades dont l'état clinique a été régulièrement suivi au cours d'une période de trois ans précédant le bilan, le nombre d'épisodes de surinfection a été confronté aux taux d'IgA et de sérumalbumine et au rapport IgA / sérumalbumine obtenu (Tableau II.G.2.). On observe une relation entre taux d'IgA et surtout, sauf dans le cas du malade n° 3 , entre rapport IgA / sérumalbumine et le nombre d'épisodes de surinfection. La diminution marquée de la synthèse d'IgA et l'augmentation de la perte de sérumalbumine par transsudation dans la bronche reflète donc l'état non fonctionnel de la muqueuse bronchique, expliquant au moins en partie, la sensibilité locale aux infections des malades bronchitiques. Ces premiers résultats confirment l'intérêt de la confrontation des analyses biochimiques et rhéologiques. Ces analyses peuvent apporter des renseignements intéressants sur les mécanismes pouvant engendrer l'obstruction bronchique et sur les stades évolutifs de la maladie. L'utilisation de ces différents critères peut permettre d'apprécier l'état fonctionnel de la sécrétion d'un sujet .

CONCLUSION

Notre travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de la sécrétion bronchique humaine dont l'orientation actuelle est la mise en évidence des relations entre les propriétés rhéologiques de l'expectoration, la teneur en protéides et l'importance des différentes classes de mucines . Cette confrontation est réalisée dans le but d'apprécier l'état fonctionnel de la sécrétion d'un malade.

Nous nous sommes limitée à l'étude des constituants protéiques de l'expectoration. Etant donné que la sécrétion normale ne peut être obtenue en quantité suffisante, nous avons travaillé sur l'hypersécrétion et plus particulièrement sur l'expectoration de bronchitique chronique, qui n'est cependant qu'un reflet plus ou moins fidèle de la sécrétion présente dans l'arbre bronchique.

Le mucus bronchique est un milieu biologique complexe : il est caractérisé par son hétérogénéité macroscopique et ses propriétés rhéologiques de visco-élasticité. Celles-ci sont dues à l'organisation fibrillaire du mucus qui repose sur les interactions existant entre mucines et protéides. Toutes ces caractéristiques sont autant d'obstacles à l'utilisation des techniques courantes d'analyse biochimique. Il a donc été tout d'abord nécessaire de détruire l'architecture fibrillaire du mucus. Rejetant l'emploi de la réduction des ponts disulfures dont l'action sur la viscosité du mucus est bien connue mais qui modifie particulièrement les protéines du mucus, nous avons choisi d'éliminer les mucines acides et d'extraire les protéides par échange ionique en utilisant l'Ecteola-cellulose. Dans le tampon employé, les mucines acides restent fixées sur l'échangeur et l'ensemble des autres constituants non acides est élué.

Nous avons ensuite entrepris l'étude de l'extrait de mucus , en effectuant , tout d'abord, l'identification des constituants par leurs caractères immunologiques, puis un fractionnement en chromatographie de gel-filtration.

La technique d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle appliquée à l'extrait de mucus nous a permis de progresser dans l'identification des constituants protéiques du mucus. Par l'emploi d'un immunsérum de Lapin

anti-sérum humain total, nous identifions quinze protéides sériques. Nous avons analysé les particularités de quelques-uns de ces constituants, notamment de l'α_1-antitrypsine qui, dans la plupart des mucus étudiés, apparaît sous la forme d'un arc à double courbure. L'étude plus approfondie de ce constituant ainsi que celle des autres inhibiteurs de protéases présents dans le mucus , l'α_1-antichymotrypsine et l'α_2-macroglobuline , sera intéressante pour la connaissance des mécanismes de défense de la bronche.

Nous avons ensuite entrepris l'identification des constituants de type sécrétoire à l'aide d'immunsérums anti-sécrétions , et en particulier, d'immunsérums de Lapin anti-mucus bronchique préparés au laboratoire. L' immunsérum de Chèvre anti-lait permet de révéler les IgA sécrétoires et la bronchotransferrine dont les caractères antigéniques sont communs à ceux de la lactotransferrine. L'immunsérum de Lapin anti-salive de parotide et l'immunsérum de Cheval anti-salive totale mettent en évidence l'amylase et quatre autres constituants non encore identifiés, dont deux présentent une activité estérasique. Par l'emploi des deux immunsérums de Lapin anti-mucus bronchique, deux autres constituants inconnus sont mis en évidence.

Ainsi, parmi les protéides sécrétoires révélés par les techniques immunologiques, plusieurs restent à identifier, et leur rôle biologique reste à découvrir. De plus, la question de l'existence de constituants spécifiques de la sécrétion bronchique humaine n'est pas encore définitivement résolue.

Ensuite, nous avons abordé le fractionnement de l'extrait de mucus. Il a été effectué par chromatographie de gel-filtration sur une colonne de Sepharose 6 B , et les six fractions obtenues ont été étudiées. Nous avons constaté que la dernière fraction de l'éluat contenait , comme composant majeur, le lysozyme dont la composition en acides aminés présente les caractéristiques de celles des lysozymes isolés d'autres sécrétions humaines.

A la fin de ce bilan, nous soulignons l'importance des IgA globulines de la sécrétion bronchique, qui sont dans leur majorité des IgA 11 S et dont une étude plus approfondie serait intéressante : elle permettrait de déterminer si ces IgA présentent les mêmes particularités que les IgA colostrales humaines qui sont bien connues maintenant (composition en acides aminés et en sucres, propriétés chimiques, assemblage moléculaire identique $(IgA)_2$+SC+J).

Enfin, en appliquant avec l'immunsérum de Lapin anti-sérum humain total, la technique d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle à quelques sécrétions particulières, nous avons démontré l'apport de cette technique qui fournit un bilan global intéressant des protéides du mucus bronchique.

Après avoir constaté les variations de composition biochimique qui peuvent exister d'une sécrétion bronchique à l'autre, nous abordons dans la deuxième partie , l'estimation quantitative de certains constituants protéiques du mucus. Un paramètre sérique , la sérumalbumine, et un paramètre sécrétoire , les IgA-globulines, sont choisis. Nous disposons d'une technique de dosage précise et fiable , l'électro-immunodiffusion, à laquelle quelques adaptations ont dû être faites pour qu'elle soit applicable au mucus bronchique. La préparation des gammes étalons adéquates (IgA 11 S) est effectuée. Seuls subsistent les problèmes techniques dus au caractère hétérogène et visqueux du mucus : toute volumétrie correcte est impossible. Il a donc été nécessaire de mettre au point une technique d'homogénéisation du mucus bronchique, car les protocoles proposés par d'autres auteurs ne sont pas entièrement satisfaisants.

L'utilisation des ultra-sons associée à l'action d'une résine cationique s'est avérée une technique valable d'homogénéisation du mucus. Mais les phénomènes qui se déroulent lors de ce processus ne sont pas encore connus. Néanmoins, l'abaissement des valeurs de la viscosité et de la recouvrance élastique démontre l'efficacité de cette méthode. Nous obtenons un milieu dont la mesure volumétrique est correcte. Nous avons contrôlé, sur une solution d'IgA colostrales et une solution de sérumalbumine , que l'homogénéisation respecte les caractères immunologiques de ces constituants et que l'assemblage moléculaire des IgA sécrétoires n'est pas détruit.

Cependant, après homogénéisation du mucus, des interactions mucines-protéides , qui sont génantes au cours des techniques électrophorétiques que nous comptons utiliser pour les dosages , subsistent. La libération des protéides de ces interactions est donc effectuée avec l'Ecteola-cellulose et nous obtenons un extrait de mucus utilisable dans les techniques courantes d'analyse. La reproductibilité de notre méthode est essayée que ce soit pour l'homogénéisation ou pour l'extraction par l'Ecteola-cellulose. Les résultats sont, dans l'ensemble, satisfaisants. Lors d'expériences de surcharge de mucus,

en IgA colostrales ou en sérumalbumine, nous avons rencontré un certain nombre de difficultés : la récupération des quantités de protéide ajoutées n'est pas totale, notamment les IgA colostrales utilisées restent partiellement adsorbées sur l'échangeur d'ions. Or nous ne pouvons déterminer le comportement des IgA du mucus dans ces conditions. Néanmoins, d'après les essais de reproductibilité que nous avons effectués, nous pouvons considérer que nous dosons, dans les extraits de mucus, une proportion constante des IgA présentes et que notre méthode est donc utilisable pour une estimation quantitative dans la mesure où l'on indique les limites de cette estimation.

Malgré leurs imperfections, l'homogénéisation et les dosages que nous avons mis au point peuvent permettre une étude quantitative de paramètres intéressants pour définir l'aptitude fonctionnelle de la muqueuse bronchique d'un sujet et en particulier l'évolution du taux d'IgA et de sérumalbumine au cours d'épisodes infectieux ou d'interventions thérapeutiques.

Mais, un travail comparatif ne peut être effectué que dans la mesure où certaines précautions sont prises. En effet, nous avons montré que les sécrétions doivent être recueillies à un moment précis et fixe de la journée, pendant un court laps de temps, les sécrétions de la toilette bronchique étant éliminées. Les techniques utilisées pour l'homogénéisation et le dosage doivent toujours être les mêmes au cours de la réalisation d'un travail comparatif. Pour l'expression des résultats, il est pratiquement impossible de déterminer une valeur moyenne normale d'IgA et de sérumalbumine. L'établissement du rapport taux d'IgA/ taux de sérumalbumine semble plus exact pour que puissent être définies à la fois l'activité de synthèse locale et l'importance de la transsudation plasmatique au niveau de la bronche. Peu de travaux effectués sur la sécrétion bronchique tiennent compte de ces aspects.

BUS LILLE

Enfin, nous avons présenté les premières corrélations établies entre l'étude biochimique, l'étude rhéologique de l'expectoration et l'état fonctionnel de la bronche. Les résultats acquis montrent l'intérêt de ces analyses qui peuvent apporter des renseignements sur les mécanismes de l'épuration bronchique et sur les stades évolutifs de la maladie. L'ensemble de ces études pourra donc permettre d'apprécier l'état fonctionnel de la sécrétion d'un sujet.

BIBLIOGRAPHIE

Pages

ATASSI, M.Z., BARKER, S.A., HOUGHTON, L.E. et STACEY, M. (1959) — Introduction
Neuraminic acid and its relation to chronic bronchitis
Clin. Chim. Acta, 4, 741-747

AXELSEN, N.H. et SVENDSEN, P.J. (1972) — 11
Candida precipitins characterized by a modified antigen-antibody crossed electrophoresis
Protides of the biological fluids. 19th Colloquium 1971
Peeters H. (Ed.) Pergamon Press. Oxford, 561-564

BERNFELD, P. (1955) — 17,23
Amylases α and β
Methods in Enzymology (Academic Press, New-York)
1, 149-158

BISERTE, G., LEVY, A. et HAVEZ, R. (1957) — 49
Seromucoïdes sulfosalicylosolubles et mucoïdes urinaires dans le cancer.
Cancérologie, 3, 7-15

BISERTE, G., HAVEZ, R. et CUVELIER, R. (1963) — 1,2,11, 20,51,52, 53
Les glycoprotéines des sécrétions bronchiques.
Exp. Ann. Bioch. Med., 24, 85-120

BRANDTZAEG, P., FJELLANGER, I. et GJERULDSEN, S.T. (1970) — 49
Human secretory immunoglobulins. I. Salivary secretions from individuals with normal or low levels of serum immunoglobulins.
Scand. J. Haemat., supplément 12, 3-83

BRANDTZAEG, P (1971) — 78
Human secretory immunoglobulins III. Immuno chemical and physicochemical studies of secretory IgA and free secretory piece.
Acta path. microbiol. scand. Section B, 79, 165-188

BRANDTZAEG, P. (1974) — 45
Mucosal and glandular distribution of immunoglobulin components ; differential localization of free and bound SC in secretory epithelial cells.
J. Immunol., 112, , 1553-1559

BROGAN, T.D. (1959) 52
The carbohydrate complexes of bronchial secretion
Biochem. J., 71, 125-131

BROGAN, T.D. (1960) 11,51
The high molecular weight components of sputum
Br. J. exp. Path., 41, 288-297

BROGAN, T.D., RYLEY, H.C., ALLEN, L. et HUTT, H. (1971) 11
Relation between sputum sol phase composition and diagnosis in chronic chest diseases.
Thorax, 26, 418-423

BUKANTZ, S.C. et BERNS, A.W. (1958) 51
Studies with sputum. I. Initial observations on the chemical nature and blood group substance content of asthmatic sputum.
J. Allergy., 29, 29-43

BÜRGI, W., BÜRGI, H. et LANDIS, E. (1967) 51
Studies on the soluble proteins of bronchial secretion in patients with chronic obstructive bronchitis during mucolytic treatment.
Med. thorac., 24, 379-383

BUSSARD, A. (1959) 9
Description d'une technique combinant simultanément l'électrophorèse et la précipitation dans un gel : l'électrosynérèse.
Biochim. Biophys. Acta, 34, 258-260

CHAUVET, J. et ACHER, R. (1972) 35
Isolation of a trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor) from bovine ovary by affinity chromatography through trypsin Sepharose.
FEBS Letters, 23, 317-320

CLARKE, H.G.M. et FREEMAN, T. (1967) 9
Quantitative immunoelectrophoresis method (Laurell electrophoresis)
Protides of the biological fluids. 14th Colloquium 1966
Peeters H. (Ed.) Elsevier Amsterdam, 503-509

COUTURIER M., RICHER G., TURGEON F. et ROBERT, J. (1973) 45
Etude du lieu de synthèse de l'IgA sécrétoire dans l'arbre respiratoire humain.
Rev. Can. Biol., 32, , 91-96

CUVELIER, R. (1963) 4
Etude des glycoprotéines de l'expectoration
Thèse de Médecine, Lille

DEGAND, P. (1964) 2
Agents mucolytiques et structure du mucus bronchique
Thèse de Médecine, Lille

DEGAND, P. (1972) 3,4,5,23, 46,59,67, 70
Classification et éléments de structure des mucines bronchiques.
Thèse de Doctorat ès-Sciences, Lille

DEGAND, P., ROUSSEL, P., LAMBLIN, G., DURAND, G. et HAVEZ, R. (1973) 92
Données biochimiques et rhéologiques dans l'expectoration. I. Définition biochimique des mucines dans l'expectoration.
Bull. Physio-path. resp., 9, 199-216

DELBART, C. (1972) 29,32
Caractérisation et isolement du lysozyme des sécrétions bronchiques humaines
DEA (Biochimie), Lille

DESCAMPS, J. (1974) 39,78
Procédés de fractionnement des protéides du lait de Femme. Etude particulière de la lactotransferrine et des immunoglobulines de type A (IgA)
Thèse de Doctorat ès-Sciences, Lille

DEUSCHL, H. et JOHANSSON, S.G.O. (1974) 86
Immunoglobulins in tracheo bronchial secretion with special reference to IgE.
Clin. exp. Immunol., 16, 401-412

GERNEZ-RIEUX, Ch., BISERTE, G., HAVEZ, R., VOISIN, C., ROUSSEL, P. et DEGAND, P. (1964) 3,51
Etude de l'activité "in vitro" de différents agents réduisant la viscosité de l'expectoration.
Acta, Tuberc. Pneumol. Belg., 55, 138-164

GÖTZ, H., et FISCHER, M. (1970) 51
Verhalten der elektro-phoretisch, biochemisch und immunologisch definierbaren Proteine des Sputums unter Sekretolyse
Clin. Chim. Acta, 30, 53-64

GUGLER, E., PALLAVICINI, C.J., SWERDLOW, H. et di SANT'AGNESE (1967) 21
The role of calcium in submaxillary saliva of patients with cystic fibrosis
J. of Pediatrics, 71, 585-588

GUMP, D.W., CHRISTMAS, W.A., FORSYTH, B.R., PHILLIPS C.A. et STOUCH, W.H. (1973) 86
Serum and secretory antibodies in patients with chronic bronchitis.
Arch. Intern. Med., 132, 847-851

HALPERN, M.S. et KOSHLAND, M.E. (1970) 32
Novel subunit in secretory IgA.
Nature, 228, 1276-1282

HAUPT, H. et BAUDNER, S. (1973) 38
Isolierung und Kristallisation von Lactoferrin aus Human - Kolostrum.
Z. Physiol. Chem., 354, 944-948

HAVEZ, R., MUH, J.P., ROUSSEL, P., DEGAND, P. et CARLIER, C. (1966) 32,46
Caractères antigéniques particuliers aux immunoglobulines humaines de sécrétion.
C.R. Acad. Sc. Paris, 262, 1379-1381

HAVEZ, R., MUH, J.P., BONTE, M. et BISERTE, G. (1967-a) 78
Etude des γ_A -globulines du colostrum humain.
Clin. Chim. Acta, 15, 7-18

HAVEZ, R., ROUSSEL, P., DEGAND, P. et BISERTE, G. (1967-b) 2
Etude des structures fibrillaires de la sécrétion bronchique humaine.
Clin. Chim. Acta, 17, 281-295

HAVEZ, R., DEGAND, P. , ROUSSEL, P. et RANDOUX, A. (1970) 3,4
Mode d'action biochimique des dérivés de la cystéine sur le mucus bronchique.
Poumon et Coeur, 26, 81-90

HAVEZ, R., LAINE-BASSEZ, A., HAYEM-LEVY, A., et LEBAS, J. (1973) 11,33, 47,92
Données biochimiques et rhéologiques dans l'expectoration. II - Définition biochimique des protéines dans l'expectoration.
Bull. Physio-path. resp., 9, 219-235

HIRSCH-MARIE, H. et BURTIN, P. (1964) 14
Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique de l'activité amylasique du suc gastrique et de la salive humaine
Rev. franç. Etud. clin. biol., 9, 518-520

HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., SCHWARZ, S. et WERLE, E. (1972-a) 13
Isolierung und Charakterisierung eines Proteaseninhibitors aus menschlichem Bronchialsekret
Z. Physiol. Chem., 353, 221-226

HOCHSTRASSER, K., SCHUSTER, R., REICHERT, R. et HEIMBURGER, N. (1972-b) 33
Nachweis und quantative Bestimmung von Komplexen zwischen Leukozytenproteasen und α_1-Antitrypsin in Körpersekreten und Körperflüssigkeiten.
Z. Physiol. Chem., 353, 1120-1124

HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R. et HEIMBURGER, N. (1973-a) 13
Antigenic relationship between the human bronchial mucus inhibitor and plasma inter-α-trypsin-inhibitor
Z. Physiol. Chem., 354, 587-588

HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., SCHWARZ, S. et WERLE, E. (1973-b) 13
Detection and isolation of a second acid stable proteinase inhibitor from human bronchial mucus
Z. Physiol. Chem., 354, 923-926

HOCHSTRASSER, K., HOCHGESAND, K., SCHUSTER, R., BAADER, K., PECHER, F., FRITZ, H. et HEIMBURGER, N. (1973-c) 35
Zur selektiven Bindung von α_1-Antitrypsin an Trypsin- und Chymotrypsincellulose. Nachweis von Komplexen zwischen α_1-Antitrypsin und Proteasen im Blutserum
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 7, 286-290

IBAYASHI, J., ANZAI, T., HOOD, J.E., HYDE, L. et CARPENTER, C.M. (1963) 51
Immunochemical analysis of bronchogenic carcinomatous sputum with special reference to secretion specific protein.
Dis. of the Chest, 44, 514-523

JOLLES, J. et JOLLES, P. (1967) 29
Human tear and human milk lysozyme.
Biochem., 6, 411-417

KEAL, E. (1970) Introduction
Modification des propriétés physico-chimiques de l'expectoration dans divers états pathologiques et leur traitement.
Poumon et Coeur, 26, 25-34

KROLL, J. (1968) 11,14
On the immunoelectrophoretical identification and quantitation of serum proteins
Scand.. J. clin. Lab. Invest., 22, 79-85

KROLL, J. (1969) 11,14
Immunochemical identification of specific precipitin lines in quantitative immuno-electrophoresis patterns.
Scand. J. clin. Lab. Invest., 24, 55-60

KUEPPERS, F. et BLACK, L.F. (1974) 44
α_1-Antitrypsin and its deficiency
Am. Rev. Resp. Dis., 110, 176-194

LAEMMLI, U.K. (1970) 91
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4.
Nature, 227, 680-685

LAURELL, C.B. (1965) 9
Antigen-antibody crossed electrophoresis
Anal. Biochem., 10, 358-361

LAURELL, C.B. (1966) 9
Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.
Anal. Biochem., 15, 45-52

LEBAS, J. (1971) 33
Techniques immunologiques d'étude des protéines en milieu gélifié. Applications à la sécrétion trachéo-bronchique.
DERBH (Biochimie)

LEBAS, J., HAYEM, A., LAINE, A. et HAVEZ, R. (1973) 35
Separation de deux formes d'α_1-antitrypsine endobronchiques par chromatographie sur "Sepharose-trypsine".
C.R. Acad. Sc. Paris, 276, 2741-2743

LIEBERMAN, P., RICKS, J., CHAKRIN, L.W., WARDELL, J.R. et PATTERSON, R. (1970) 5,51
Immunoglobulins in respiratory secretions obtained from the canine tracheal pouch.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 135, 713-716

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, H.J., FARR, A.L. et RANDALL, R.J. (1951) 49
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. biol. Chem., 193, 265-275

MANCINI, G., CARBONARA, A.O. et HEREMANS, J.F. (1965) 84
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion
Immunochemistry, 2, 235-254

MASSON, P.L., HEREMANS, J.F. et PRIGNOT, J. (1965) 20
Studies on the proteins of human bronchial secretions
Biochim. Biophys. Acta, 111, 466-478

MASSON, P.L. et HEREMANS, J.F. (1966) 32,33 46
Molecular size of γA-Immunoglobulin from bronchial secretions.
Biochim. Biophys. Acta, 120, 172-173

MEDICI, T.C. et BUERGI, H. (1971) Introduction 33
The role of Immunoglobulin A in endogenous bronchial defense mechanisms in chronic bronchitis
Am. Rev. Resp. Dis., 103, 784-791

MESTECKY, J., KRAUS, F.W. et VOIGHT, S.A. (1970) 50
Proportion of human colostral immunoglobulin-A molecules containing the secretory determinant.
Immunology., 18, 237-243

MONTREUIL, J., TONNELAT, J. et MULLET, S. (1960-a) 20
Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (Lactotransferrine) du lait de Femme.
Biochim. Biophys. Acta, 45, 413-421

MONTREUIL, J., CHOSSON, A., HAVEZ, R. et MULLET, S. (1960-b) 47
Isolement de β_2 A-globulines du lait de Femme.
C.R. Soc. Biol., 154, 732-736

MUH, J.P. (1966) 47,55
Particularités de structure des gamma-A-globulines du colostrum humain
Thèse de Médecine, Lille

MUNIES, R., GRUBB, T.C. et CALIARI, R.E. (1968) Introduction
Relationship between sputum viscosity and total sialic acid content.
J. pharm. Sci., 57, 824-827

NEWCOMB, R.W. et DEVALD, B. (1969) 32,51 84,86
Protein concentrations in sputa from asthmatic children (Albumin, lactoferrin, γA and γG).
J. Lab. clin. Med., 73, 734-743

OHKUMA, S. (1970) 4
Some properties of sialoglycopeptides released from human erythrocytes by treatment with proteinases.
Blood and Tissue Antigens, Academic Press, N.Y-London, D. Aminoff (Ed.). 367-373

OHLSSON, K. (1971-a) 35
Interactions in vitro and in vivo between dog trypsin and dog plasma protease inhibitors
Scand. J. clin. Lab. Invest., 28, 219-224

OHLSSON, K. (1971-b) 35
Interactions between human or dog leucocyte proteases and plasma protease inhibitors.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 28, 225-230

PETIT, J.F. et JOLLES, P. (1963-a) 29
Purification and analysis of human saliva lysozyme
Nature, 200, 168-169

PETIT, J.F., PANIGEL, M. et JOLLES, P. (1963-b) 29
Purification et analyse d'un lysozyme extrait du placenta humain.
Bull. Soc. Chim. biol. 45, 211-217

PLATT, H.S., SEWELL, B.M., FELDMAN, T. et SOUHAMI, R.L (1973) 17
Further modifications of the two-dimensional electrophoretic technique of Laurell.
Clin. Chim. Acta, 46, 419-429

POIRIER, R. (1972) 51,86
Contribution à l'étude des IgA bronchiques en pathologie respiratoire.
Thèse de Médecine, Marseille

PUCHELLE, E., et BENIS, A.M. (1971) 1
Propriétés d'écoulement des sécrétions bronchiques.
Bull. Physio-path. resp., 7, 673-712

PUCHELLE, E., ZAHM, J.M. et HAVEZ, R. (1973) 92
Données biochimiques et rhéologiques dans l'expectoration - III - Relation des protéines et mucines bronchiques avec les propriétés rhéologiques.
Bull. Physio-path. resp., 9, 237-256

PUCHELLE, E., PHAM, Q.T., DA COSTA DE MORAES, R., HAYEM, A., LAINE A. et SERVAIS, V. (1974) 92
Etude rhéologique et biochimique des sécrétions : relations avec la fonction respiratoire.
Colloque INSERM - Réactions bronchopulmonaires aux polluants atmosphériques, 29, 19-36

PUCHELLE, E., GIRARD, F., BECK G., HAYEM, A., BAILLEUL, V. et LAINE A. (1975) 93
Role of bacterial infection on the biochemical and rheological properties of sputum.
Am. Rev. Resp. Dis. (soumis au Comité de lecture)

RASCHE, B. et ULMER, W.T. (1971) 52,86
Untersuchungen über die Zusammensetzung des Bronchialschleimes bei chronisch obstruktiver Bronchitis
Pneumologie, 144, 10-32

RESSLER, N. (1960-a) 9
Electrophoresis of serum protein antigens in an antibody containing buffer.
Clin. Chim. Acta, 5, 359-365

RESSLER, N. (1960-b) 9
Two dimensional electrophoresis of protein-antigens with an antibody containing buffer
Clin. Chim. Acta, 5, 795-800

REYNOLDS, H.Y., et THOMPSON, R.E. (1973) Introduction
Pulmonary host defenses - I - Analysis of protein and lipids in bronchial secretions and antibody responses after vaccination with Pseudomonas aeruginosa
J.Immunol., 111, 358-368

ROUSSEL, P. (1965) 4,20
Contribution à l'étude du mucus bronchique.
Thèse de Médecine, Lille

RYLEY,, H.C. et BROGAN, T.D. (1968) 51,53 84,85
Variation in the composition of sputum in chronic chest diseases.
Br. J. exp. Pathol., 49, 625-633

RYLEY, H.C. (1970) 11
An electrophoretic study of the sol phase of sputum
J. Lab. clin. Med., 75, 382-390

RYLEY, H.C. (1972) 20,21
An immunoelectrophoretic study of the soluble secretory proteins of sputum.
Biochim. Biophys. Acta, 271, 300-309

RYLEY, H.C. et BROGAN, T.D. (1973) 11,13 33,84 86
Quantitative immunoelectrophoretic analysis of the plasma proteins in the sol phase of sputum from patients with chronic bronchitis.
J. clin. Path., 26, 852-856

SALVAGGIO, J., LOPEZ, M., ARQUEMBOURG, P., WALDMAN, R. et SLY, M. (1973) 52,86
Salivary, nasal wash, and sputum IgA concentration in atopic and nonatopic individuals.
J. Allergy Clin. Immunol., 51, 335-343

SCHULTZE, H.E. et HEREMANS, J.F. (1966) 33
Molecular biology of human proteins.Vol. 1
Nature and Metabolism of extracellular proteins
Elsevier Publishing Company - Amsterdam-London-New-York, p. 190

SUHS, R.H. et LEPPER, M.H. (1965) 51
Relationship of the antigenic structure of sputum and tracheobronchial mucosa.
Am. Rev. Resp. Dis., 91, 59-68

SZABO, S., RASCHE, B. et MODY, E. (1973) 52,86
Untersuchungen über die serologische Aktivität der Immunoglobuline des Bronchialschleims bei chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen
Pneumologie, 149, 1-29

TOMASI, T.B., TAN, E.M., SALOMON, A. et PRENDERGAST, R.A. (1965) 32
Characteristics of an immune system common to certain external secretions.
J. Exp. Med., 121, 101-124

TURGEON, P., TURGEON, F. et ROBERT, J. (1969) 51,84
Les immunoglobulines sécrétoires trachéo-bronchiques (rapport préliminaire)
Union Méd. Canada, 98, 934-939

TURGEON, P., ROBERT, J. et TURGEON, F. (1971) 86
Etude des immunoglobulines sériques et sécrétoires trachéo-bronchiques
Union Méd. Canada, 100, 232-239

VOISIN, C., DELMAS-MARSALET, Y., TONNEL, A.B. LEFEVRE, J.M. et JOSEPH, M. (1973) 45,51
Etude quantitative des immunoglobulines A dans les sécrétions bronchiques (Application en pathologie infectieuse respiratoire). 52
Rev. Fr. Mal . Resp., 1, 899-912

WALDMAN, R.H. et GANGULY, R. (1974) 45
The role of the secretory immune system in protection against agents which infect the respiratory tract.
The immunoglobulin A system - Ed. MESTECKY J. and LAWTON A.R. - 1974 Plenum Press - N.Y.- London
Advances in Experimental medecine and biology, 45, 283-294

WEEKE, B (1973) 46,73
General remarks on principles, equipment, reagents and procedures.
Scand. J. of Immun., 2, supplément I, 1-35

WHITE, J.C., ELMES, P.C. et WALSH, A. (1954) 1
Fibrous proteins in pathological bronchial secretions studies by optical and electron microscopy : deoxyribonucleoprotein and mucoprotein in bronchial secretions
J. Path. Bacteriol., 67, 105-108

PARTIE TECHNIQUE

TABLE DES MATIERES DE LA PARTIE TECHNIQUE

	Pages
I ETUDE ELECTROPHORETIQUE ET IMMUNOELECTROPHORETIQUE SUR LAME DE GEL SEMI-SOLIDE D'AGAR OU D'AGAROSE.	T.1
I. A. Electrophorèse en lames d'agar	T.1
I.A.1 Préparation des lames	T.1
I.A.2 Migration électrophorétique	T.1.
I.A.3 Fixation	T.1
I.A.4 Colorations	T.2
I. B. Immunoélectrophorèse en lames d'agar	T.2
I. C. Electrophorèse en lame d'agarose	T.2
II TECHNIQUES D'ELECTRO-IMMUNODIFFUSION	T.3
II. A Equipement, réactifs	T.3
II.A.1 Equipement particulier à l'EID	T.3
II.A.2 Réactifs	T.4
II. B Technique d'immunoélectrophorèse en double dimension	T.5
II.B.1 Première dimension	T.5
II.B.2 Transfert de la bande d'agarose	T.5
II.B.3 Deuxième dimension	T.7
II.B.4 Elimination des protéines non précipitées après immunoélectrophorèse	T.7
II.B.5 Séchage	T.7
II.B.6 Coloration et décoloration	T.7
II. C Techniques d'identification des plages de précipitation avec modification de la technique de double dimension	T.8

Pages

II.C.1 Par utilisation de protéines purifiées et identifiées T.8

II.C.1.a Technique du "tandem" T.8

II.C.1.b Absorption d'immunsérum T.8

II.C.2 Par utilisation d'immunsérums monospécifiques T.8

II.C.2.a Comparaison directe T.8

II.C.2.b Technique du gel intermédiaire T.10

II. D Technique d'électro-immunodiffusion en "rockets" technique de dosage T. 10

II.D.1 Préparation du gel T.10

II.D.2 Réalisation des puits de dépôts T.10

II.D.3 Dépôts des échantillons T.10

II.D.4 Exploitation des résultats T.12

II. E Technique d'électroimmunodiffusion avec prédiffusion de l'antigène T.12

II.E.1 Mode opératoire T.12

II.E.2 Interprétation T.14

III PREPARATION DES IMMUNSERUMS T.14

IV GELS DE POLYACRYLAMIDE T.14

IV. A Appareillage T.14

IV. B Réactifs T.15

IV.B.1 Solutions pour les gels T.15

IV.B.2 Solution stock d'électrolyte T.15

IV.B.3 Colorant-Décolorant T.15

IV. C Préparation des gels T.16

IV.C.1 Gel de séparation T.16

IV.C.2 Gel de concentration T.16

IV.D Dépôts des échantillons T.16

IV.E Electrophorèse T.16

Pages

IV. F Fixation - Coloration - Décoloration T.17

V CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION T.17

V. A Tampon d'élution T.17

V. B Fractions T.17

V.C Lecture T.17

VI PREPARATION DE L'ECTEOLA-CELLULOSE T.18

VII METHODES DE MISE EN EVIDENCE D'ACTIVITE ENZYMATIQUE T.18

VII . A Repérage d'une activité spécifique de l'amylase T.18

VII.A.1 Réactifs T.18

VII.A.2 Mode opératoire T.19

VII . B Mise en évidence des amylases après électrophorèse ou immunoélectrophorèse en lame ou en plaque T.19

VII.B.1. Substrat T.19

VII.B.2. Incubation T.19

VII.B.3. Révélation T.20

VII . C Mise en évidence des amylases après électrophorèse en gel de polyacrylamide T.20

VII. D Mise en évidence de l'activité estérasique après électrophorèse ou immunoélectrophorèse T.20

VII.D.1 Réactifs T.20

VII.D.1.a Bain de lavage T.20

VII.D.1.b Réactif pour la coloration T.20

VII.D.2 Protocole T.21

VII.D.2.a Lavage T.21

VII.D.2.b Coloration-Fixation T.21

VIII PREPARATION DE SEPHAROSE COUPLE A LA TRYPSINE T.21

VIII . A. Activation du Sepharose par le bromure de cyanogène T.21

VIII . B . Couplage avec la trypsine T.22

VIII. C . Préparation de la colonne T.22

VIII . D . Chromatographie T.22

I ETUDE ELECTROPHORETIQUE ET IMMUNOELECTROPHORETIQUE SUR LAME DE GEL SEMI-SOLIDE D'AGAR OU D'AGAROSE (TECHNIQUE DE SCHEIDEGGER, 1955)

I . A - Electrophorèse en lames d'agar :

Le support est un gel d'agar (spécial Agar noble Difco) à 0,9 p. 100 en tampon véronal de pH 8,2 et de force ionique $\mu = 0,1$:

Véronal sodé	79,3 g
HCl N	115 ml
Eau désionisée q.s.p.	5 l

La clarification de ce mélange est effectuée au bain marie bouillant.

I . A.1 : Préparation des lames :

3 ml d'agar à 0,9 p. 100 sont coulés sur une lame de verre de 7,5 x 2,5 cm. Après refroidissement, une fente de 3 mm de largeur, 20 mm de longueur, est pratiquée à 2,5 cm du bord qui sera placé du côté de la cathode.

I. A.2 : Migration électrophorétique :

La cuve à électrophorèse utilisée peut recevoir 8 lames. L'électrolyte est le tampon véronal de pH 8,2. Une épaisseur de papier Whatman n°1 assure le contact entre les lames et le tampon. Les dépôts des échantillons sont effectués après l'établissement d'une différence de potentiel de 20 volts aux extrémités de la lame, elle est maintenue pendant 2 h 30.

I. A.3 : Fixation :

La fixation des protéides dans le gel est effectuée pendant 4 h au minimum dans le bain :

alcool absolu	600 ml
eau désionisée	400 ml
acide acétique RP	20 ml

Puis, les lames sont séchées sous papier Whatman n°3.

I. A.4 : Colorations :

2 types de colorations sont utilisés :

- coloration des protéines par l'Amidoschwarz (AS) à 1 p. 100 en solution méthanol-acide acétique
- coloration par le réactif de Schiff après oxydation périodique (PAS) pour les glycoprotéines (BISERTE, 1957).

I. B - Immunoélectrophorèse en lames d'agar :

Cette technique associe une migration électrophorétique et une identification immunologique. Le support et l'électrolyte sont les mêmes que précédemment. Les dépôts sont réalisés dans des trous effectués à 2,5 cm de l'extrémité de la lame. La migration électrophorétique est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment. A la fin du temps de migration, une gouttière est pratiquée dans l'agar à équidistance des trouspour recevoir l'immunsérum. La diffusion des antigènes et des anticorps dure de 24 à 48 h dans une boîte à diffusion à température ambiante. Les lames sont ensuite lavées dans du sérum physiologique pendant au moins 4 heures, séchées, lavées sous eau courante pour éliminer l'excès d'anticorps et de protéides non précipités. Après séchage sous papier Whatman n°3, les colorations sont effectuées de la même façon que pour les électrophorèses (I . A . 4).

I. C - Electrophorèse en lame d'agarose (pour l'étude des mucines) :

Le support est un gel d'agarose à 0,9 p. 100 dans le même tampon véronal de pH 8,2. La préparation des lames est identique à celle des lames d'agar (I . A.1). La migration électrophorétique s'effectue pendant 1 h sous une différence de potentiel de 20 volts aux extrémités de la lame. A la sortie de la cuve d'électrophorèse, la fixation des proteides diffère selon la coloration que l'on désire effectuer :

- dans le bain
  - alcool absolu
  - eau désionisée
  - CH_3COOH (voir I.A.3.,p.T.1.)

si la coloration est faite par l'Amidoschwarz, ou par le réactif de Schiff après oxydation periodique.

- dans une solution à 0,1 p. 100 de Cetavlon (bromure de cétyl-triméthyl ammonium) (VANARKEL et coll., 1963) si la coloration est

faite par le bleu de toluidine faible (40 mg/100 ml mélange acétone-eau désionisée (4/1)) ou fort (400 mg/100 ml du même mélange).

II TECHNIQUES D'ELECTRO-IMMUNODIFFUSION

Les différentes techniques se rattachant à l'électroimmunodiffusion (EID) que nous avons utilisées sont :

- l'immunoélectrophorèse en double dimension avec ses variantes permettant l'identification des différentes plages de précipitation obtenues.
- la technique des "rockets" qui est une technique de dosage immunologique.
- la technique dite de prédiffusion qui lors d'un fractionnement en milieu liquide permet le repérage d'un protéide.

Le principe de ces méthodes est le même : il s'agit de la migration électrophorétique d'antigènes (Ag) dans un gel contenant des anticorps (Ac) et de l'obtention d'une précipitation immunologique spécifique de ces antigènes avec les anticorps précipitants correspondants. La surface comprise dans l'arc de précipitation est proportionnelle au rapport Ag/Ac. Il faut choisir des conditions électrophorétiques telles que les molécules d'anticorps ne se déplacent pas dans le gel tandis que les molécules d'antigènes migrent en fonction du courant.

II. A - Equipement, réactifs (d'après WEEKE, 1973):

II. A.1 : Equipement particulier à l'EID :

- Cuve d'électrophorèse à évaporation limitée, possèdant un système de réfrigération (modèle MECAPLASTIC). La réfrigération est obtenue par une circulation d'eau (environ 15°C).
- Plaques de verre : 2 tailles sont nécessaires :

  9 x 11 x 0,2 cm et 10 x 10 x 0,2 cm

Avant l'utilisation, les plaques sont nettoyées dans un bain de MUCAPUR (Block), puis sont rincées sous eau courante et essuyées avec un linge non pelucheux.

- Contacts électriques : ils sont obtenus par 5 épaisseurs de papier Whatman n°1, découpé aux dimensions : 6 x 10 ou 11 cm suivant la plaque utilisée. Le courant doit suivre la direction des fibres du papier.

- Bain marie réglé à 55°C

- Plan horizontal : trépied réglable muni d'un niveau à bulle, indispensable pour l'obtention d'un gel d'épaisseur uniforme.

- Source d'air chaud : nécessaire lors du séchage des plaques d'agarose.

II. A.2 : Réactifs :

II. A.2.a : Tampon :

Tampon véronal	pH 8,6 :
Véronal sodé	20,6 g
Véronal acide	4 g
Eau désionisée q.s.p.	5 l

$\mu = 0,02$

Les pôles sont inversés après chaque migration et le tampon doit être changé après 3 utilisations.

II. A.2.b : Agarose :

Agarose Indubiose A 37 (Industrie Biologique Française) à 1 p. 100 dans le tampon véronal de pH 8,6. L'agarose est préparé au bain marie bouillant jusqu'à clarification, puis gardé liquide dans le bain marie à 55°C. S'il n'est pas utilisé dans les 10 heures qui suivent, l'agarose est conservé à +4°C.

II. A.2.c : Immunsérums:

Immunsérums commerciaux : Behring, Nordic, Kallestad, Technicon et immunsérums préparés au laboratoire (voir p. T.14).

II. A.2.d : Bains de lavage :

Ils sont réalisés dans du sérum physiologique à 0,9 p. 100.

II . A.2e : Colorant :

Coomassie Brillant Blue R (Gurr)	5 g
Ethanol 95 p. 100	450 ml
Acide acétique RP	100 ml
Eau désionisée	450 ml

II. A.2f : Décolorant :

Même composition que le solvant du colorant.

II. B. - Technique d'immunoélectrophorèse en double dimension :

Cette technique est réalisée selon le principe présenté par LAURELL (1965) et repris par CLARKE (1967).

II. B.1 : Première dimension :

15 ml d'agarose sont coulés sur une plaque de verre, de dimensions 11 x 9 x 0,2 cm (épaisseur du gel : 1,5 mm). Après gélification, 4 fentes ou puits sont réalisés comme il est indiqué sur la figure II. B à l'aide de trocarts (des dépôts de 50 µl peuvent être faits dans des fentes de 3 mm sur 15 mm, de 20 µl dans des puits de diamètre 4 mm, de 8 à 9 µl dans des puits de 3 mm de diamètre). 4 dépôts d'échantillon peuvent être effectués sur une même plaque. Après avoir laissé diffuser les échantillons jusqu'à ce que les trous ou fentes soient vides, on rebouche avec de l'agarose maintenu à 55°C dans lequel est ajouté du bleu de Bromophénol comme témoin de migration. Les ponts de papier sont mis en place et une différence de potentiel de 100 volts est appliquée aux bords de la plaque de la cathode vers l'anode pendant 75 minutes environ (le témoin doit atteindre l'extrémité de la plaque).

II. B.2 : Transfert de la bande d'agarose :

Après la migration électrophorétique, la plaque est retirée de la cuve et découpée selon la figure II . B . Une bande de 5 mm est éliminée le long des quatre côtés de la plaque. La gélose restante est divisée en quatre bandes de 2 cm de large, dans le sens de la longueur. Chacune de ces bandes est transférée à l'aide d'une grande lame de rasoir sur le bord d'une plaque de verre de dimensions 10 x 10 x 0,2 cm (figure II. B). Cette bande sera le côté cathodique lors de la deuxième migration.

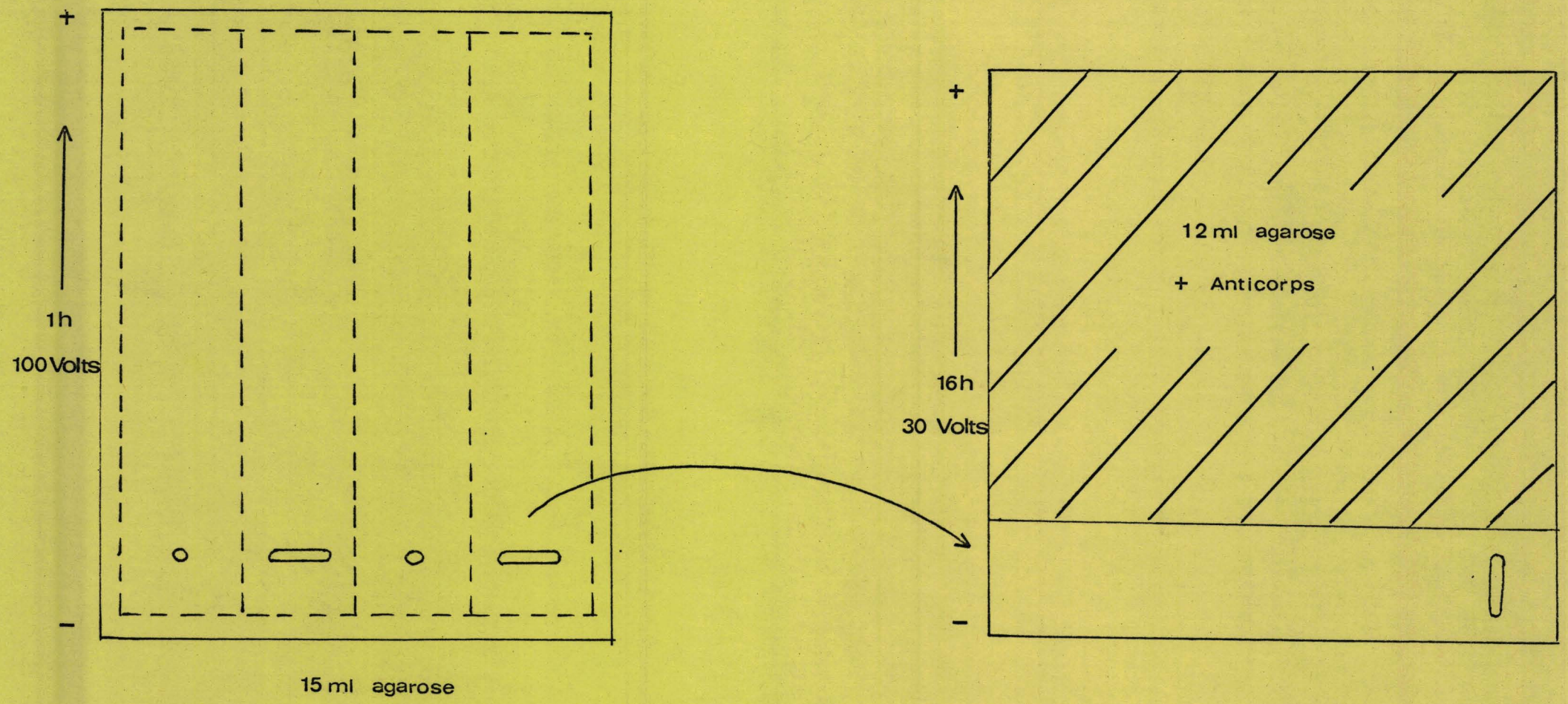


Figure II.B : TECHNIQUE D'IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE

BUS LILLE

II. B.3 : Deuxième dimension :

12 ml d'agarose maintenus à 55°C sont soigneusement mélangés à la quantité d'immunsérum choisi (cette quantité peut varier de 10 µl à 500 µl suivant les immunsérums utilisés, suivant le dépôt effectué). Puis ce mélange est coulé sur la surface restante de la plaque (épaisseur uniforme : 1,5 mm). Après gélification, la plaque est placée dans la cuve à électrophorèse ; les ponts de papier sont disposés, une tension de 35 volts est appliquée aux bords de la plaque (de la cathode vers l'anode) pendant 16 heures.

II. B.4 : Elimination des protéines non précipitées après immunoélectrophorèse :

- "Ecrasement" :

A la sortie de la cuve à électrophorèse, les trous ou fentes sont remplis avec de l'eau désionisée pour éviter leur éclatement lors de l'écrasement. Le gel est ensuite recouvert d'une feuille de papier filtre puis d'une épaisseur de 1 cm de papier de cellulose (papier Lotus). Une pression uniforme est exercée pendant 45 minutes à l'aide de plaques de verre placées au-dessus du papier de cellulose.(masse des plaques, environ: 1 kg.)

- Lavage :

Le papier filtre est soigneusement retiré, les plaques sont ensuite placées 30 minutes dans un bain de sérum physiologique puis 15 minutes dans un bain d'eau désionisée.

II. B.5 : Séchage :

Les plaques sont recouvertes d'un papier filtre et séchées sous courant d'air chaud.

II. B.6 : Coloration et décoloration :

Coloration : 10 minutes

Décoloration : bains successifs jusqu'à transparence du fond de la plaque. La plaque est séchée sur papier filtre à la température du laboratoire.

II.C : Techniques d'identification des plages de précipitation avec modification de la technique de double dimension :

II. C.1 : Par utilisation de protéines purifiées et identifiées :

II. C.1.a : Technique du "tandem" (KROLL, 1968-1969)

Un dépôt supplémentaire est effectué 1 cm en avant du dépôt de l'échantillon (figure II. C.1a). Ce dépôt est constitué d'une solution du protéide pur et identifié, dont on soupçonne la présence dans l'échantillon. Toutes les opérations ultérieures sont effectuées de la même façon que pour la double dimension ordinaire. Si le protéide pur déposé en avant de l'échantillon lors de la première dimension est présent dans cet échantillon et révélé par l'immunsérum utilisé, nous aurons un dédoublement de l'arc de précipitation spécifique de ce protéide pur . (Fig. voir dans le texte p.15). Cette technique peut être utilisée également pour des dépôts de deux solutions contenant plusieurs Ag et permet une comparaison directe des diagrammes de double dimension.

II. C.1.b : Absorption d'immunsérum :

Les quantités de protéides utilisées pour effectuer les épuisements d'un immunsérum varient suivant que l'on effectue un épuisement par un seul protéide ou par plusieurs protéides : pour un protéide pur 1 mg pour 0,5 ml d'immunsérum suffit, pour un mélange de plusieurs protéides 2 mg pour 0,1 ml d'immunsérum peuvent être nécessaire. Les proportions dépendent également de la quantité d'anticorps contenus dans l'immunsérum à saturer. Les protéines sont mises en contact sous agitation avec l'immunsérum pendant 2 heures. à 37°C. Le mélange est refroidi 1 heure à 4°C et centrifugé à 1 500 tours/mn pendant 10 mn pour éliminer le précipité antigène-anticorps formé. La saturation de l'immunsérum est toujours contrôlée par immunoélectrophorèse.

II. C.2 : Par utilisation d'immunsérums monospécifiques :

II. C.2a : Comparaison directe d'un diagramme obtenu avec un immunsérum spécifique et d'un diagramme obtenu pour le même échantillon avec un immunsérum plurispécifique. Seuls deux échantillons ayant migré en même temps en première dimension peuvent être comparés en superposant les 2 plaques obtenues après la deuxième dimension.

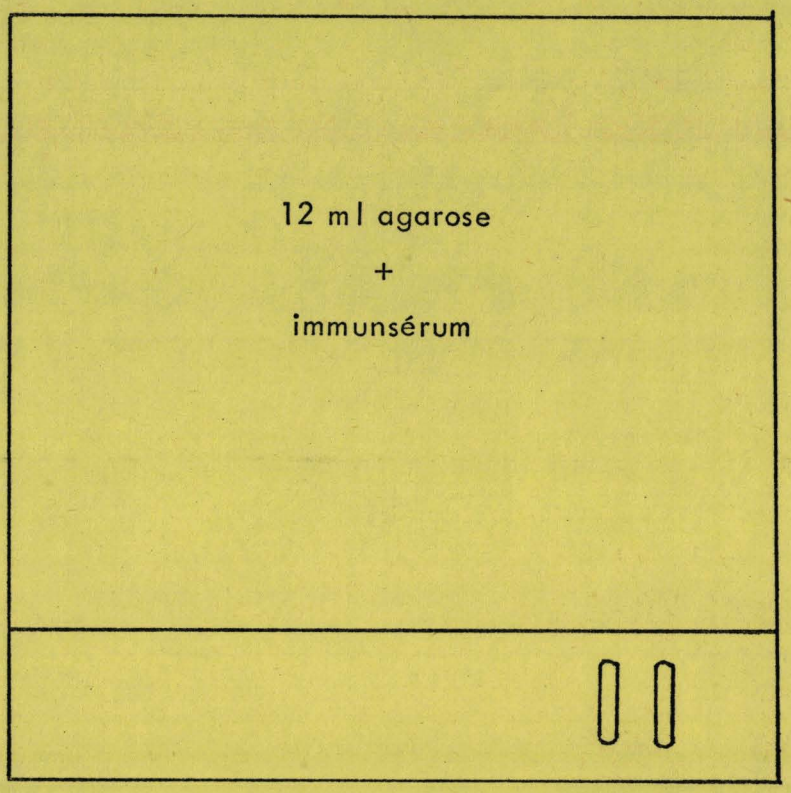


Figure II.C.I.a. :

IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE EN TANDEM

BUS
LILLE

Figure II.C.2.b. :

IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE AVEC GEL INTERMEDIAIRE

II. C.2b : Technique du gel intermédiaire (AXELSEN, 1972)

Les modifications techniques interviennent à partir de la réalisation de la deuxième dimension. En effet, au lieu de couler le mélange agarose + immunsérum sur la surface restante de la plaque, on opère en 2 temps : tout d'abord on coule 3 ml d'agarose contenant l'immunsérum spécifique sur une bande de 2 cm de large le long de la bande de la première dimension (voir figure II. C.2b). Ceci forme le gel intermédiaire. Puis la surface restante est recouverte de 9 ml d'agarose contenant l'immunsérum plurispécifique. Ce gel constitue le gel de référence. La deuxième dimension et le reste de la manipulation sont effectués selon le protocole classique. Le diagramme obtenu dans le gel de référence est comparé avec le diagramme obtenu à l'aide du même immunsérum sans utilisation d'un gel intermédiaire (plaque témoin). L'apparition d'un arc dans le gel intermédiaire en même temps que la disparition ou diminution de haut eur d'un arc dans le gel de référence par rapport à la plaque témoin permet l'identification de cet arc (voir dans le texte p.12).

II. D. - Technique d'électroimmunodiffusion en "rockets" : technique de dosage :

II. D.1 : Préparation du gel :

15 ml d'agarose gardés à 55°C sont mélangés à la quantité choisie d'immunsérum spécifique. Ensuite le mélange est coulé sur une plaque de 11 x 9 x 0,2 cm (épaisseur du gel : 1,5 mm).

II. D. 2 : Réalisation des puits de dépôts :

14 puits équidistants de 7 mm peuvent être faits dans le sens de la longueur de la plaque (Figure II. D.2).

II. D.3 : Dépôts des échantillons :

Après avoir disposé les ponts de papier, on applique une différence de potentiel de 30 volts aux bords de la plaque (cathode vers anode). Cette différence de potentiel est maintenue pendant 16 heures. Des dépôts de 3 µl sont effectués sous courant. Des dilutions (5 au moins) de la gamme témoin sont déposées en commençant par la dilution la plus forte avec une microseringue Hamilton de 10 µl. Puis à la suite, chacun des échantillons à

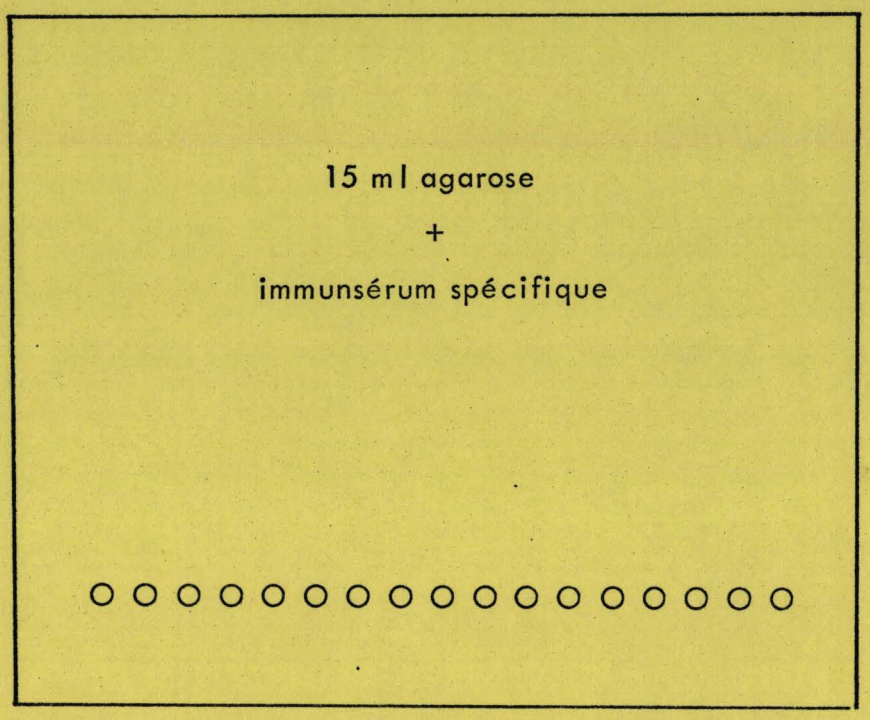
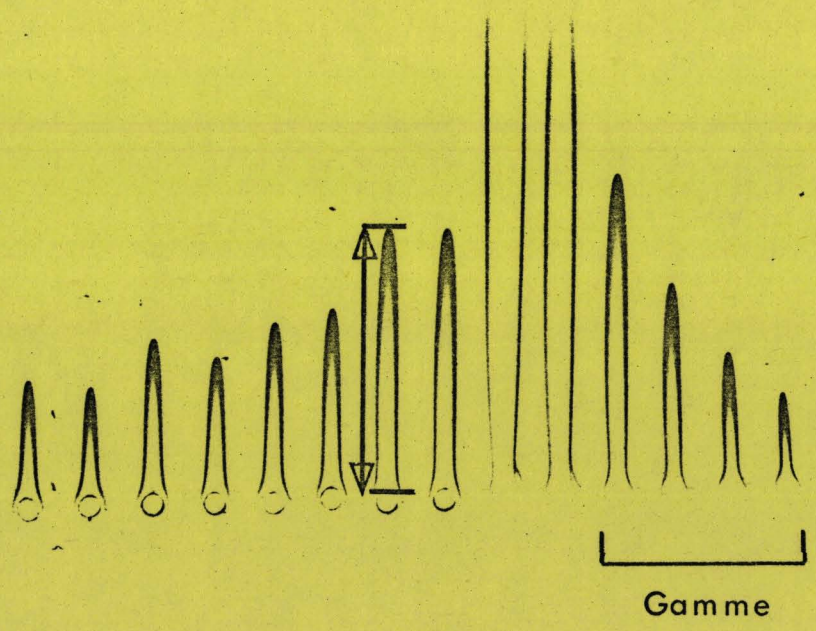


Figure II.D.2. : ELECTRO-IMMUNODIFFUSION EN ROCKETS



BUS LILLE

Figure II.D.4. : MESURE DE LA HAUTEUR DES PICS

doser est déposé. Après la migration électrophorétique, les opérations d'élimination des protéines non précipitées, de séchage, de coloration et décoloration sont identiques à celles décrites pour la double dimension (II. B.4, 5, 6, p.T.7.)

II. D.4 : Exploitation des résultats :

L'aspect obtenu pour les pics est celui d'une fusée d'où le nom de "rocket". En fait pour qu'une mesure soit valable, il faut que la forme du pic soit celle d'un triangle isocèle à sommet aigu. On peut alors utiliser la hauteur de ces pics à la place de la surface pour une mesure quantitative (hauteur mesurée à partir de la limite anodique du trou de dépôt) (Fig. II.D.4) On trace la courbe obtenue en portant en abscisse la concentration d'antigènes en mg/100 ml et en ordonnée, la hauteur des pics en millimètres. Pour une gamme correcte on obtient une droite ou une courbe très légèrement incurvée. Pour déterminer la concentration inconnue d'un antigène, il suffit de reporter la hauteur du pic correspondant sur la courbe obtenue à partir de la gamme. La hauteur des pics doit être comprise entre 0,5 cm et 5 cm pour avoir des résultats reproductibles.

II. E - Technique d'électroimmunodiffusion avec prédiffusion de l'antigène (SVENDSEN, 1970) :

Cette méthode a été mise au point pour étudier la distribution de protéides dans les fractions d'un éluat chromatographique.

II. E.1 : Mode opératoire :

15 ml d'agarose à 1 p. 100 sont coulés sur une plaque de 11 x 9 x 0,2 cm. Après gélification, des puits de 3 mm de diamètre sont réalisés suivant la figure II. E.1 (puits distants de 5 mm sur 2 lignes, en quinconce) . A 5 mm au dessus de la ligne supérieure, on coupe le gel à l'aide d'une grande lame de rasoir et on élimine la partie supérieure du gel ; on le remplace par 12 ml d'agarose contenant les Ac (antisérum plurispécifique ou monospécifique). 8 µl de chaque fraction de l'éluat (ou de 1 fraction sur 2) sont déposés dans les trous, suivant le même ordre que celui dans lequel elles sont collectées. On laisse diffuser de 30 à 60 minutes à température du laboratoire, puis on effectue la migration dans les mêmes conditions que pour les rockets. Les opérations qui suivent la migration électrophorétique sont iden-

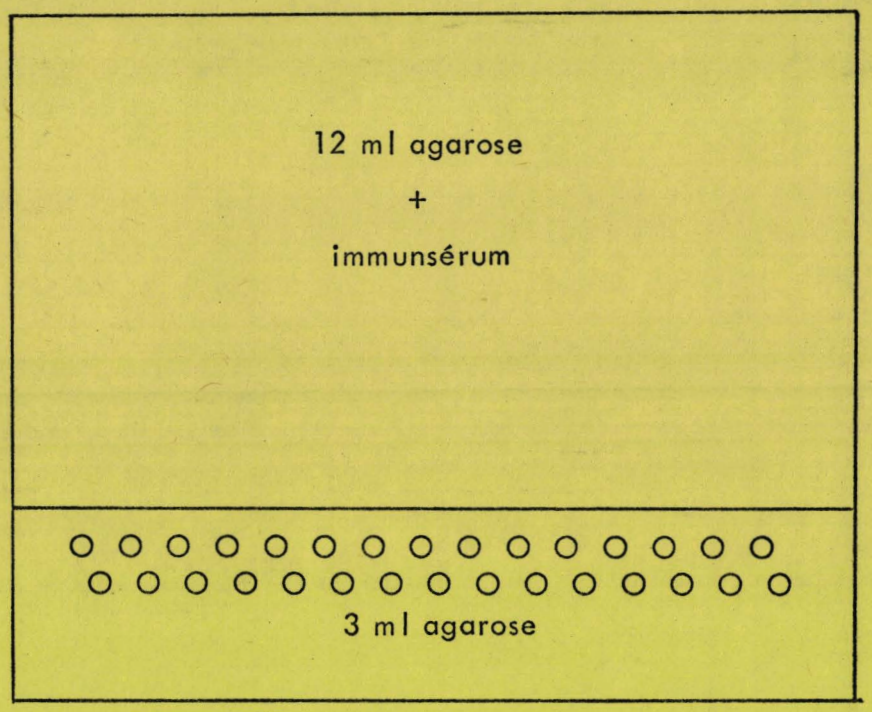


Figure II E I

ELECTRO-IMMUNODIFFUSION AVEC PREDIFFUSION DE L'ANTIGENE

BUS LILLE

tiques à celles indiquées pour la double dimension (II. B.4, 5, 6, p.T.7).

II. E.2 : Interprétation :

Pour chaque antigène de l'échantillon une ligne continue de précipitation est formée dans le gel contenant les anticorps (voir figure dans le texte, p.22).

III PREPARATION DES IMMUNSERUMS

Des immunsérums anti-salive de parotide et anti-fractions de mucus ont été préparés chez des Lapins.

III. A - Jour O :

0,2 à 0,5 mg de protéines sont dissous dans 0,25 ml de sérum physiologique. On y ajoute 0,25 ml d'adjuvant de Freund complet.

Ce mélange est réparti en 10 injections intradermiques abdominales.

III. B - Jour 21 :

Une injection intra-musculaire de 1 mg de protéines dissous dans 0,5 ml de sérum physiologique auquel on ajoute 0,25 ml d'adjuvant de Freund complet.

III. C - Jour 28 :

Nouvelle injection de 1 mg identique à la précédente.

III . D - Prélèvement effectué 10 jours après la dernière immunisation

IV GELS DE POLYACRYLAMIDE TECHNIQUE DAVIS (1964)

IV. A - Appareillage :

Nous avons utilisé un appareil pour électrophorèse en disque, pouvant recevoir 16 tubes de 140 x 5,5 mm et pourvu d'un système de refroidissement (appareil WTW* DEA 90).

---

* WTW : Wiss.-Techn. Werkstätten .

IV. B - Réactifs :

IV. B1 : Solution pour les gels :

Les quantités sont indiquées pour 100 ml de solution :

1	HCl 1 N	48,0 ml
	Tris	36,6 g
	TEMED*	0,23 ml

* Tétraméthyléthylène diamine

2	Acrylamide	30,0 g
	Bisacrylamide	0,8 g
3	Persulfate d'ammonium préparé extemporanément	0,14 g
4	H_3PO_4 1 M	25,6 ml
	Tris	5,7 g
5	Acrylamide	10,0 g
	Bisacrylamide	2,5 g
6	Riboflavine	4,0 mg
7	Saccharose	40,0 g

Toutes ces solutions sauf 3 et 7 peuvent être stockées, à 4°C.

IV. B2 : Solution stock d'électrolyte (pH 8,3)

Tris	6,0 g
Glycine	28,8 g
Eau désionisée q.s.p.	100 ml

IV. B3 : Colorant - Décolorant

Colorant : Solution aqueuse de Coomassie

Brillant Blue R (Gurr) à 1 g
pour 100 ml d'eau désionisée : 1 vol.

Acide trichloracétique à 12,5p.100: 19 vol.

Décolorant : Acide trichloracétique à 12,5 p. 100

IV. C - Préparation des gels

IV . C 1 : Gel de séparation (pH 9,5)

Solution 1	1 vol
Solution 2	2 vol
Eau désionisée	1 vol
Solution 3	4 vol

Le mélange est dégazé. 3 ml de ce mélange sont introduits dans chaque tube en évitant la formation de bulles d'air. Un peu d'eau désionisée est déposée délicatement à la surface du mélange pour obtenir un ménisque bien plat. La polymérisation s'effectue en 45 mm environ, à la température ambiante. La pellicule d'eau est alors éliminée de la surface du gel à l'aide d'un papier filtre.

IV . C 2 : Gel de concentration (pH 8,3)

Solution 4	1 vol
Solution 5	2 vol
Solution 6	1 vol
Solution 7	4 vol

Le mélange est dégazé. 1 ml de ce mélange est coulé au dessus du 1er gel dans chacun des tubes. De la même façon que précédemment, un peu d'eau est déposée à la surface du mélange. La polymérisation s'effectue en initiant la réaction avec une lampe à UV. L'opération dure 1/2 heure environ. La pellicule d'eau est ensuite éliminée.

IV. D - Dépôts des échantillons :

Le dépôt est réalisé délicatement à la surface du gel de concentration à l'aide d'une microseringue. Un peu de poudre de Sephadex G 100 est ajouté au dépôt pour augmenter sa densité.

IV. E - Electrophorèse :

Le tampon stock d'électrolyte est dilué 10 fois avant emploi. On verse 500 ml de ce tampon dans la cuve inférieure de l'appareil. Les tubes de verre sont emboîtés dans les orifices ménagés dans la cuve supérieure qui est ensuite disposée sur l'appareil. Du tampon électrolyte est délicatement

ajouté à la pipette Pasteur au-dessus du dépôt dans chaque tube. La cuve supérieure est ensuite remplie avec 250 ml de tampon auquel a été ajouté du bleu de Bromophénol (témoin de migration). Puis , la migration électrophorétique est effectuée de la cathode vers l ' anode , sous une intensité de 2 mA par tube jusqu'à ce que le témoin coloré ait atteint la partie inférieure du gel (environ 4 h).

IV. F - Fixation - Coloration - Décoloration :

Les gels sont enlevés des tubes à l'aide du jet d'une seringue remplie d'eau et recueillis dans des tubes que l'on remplit d'acide trichloracétique à 12,5 p. 100. Les gels sont ainsi fixés pendant une heure, puis l'acide trichloracétique est remplacé par le colorant pendant une nuit.

La décoloration est obtenue par bains successifs dans l'acide trichloracétique à 12,5 p. 100.

V CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION

Au cours de notre travail, nous avons été amenée à utiliser différents types de support : Sepharose 2 b - 4 B - 6 B, Sephadex G 200 (Pharmacia). Le choix de ces supports est orienté par la taille moléculaire des protéides dont la séparation doit être effectuée. Les dimensions des colonnes varient en fonction du but de l'étude et des quantités de préparation à chromatographier.

V. A - Tampon d'élution :

Tris	0,1 M
NaCl	0,2 M

ajusté à pH 8,0 contenant 0,02p.100 d'azide de sodium.

V. B - Fractions :

Des fractions de 55 gouttes soit 3,2 ml, sont recueillies sur un collecteur automatique de fractions (Ultrorac LKB).

V. C - Lecture :

Chacun des tubes correspondant au fractionnement est soumis

à une lecture au spectrophotomètre à 278 nm. Un repérage des oses combinés est réalisé par la réaction à l'orcinol sulfurique à l'aide de la chaîne d'auto-analyseur Technicon (DEMAILLE et coll., 1965).

VI PREPARATION DE L'ECTEOLA-CELLULOSE

L'Ecteola-cellulose ou Cellex E (Bio-Rad) utilisé a une capacité d'échange de 0,33 mEq pour un lot et 0,5 mEq pour un autre lot, par gramme d'échangeur sec.

Avant le premier emploi de l' échangeur d' ion , il faut lui faire subir deux cycles complets de régénération.* Les indications sont données pour 100 g d'Ecteola-cellulose sèche. Un cycle de régénération comprend, dans l'ordre :

- lavage abondant à l'eau désionisée sur verre fritté
- contact de 30 minutes avec 2 l de NaOH 1 N sous agitation douce dans un bécher.
- lavage abondant à l'eau désionisée sur verre fritté jusqu'à ce que le liquide de lavage soit à pH neutre (contrôle à la phénol-phtaléine).
- contact de 30 minutes avec 2 l d'HCl 1 N sous agitation douce dans un bécher.
- lavage à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH neutre du liquide de lavage (contrôle avec l'hélianthine).

L'échangeur est ensuite équilibré, par plusieurs lavages, dans le tampon choisi.

VII METHODES DE MISE EN EVIDENCE D'ACTIVITE ENZYMATIQUE

VII. A - Repérage d'une activité spécifique de l'amylase :

Le repérage d'une activité amylasique dans les fractions d'un éluat chromatographique est effectué suivant la technique de BERNFELD (1955).

VII . A 1 Réactifs :

- Substrat : 1 g d'amidon soluble (Merck) est dissous dans 100 ml de tampon phosphate 0,02 M de pH 6,9 0,0067 M en NaCl.

---

* après chaque utilisation un seul cycle de régénération est nécessaire.

- 1 g d'acide 3-5 dinitrosalicylique est dissous à la température du laboratoire dans 20 ml de NaOH 2 N + 50 ml d'H_2O. On ajoute 30 g de tartrate de Na et de K et on complète à 100 ml avec de l'eau désionisée. Cette solution doit être protégée du CO_2.

VII . A 2 : Mode opératoire :

1 ml d'une fraction de l'éluat chromatogr aphique convenablement dilué (au 1/5 en général) est incubé pendant 3 minutes à 20°C avec 1 ml de la solution de substrat. La réaction enzymatique est interrompue par l'addition de 2 ml de réactif à l'acide 3-5 dinitrosalicylique. Le tube contenant le mélange est porté au bain marie bouillant pendant 3 minutes puis refroidi sous eau courante. Après addition de 20 ml d'eau, la densité optique de la solution contenant le produit brun de réduction (dans le cas de réaction positive) est déterminée au spectrophotomètre à 54 0 nm. Un blanc est préparé de la même manière sans enzyme.La densité optique correspondant à chaque tube est reportée sur le diagramme d'élution.

VII . B - Mise en évidence des amylases après électrophorèse ou immunoélectrophorèse en lame ou en plaque : (Technique de HIRSCH-MARIE et coll., 1964)

VII . B 1 : Substrat :

Le substrat est de l'empois d'amidon:

- amidon soluble Merck 5 g
- Tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 q.s.p. 100 ml

Il faut chauffer légèrement pour arriver à dissoudre l'amidon puis on laisse refroidir. Le pH du substrat est amené entre 6,8 et 7,0.

VII . B 2 : Incubation :

Les lames et les plaques lavées et séchées, selon la technique habituelle sont immergées dans le substrat, durant 5 heures à la température ambiante. Il est nécessaire de remuer les lames et les plaques fréquemment durant l'incubation.

VII . B 3 : Révélation :

A la sortie du bain, on effectue un lavage rapide mais soigneux dans l'eau faiblement tamponnée à pH 6,8 ; la fixation et la révélation sont réalisées dans la solution suivante :

alcool éthylique 50°	94 ml
acide acétique	5 ml
solution iodée N/100 (Lugol)	1 ml

La zone de digestion de l'amidon par l'amylase apparaît en clair sur un fond bleu foncé. La coloration du fond de la plaque ou de la lame disparaît au bout de quelques heures.

VII. C - Mise en évidence des amylases après électrophorèse en gel de polyacrylamide :

Après la migration électrophorétique le gel est mis en contact avec une plaque d'agar-amidon dont la préparation est la suivante :

On mélange : 1 g d'agar (special Agar noble Difco)
500 mg d'amidon soluble (Merck)
10 ml de tampon phosphate 0,1 M NaCl 0,1 M pH 6,9.

On complète à 100 ml avec de l'eau désionisée. Après dissolution à chaud, 40 ml du mélange sont coulés dans un moule de dimensions 6 x 13 cm (épaisseur du gel environ 5 mm). Lorsque le mélange est gélifié, on met en contact le gel de polyacrylamide avec ce gel d'amidon. Après 10 à 15 minutes à température ambiante, le gel est enlevé de la plaque. La révélation est effectuée en immergeant la plaque dans une solution d'iode N/100 pendant 15 secondes. L'excès d'iode est ensuite éliminé sous eau courante. Les zones de digestion dues à l'amylase sont claires sur un fond bleu fonçé.

VII . D : Mise en évidence de l'activité estérasique après électrophorèse ou immunoélectrophorèse (URIEL, 1961)

VII . D 1 : Réactifs :

VII.D.1.a Bain de lavage.

Le bain de lavage est constitué d'une solution de borate de sodium de pH 8,0.

- solution de borate de Na :

BO_3H_3	12,4 g
NaOH 1 N	100 ml
H_2O q.s.p.	1000 ml

Préparation du bain de lavage à pH 8,0 :

mélanger : 57,5 ml de la solution précédente de borate de Na

42,5 ml d'HCl 0,1 N

VII.D.1.b: Réactif utilisé pour la coloration.

5 mg de β naphtyl acétate (Sigma) sont ajoutés à 0,5 ml de N-N' diméthyl formamide (Carlo Erba) - Mélanger et ajouter 25 ml de tampon phosphate 0,005M de pH 7,4. Agiter et filtrer - Ajouter 10 mg de Diazoblue B (Sigma).

VII . D 2 : Protocole :

VII . D 2 a : Lavage :

- Pour les électrophorèses simples 1/2 heure dans le bain de lavage.

- Pour les immunoélectrophorèses (1 ou 2 dimensions), les lames ou plaques sont lavées 3 jours en changeant 2 fois par jour le bain de lavage.

VII . D 2 b : Coloration - Fixation :

Incuber dans le réactif au moins 1/2 heure à 37°C; les estérases sont révélées par une coloration rose brun. Fixer une nuit dans l'acide acétique à 2 p. 100.

VIII PREPARATION DE SEPHAROSE COUPLE A LA TRYPSINE (Technique de CHAUVET et coll., 1972)

VIII. A. Activation du Sepharose par le bromure de cyanogène .

Du Sepharose 4 B activé par le bromure de cyanogène est commercialisé par Pharmacia. Cependant, il est possible d'effectuer très facilement cette opération d'activation du Sepharose :

15 ml de Sepharose 4 B (Pharmacia) sont filtrés sur un verre fritté, lavés par de l'eau et remis en suspension dans 40 ml d'eau.

2 g de bromure de cyanogène sont dissous dans 3 ml d'eau et ajoutés au Sepharose.

Le pH est immédiatement ajusté à 11 avec de la soude 5 N et maintenu pendant 10 minutes à ce pH.

VIII . B Couplage avec la trypsine

Après filtration sur verre fritté, le Sepharose activé est rapidement lavé avec 1 litre d'eau froide (4°C) et par le même volume d'un tampon borate de sodium 0,05 M, de pH 9,0 également à 4°C. Le Sepharose activé est mis en suspension dans 20 ml de tampon borate et 300 mg de trypsine (Laboratoire Industriel de Biologie) dissous dans 5 ml du même tampon contenant 0,01 M $CaCl_2$ sont rapidement ajoutés ; le mélange est laissé à 4°C pendant 18 heures. Puis le Sepharose-trypsine est lavé par 1 litre de tampon borate 0,05 M de pH 9,0 contenant 0,3 M NaCl et 0,01 M $CaCl_2$.

VIII . C. Préparation de la colonne

Une colonne de 1 x 18 cm est préparée et équilibrée dans un tampon 0,1 M en acétate de pH 4,0 contenant 0,3 M NaCl et 0,01 M $CaCl_2$. Le lavage de la colonne doit être poursuivi jusqu'à absence totale d'activité trypsique dans l'effluent (au moins 400 ml).

VIII . D. Chromatographie

L'échantillon à déposer est dissous dans 2 ml de tampon acétate 0,1 M de pH 4,0 contenant 0,3 M NaCl et 0,01 M $CaCl_2$ et déposé sur la colonne. Le lavage de la colonne par ce même tampon permet de recueillir le matériel non fixé sur la trypsine. Le passage d'un tampon acide 0,1 N HCl, 0,5 M NaCl, 0,01 M $CaCl_2$ de pH 1,2 permet d'éluer les constituants qui ont été retenus. Cette fraction est immédiatement neutralisée par dialyse contre un tampon 0,1 M Tris 0,2 M NaCl de pH 8,0.

BIBLIOGRAPHIE DE LA PARTIE TECHNIQUE

Pages

AXELSEN N.H et SVENDSEN P.J. (1972) T.10
Candida precipitins characterized by a modified antigen-antibody crossed electrophoresis .
Protides of the biological fluids. 19th Colloquium1971
Peeters H (ed.) Pergamon Press.Oxford 561-564 .

BERNFELD P. (1955) T.18
Amylases α and β .
Methods in Enzymology (Academic Press, New-York)
1, 149-158 .

BISERTE G. (1957) T.2
Les glycoprotéides du sérum sanguin et de l'urine - Exploration et signification physico-pathologique .
Bull. Soc. Chim. Biol., 39, suppl. n°3, 93 .

CHAUVET J. et ACHER R. (1972) T.21
Isolation of a trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor) from bovine ovary by affinity chromatography through trypsin - Sepharose.
FEBS Letters, 23, 317-320 .

CLARKE H.G.M. et FREEMAN T. (1967) T.5
Quantitative immunoelectrophoresis method (Laurell electrophoresis).
Protides of the biological fluids - 14th Colloquium
1966 - Peeters H (ed.) E lsevier Amsterdam, 503-509 .

Pages

DAVIS B.J. (1964) T.14
Disc electrophoresis.II. Method and application to human serum proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sc., 121, 404-427.

DEMAILLE J., DAUTREVAUX M., HAVEZ R. et BISERTE G. (1965). T.18
Isolement, propriétés physico-chimiques et composition de l'a_2-macroglobuline de Porc.
Bull. Soc. Chim. France, 12, 3506-3511.

HIRSCH-MARIE H. et BURTIN P. (1964) T.19
Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique de l'activité amylasique du suc gastrique et de la salive humaine.
Rev. franç. Etud. chim. biol., 9, 518-520.

KROLL J. (1968) T.8
On the immunoelectrophoretical identification and quantitation of serum proteins.
Scand. J. clin. Lab. Invest., 22, 79-85.

KROLL J. (1969) T.8
Immunochemical identification of specific precipitin lines in quantitative immuno-electrophoresis patterns.
Scand. J. clin. Lab. Invest., 24, 55-60.

LAURELL C.B. (1965) T.5
Antigen antibody crossed electrophoresis.
Anal. Biochem. 10, 358-361.

SCHEIDEGGER J.J. (1955) T.1
A micromethod of immuno-electrophoresis.
Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol., 7; 103-110.

Pages

SVENDSEN P.J. et ROSE C. (1970) T.12

Separation of proteins using Ampholine carrier ampholytes as buffer and spacer ions in an isotachophoresis system.

Science Tools, 17 n°1, 13-17.

URIEL J. (1961) T.20

Caracterisation des cholinestérases et d'autres estérases carboxyliques après electrophorèse et immuno-électrophorèse en gélose.

I. Application à l'étude des estérases du sérum humain normal.

Ann. Inst. Pasteur, 101, 104-119.

VANARKEL C., BALLIEUX R.E et JORDAN F.L.J. (1963) T.2

Micro-electrophorèsis of mucopolysaccharides on agarose gel.

J. Chromatog., 11, 421-423.

WEEKE B. (1973) T.3

General remarks on principles, equipment, reagents and procedures.

Scand. J. of Immun., 2, supplement 1, 1-35.

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE